



Universidad Nacional del Litoral

Facultad de Ingeniería Química

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de “Doctora en Ciencia y Tecnología de Alimentos”

Título: “Desarrollo de un yogur con propiedades funcionales para contribuir a las estrategias contra la obesidad: aspectos fisicoquímicos, tecnológicos, de calidad y nutricionales”

Autora: Lic. María Victoria Beret

Directora: Dra. María Cristina Perotti.

Co-directora: Dra. Irma Verónica Wolf.

Integrantes del Jurado:

- Dra. Gómez Zavaglia, Andrea
- Dra. Buera, Pilar
- Dra. Medina, Roxana

Lugar de Trabajo: Instituto de Lactología Industrial (INLAIN), UNL-CONICET

“Miren bien a la gente, la gente no escucha. Responden a mitad de una explicación y esto no ayuda a la paz. Escuchen, escuchen mucho”.

Papa Francisco

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca otorgada para llevar adelante mis estudios de doctorado y la presente Tesis.

Al CONICET, a la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación (Agencia I+D+i), a la Agencia Santafesina de Ciencia, Tecnología e Innovación (ASaCTeI) y a la Universidad Nacional del Litoral (UNL) por el financiamiento de proyectos de investigación que permitieron realizar este trabajo.

A Milkaut S.A., Arla Foods Ingredients S.A., Garcia Hermanos Agroindustrial S.R.L (Tregar), Biotec S.A. y Grupo Saporiti S.A. por la provisión de insumos (leche, ingredientes lácteos, Stevia y pectina) para el desarrollo de las experiencias a escala laboratorio y a escala piloto.

A los miembros del Jurado por dedicar su tiempo e interés a la lectura y evaluación del manuscrito.

A la Facultad de Ingeniería Química (FIQ-UNL) por la posibilidad de realizar mis estudios de doctorado. A todos los docentes que contribuyeron en mi formación. Sigamos defendiendo la Educación Pública.

A la Comisión Fulbright y el Consejo Federal de Inversiones por la beca otorgada para la realización de una estancia de investigación en el exterior.

A mis directoras, Dra. Cristina Perotti y Dra. Verónica Wolf, por su acompañamiento y guía a lo largo de mi doctorado y por contribuir con su experiencia y conocimientos al desarrollo de mi carrera. Por su trato humano y cariñoso a lo largo de estos años.

A la Dra. Andrea Quiberoni por preocuparse por la compleja realidad de los becarios.

A todo el equipo del INLAIN y, especialmente, a quienes colaboraron en el desarrollo de este trabajo: Lic. Soledad Caballero, Lic. Leila Pozza y Mg. Silvina Rebechi por la realización de análisis fisicoquímicos; al equipo de microbiología (Dra. Ana Binetti, Dra. Melisa Puntillo, Dra. Elisa Ale, Dra. Silvina Pujato, Lic. Desire Llorens, Dr. Pablo Torti y Prof. Laura Bergero) quienes colaboraron en el análisis de las muestras del estudio clínico. A la Dra. Claudia Vénica y el Ing. Guillermo George por su asesoramiento, colaboración y acompañamiento en las elaboraciones en la planta piloto. Al Dr. Gabriel Vinderola por la coordinación y ánimo para realizar dicho estudio. A las Dras. Ruth Aragón y Luz Rodeles, y a Alan Cavalcante de la Facultad de Ciencias Médicas (FCM-UNL) por su colaboración como profesionales médicos en dicho estudio. Al Dr. Fabio Nachmann por su asesoramiento. A todos los participantes del estudio clínico.

A la Dra. Laura Spotti por ayudarme en mis primeras experiencias con el reómetro.

A directivos, profesores y alumnos de la Escuela técnica n°298 Don Miguel Manfredi (Franck, Santa Fe) por permitirnos utilizar las instalaciones de la planta piloto para realizar las elaboraciones de yogur. En particular, a Martín Vicentín y Gisella Pozo por su buena predisposición y toda su colaboración en nuestras visitas.

Al Dr. Daniel Wilbanks y al Dr. John Lucey del Center for Dairy Research (University of Wisconsin-Madison) por recibirme en sus instalaciones y permitirme realizar el trabajo propuesto con su asesoramiento permanente.

A mis compañeras de 'la Salita', Mara, Fio, Cata, Mile y Pauli, por su amistad y compañía en cada momento de este proceso, por ser compañeras de mates y largas jornadas, por las charlas que dieron origen a buenas ideas, por su afecto, apoyo y comprensión en los tiempos inciertos que corren. A mis amigos, por los momentos de distracción tan necesarios.

A mi novio, Leandro, por entender las ausencias y hacer más liviano el día a día. Por acompañarme amorosamente en mis decisiones.

A mi familia, por su apoyo incondicional. A mi pequeña Sofía.

Divulgación de resultados

Publicaciones en revistas internacionales

Beret M. V., Wolf I.V., Puntillo M., Forzani L., Cuffia F., Quintero Ceron J.P., Vénica C.I. y Perotti M.C (2025). Comparative analysis of high-protein and lactose-reduced semi-skim yogurt production at different scales: effects on lactic fermentation metabolites, physicochemical, microbiological and physical properties, and sensory characteristics. *International Dairy Journal*, 167, 106261. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2025.106261>.

Beret M.V., Wolf I.V., Vénica C.I., Rebecchi S., Spotti M.L., Perotti M.C. (2024). Development of semi-skim high-protein yoghurts: effects of different whey protein ingredients on physicochemical parameters, textural properties and volatile compounds. *International Dairy Journal*, 157, 106008. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2024.106008>.

Vénica, C.I., Wolf, I.V., **Beret, M.V.**, Bergamini, C.V., Burns, P., Binneti, A. y Perotti, M.C. (2023a). Influence of commercial starter culture on fermentation dynamics and quality characteristics of yogurts obtained with different formulations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. doi 10.1002/jsfa.12168

Trabajos presentados en eventos científicos**2024**

Beret, M.V., Wolf, I.V., Pozza, L., Loyeau, P., Caballero, S., Perotti, M.C. Formulaciones de yogur incrementados en proteína: efectos en la calidad y potencial impacto en la saciedad. IX Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2024). Octubre, 2024, Córdoba, Argentina. Presentación de resumen y oral.

2023

Beret, M.V., Robert, N., Spotti, M.L., Quintero Ceron, J. P., Rebecchi, S., Manuale, D., Quiberoni, A., Wolf, I. V., Vénica, C. I., Perotti, M. C. Potencial aplicación de fibra de zanahoria en la elaboración de yogur incrementado en proteínas. efecto sobre las propiedades fisicoquímicas, texturales y perfiles de fermentación y volátiles. XVIII Congreso CyTAL® 2023, Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios (AATA). 4 al 6 de octubre, 2023. Buenos Aires, Argentina. Presentación de trabajo completo y póster.

Beret, M.V., Robert, N., Spotti, M.L., Quintero Ceron, J. P., Rebecchi, S., Manuale, D., Quiberoni, A., Wolf, I. V., Vénica, C. I., Perotti, M. C. Impacto de la incorporación de fibra de zanahoria y

del incremento proteico en las características fisicoquímicas y sensoriales de yogures deslactosados y tradicionales. X Congreso de Alimentos Siglo XXI: Alimentos, Nutrición y Salud - XLIV Reunión del Capítulo Argentino de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición (CASLAN). 4 - 6 de septiembre, 2023. Santa Fe, Argentina. Presentación de resumen y póster.

Beret, M.V., Vénica, C.I., Wolf, I.V. y Perotti M.C. Technological development and characterization of high protein yogurt, reduced in lactose and with galactooligosacharides as potential enhancer of gut health. Dairy Science y Technology Symposium, University College Cork. 19 - 22 de junio, 2023. Evento virtual. Presentación de resumen y presentación oral.

2022

Beret, M.V., Vénica, C.I., Vinderola, G., Wolf, I.V. y Perotti, M.C. High-protein yogurt. Technological development, physicochemical and structural characterization. IDF 7th Symposium on Science and Technology of Fermented Milk. 29 - 30 de octubre, 2022. Evento virtual. Presentación de resumen y poster.

Beret, M.V., Vénica, C.I., Spotti, M.L., Quintero, J.P., Wolf, I.V. y Perotti, M.C. Utilización de proteínas de suero lácteo para mejorar el perfil nutricional de yogur. Segundo taller de biotecnología aplicada a alimentos. Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Buenos Aires. 27 - 28 de octubre, 2022. Buenos Aires, Argentina. Presentación de resumen y poster.

Beret, M.V., Vénica, C.I., Rebechi, S., Caballero, M.S., Spotti, M.L., Quintero, J.P., Wolf, I.V. y Perotti, M.C. (Influencia de la formulación de yogur incrementado en proteínas en la dinámica de fermentación, características fisicoquímicas, reológicas y microestructurales. VIII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2022). 4 - 6 de octubre, 2022, Córdoba, Argentina. Presentación de resumen y poster.

Beret, M.V., Vénica, C.I., Rebechi, S., Caballero, M.S., Pozza, L., Spotti, M.L., Quintero, J.P., Wolf, I.V. y Perotti, M.C. (2022) Estrategias tecnológicas para obtener yogur alto en proteínas. Influencia sobre parámetros fisicoquímicos y de textura. VI Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, Universidad Nacional de Cuyo. 6 - 8 de abril, 2022, San Rafael (Mendoza), Argentina. Presentación de trabajo completo y presentación oral.

Índice

Índice

Divulgación de resultados	3
Índice	6
Abreviaturas y símbolos	18
Resumen	21
Abstract	24
Introducción	27
I. Definición, características y aspectos legales del yogur	28
II. Aspectos nutricionales y beneficios a la salud del yogur	30
III. Mercado de yogur. Escenario mundial y en Argentina	39
IV. Tecnología de elaboración de yogur	41
V. Estudio de la formación del gel y comportamiento reológico del yogur	46
VI. Estrategias para incrementar el contenido proteico en yogur	50
VII. Estrategias para incorporar fibras al yogur	57
a. Incorporación de ingredientes fuente de fibras en yogur	59
b. Formación in situ de GOS en yogur	60
Objetivos	62
Técnicas Analíticas	64
TA 1. pH y acidez titulable (AT)	65
TA 2. Concentración de oxígeno disuelto (OD)	65
TA 3. Contenido de proteína total	65
TA 4. Contenido de materia grasa	66
TA 5. Contenido de sólidos totales (ST)	66
TA 6. Contenido de cenizas	67
TA 7. Contenido de calcio	67
TA 8. Contenido de fósforo	69
TA 9. Análisis del perfil de carbohidratos y de ácidos orgánicos	69
TA 10. Análisis del perfil de compuestos volátiles	70
TA 11. Recuento de bacterias lácticas (BAL) totales	71
TA 12. Recuento diferenciado de <i>S. thermophilus</i> y <i>L. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	71
TA 13. Recuento de mohos y levaduras	71
TA 14. Recuento de coliformes totales	71
TA 15. Capacidad de retención de agua (CRA)	72
TA 16. Evaluación de las propiedades de gelificación/coagulación	72
TA 17. Análisis reológico rotacional	74
TA 18. Análisis reológico en condiciones orales simuladas	75
TA 19. Perfil de textura (TPA)	75
TA 20. Microestructura	76
TA 21. Morfología de los ingredientes lácteos	76
Capítulo 1	77
1. Materiales y métodos	79
1.1. <i>Materiales</i>	79
1.2. <i>Caracterización de los ingredientes de proteínas de suero</i>	79
1.3. <i>Diseño experimental</i>	79
1.4. <i>Experiencias preliminares</i>	80
1.4.1. Preparación del fermento y dosis del inóculo	80

1.4.2. Elaboración de yogur	80
1.4.3. Análisis realizados.....	81
1.4.4. Análisis estadístico.....	81
1.5. <i>Estudio del efecto de la formulación sobre la formación del gel, parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y estructurales, perfiles de fermentación y de compuestos volátiles.</i>	81
1.5.1. Diseño experimental	81
1.5.2. Elaboración de yogur y análisis	81
1.5.3. Análisis estadístico.....	82
2. Resultados y discusión	82
2.1. <i>Caracterización de los ingredientes proteicos</i>	83
2.1.1. Microscopía SEM.....	83
2.1.2. Contenido de calcio	83
2.2. <i>Experiencias preliminares</i>	84
2.3. <i>Estudio del efecto de la formulación</i>	84
2.3.1. Evolución de la fermentación.....	84
2.3.2. Composición global y parámetros fisicoquímicos de los yogures.....	89
2.3.3. Recuentos microbianos de los yogures	90
2.3.4. Perfiles de carbohidratos y de ácidos orgánicos de las leches base y de los yogures	91
2.3.5. Perfil de compuestos volátiles de los yogures	93
2.3.6. Comportamiento reológico de los yogures.....	96
2.3.7. Perfil de textura de los yogures	98
2.3.8. Microestructura y aspecto visual de los yogures.....	100
3. Conclusiones	102
Capítulo 2.....	104
1. Materiales y métodos.....	106
1.1. <i>Materiales</i>	106
1.2. <i>Diseño experimental</i>	106
1.3. <i>Preparación del fermento</i>	107
1.4. <i>Elaboración de los yogures</i>	107
1.5. <i>Análisis estadístico</i>	109
2. Resultados.....	110
2.1. <i>Microscopía del ingrediente MPC70</i>	110
2.2. <i>Evolución de la fermentación</i>	110
2.3. <i>Parámetros fisicoquímicos</i>	113
2.4. <i>Composición global, microbiología y CRA de los yogures</i>	115
2.5. <i>Ácidos orgánicos y carbohidratos de las leches base y de los yogures</i>	119
2.6. <i>Perfil de compuestos volátiles de los yogures</i>	124
2.7. <i>Reología en condiciones orales de los yogures</i>	131
2.8. <i>Comportamiento reológico y perfil de textura de los yogures</i>	134
2.9. <i>Microestructura y aspecto visual de los yogures</i>	137
3. Conclusiones	139
Capítulo 3.....	141
1. Materiales y métodos.....	143
1.1. <i>Materiales</i>	143
1.2. <i>Diseño experimental</i>	143
1.3. <i>Preparación del fermento</i>	144
1.4. <i>Elaboración de los yogures, seguimiento de la formación del gel y post procesamiento</i>	144
1.5. <i>Metodologías analíticas</i>	148
1.6. <i>Análisis estadístico</i>	150
2. Resultados y discusión	150

2.1.	<i>Análisis de la evolución de la fermentación a través de medidas de pH y formación del gel</i>	150
2.2.	<i>Composición global de las leches base, y pH y ácidos orgánicos de los yogures</i>	155
2.3.	<i>Capacidad de retención de agua y permeabilidad de los yogures</i>	160
2.4.	<i>Microestructura y aspecto visual de los yogures</i>	161
2.5.	<i>Reología en condiciones orales de los yogures</i>	163
3.	Conclusiones	167
Capítulo 4		169
1.	Materiales y métodos	171
1.1.	<i>Materiales</i>	171
1.2.	<i>Diseño experimental</i>	171
1.3.	<i>Preparación del fermento y dosis del inóculo</i>	171
1.4.	<i>Elaboración de los yogures y análisis</i>	171
1.5.	<i>Análisis estadístico</i>	173
2.	Resultados	173
2.1.	<i>Evolución de la fermentación, composición global, análisis fisicoquímicos y microbiológicos</i>	173
2.2.	<i>Ácido láctico y carbohidratos de las leches base y de los yogures</i>	177
2.3.	<i>Perfil de compuestos volátiles de los yogures</i>	179
2.4.	<i>Comportamiento reológico, perfil de textura y microestructura de los yogures</i>	183
3.	Conclusiones	188
Capítulo 5		190
1.	Materiales y métodos	193
1.1.	<i>Materiales</i>	193
1.2.	<i>Diseño experimental</i>	193
1.3.	<i>Preparación del fermento y dosis del inóculo</i>	193
1.4.	<i>Elaboración de los yogures a escala piloto y análisis</i>	193
1.5.	<i>Análisis sensorial</i>	196
1.5.1.	Análisis cuantitativo descriptivo (QDA®)	196
1.5.2.	Análisis de consumidores	196
1.6.	<i>Análisis estadístico</i>	197
2.	Resultados	197
2.1.	<i>Evolución de la fermentación, composición global, análisis fisicoquímicos y microbiológicos</i>	198
2.2.	<i>Ácidos orgánicos y carbohidratos de las leches base y de los yogures</i>	199
2.3.	<i>Perfil de compuestos volátiles de los yogures</i>	201
2.4.	<i>Reología y microestructura de los yogures</i>	207
2.5.	<i>Análisis sensorial</i>	212
3.	Conclusiones	213
Capítulo 6		215
1.	Materiales y métodos	217
1.1.	<i>Elaboración del yogur a escala piloto</i>	217
1.1.1.	Materiales	217
1.1.2.	Protocolo de elaboración y análisis	217
1.2.	<i>Estudio clínico</i>	218
1.2.1.	Diseño experimental, desarrollo del protocolo y selección de participantes	218
1.2.2.	Recolección de muestras de los participantes y análisis	220
☒	Muestras de sangre	220
☒	Muestras de materia fecal	220
☒	Encuesta de síntomas gastrointestinales	221

1.3. <i>Análisis estadístico</i>	222
2. Resultados.....	223
2.1. <i>Análisis en leches base y yogures</i>	223
2.1.1. Composición global y contenido de lactosa en LB	223
2.1.2. Recuentos microbiológicos en el yogur	224
2.1.3. pH, acidez titulable, ácido láctico y carbohidratos del yogur	225
2.1.4. Capacidad de retención de agua y comportamiento reológico del yogur.....	227
2.2. <i>Parámetros analizados en los participantes</i>	228
3. Conclusiones	238
Conclusiones	239
Bibliografía	243
Anexos	273
Anexo 6.1.....	274
Anexo 6.2.....	289

Índice de Tablas

Tabla I. Aminoácidos indispensables, dispensables y condicionalmente indispensables (Pellegrino et al., 2013).	35
Tabla II. Aminoácidos presentes en las proteínas de la leche (%) (McSweeney y Fox, 2003).	35
Tabla III. Score de aminoácidos recomendado según grupo etario por día (FAO/OMS, 2011b).	36
Tabla IV. Composición y características de las caseínas (Chandan, 2006).	42
Tabla V. Composición y características de las proteínas de suero (Chandan, 2006).	42
Tabla VI. Composición aproximada (g/100 g) de ingredientes lácteos (Tamime, 2009).	53
Tabla 1. Comparación de métodos para análisis de calcio (Espectrometría de Absorción Atómica de Llama -FAAS- y Electrodo Selectivo de Iones -ISE-), por test t de Student. Los resultados de concentración de calcio se expresan como mg/100g yogur	69
Tabla 1.1. Composición de los ingredientes en polvo en base húmeda (según especificaciones técnicas de los fabricantes)	79
Tabla 1.2. Diseño experimental de los yogures	80
Tabla 1.3. Parámetros de formación del gel durante la fermentación obtenidos con el equipo Optigraph®	87
Tabla 1.4. Composición global, pH, AT y CRA de los yogures a los 21 d de almacenamiento.	89
Tabla 1.5. Ácidos orgánicos (mg/100 g) y carbohidratos (g/100 g) de las leches base y de los yogures (21 d).	91
Tabla 1.6. Compuestos volátiles (valores de áreas en unidades arbitrarias x 1000) de los yogures (21 d) agrupados según familias químicas.	93
Tabla 1.7. Comportamiento de flujo (n), índice de consistencia (k), y viscosidad aparente (η_a) a 50 s^{-1} de esfuerzo de corte de los yogures (21 d).	96
Tabla 2.1. Composición de los ingredientes en polvo en base húmeda (según especificaciones técnicas de los fabricantes y análisis realizados).	106
Tabla 2.2. Diseño experimental de los yogures.	107
Tabla 2.3. Composición de las formulaciones de yogur (g/100 g).	107
Tabla 2.4. Parámetros de formación del gel durante la fermentación obtenidos con el equipo Optigraph® para los yogures del Grupo 1.	112
Tabla 2.5. Parámetros de formación del gel durante la fermentación obtenidos con el equipo Optigraph® para los yogures del Grupo 2.	112
Tabla 2.6. Composición global y recuentos microbiológicos de los yogures del Grupo 1 (21 d)	115
Tabla 2.7. Composición global y recuentos microbiológicos de los yogures del Grupo 2 (21 d)	116
Tabla 2.8. Compuestos volátiles (valores de áreas en unidades arbitrarias x 1000) de los yogures del Grupo 1 (21 d).	126
Tabla 2.9. Compuestos volátiles (valores de áreas en unidades arbitrarias x 1000) de los yogures del Grupo 2 (21 d).	129
Tabla 2.10. Parámetros obtenidos del ajuste de las curvas de flujo con la Ley de Potencia, y del perfil de textura de los yogures del Grupo 1.	135

Tabla 2.11. Parámetros obtenidos del ajuste de las curvas de flujo con la Ley de Potencia, y del perfil de textura de los yogures del Grupo 2.	135
Tabla 3.1. Diseño experimental de los yogures.	144
Tabla 3.2. Composición de las formulaciones de yogur (g/100 g).	144
Tabla 3.3. Resumen del procedimiento llevado a cabo durante la elaboración y análisis de los yogures, en relación al fraccionamiento mostrado en la Fig. 3.1.	147
Tabla 3.4. Parámetros medidos durante la fermentación de las formulaciones T y E, con diferentes fermentos comerciales (Y8, Y9 y SG).	152
Tabla 3.5. Composición global de las leches base T y E.	156
Tabla 3.6. Valores de pH, ácidos orgánicos y lactosa de los yogures T y E elaborados con los fermentos Y8, Y9 y SG (1 d).	158
Tabla 3.7. Parámetros obtenidos por reometría rotacional en condiciones orales simuladas, para los yogures T y E elaborados con los fermentos Y8, Y9 y SG, con y sin agitación (ca y sa, respectivamente) (1 d).	165
Tabla 4.1. Diseño experimental de los yogures.	171
Tabla 4.2. Composición de las formulaciones de yogur (g/100 g).	172
Tabla 4.3. Composición global, pH y AT de los yogures a los 21 d.	175
Tabla 4.4. Concentración de lactosa en LB, ácido láctico y carbohidratos en yogur (21 d).	178
Tabla 4.5. Compuestos volátiles (valores de áreas en unidades arbitrarias x 1000) de los yogures (21 d).	181
Tabla 4.6. Valores de esfuerzo de corte (a velocidad de corte de 50, 150 y 300 s ⁻¹) y de viscosidad aparente (a velocidad de corte de 50 s ⁻¹) de los yogures (21 d).	184
Tabla 5.1. Composición de la formulación de yogur elaborado a escala piloto (P).	194
Tabla 5.2. pH, AT, composición global, CRA y recuentos microbiológicos de los yogures L y P (21 d).	199
Tabla 5.3. Niveles de ácidos orgánicos y carbohidratos de las leches base y de los yogures (21 d).	200
Tabla 5.4. Compuestos volátiles (valores de áreas en unidades arbitrarias x 1000) en los yogures (21 d) agrupados según familias químicas.	202
Tabla 5.5. Índice de consistencia (<i>k</i>), viscosidad aparente (η_a) a 50 s ⁻¹ de velocidad de corte, de los yogures (21 d).	208
Tabla 6.1. Criterios de inclusión y exclusión para la selección de los participantes del estudio clínico.	219
Tabla 6.2. Composición global (proteína, grasa, ST, cenizas, calcio, fósforo, sodio) y contenido de lactosa de la leche base.	223
Tabla 6.3. Recuentos microbiológicos en los yogures elaborados a escala piloto, a los días 1, 7, 14 y 21 d de almacenamiento refrigerado.	224
Tabla 6.4. Características de los participantes del estudio clínico de consumo de yogur incrementado en proteínas.	229
Tabla 6.5. Parámetros sanguíneos evaluados en los participantes al inicio y final del estudio clínico de consumo del yogur.	230

Tabla 6.6. Percepción de síntomas y síndromes gastrointestinales registrados a partir de la encuesta GRSR realizada por los participantes durante el estudio clínico de consumo del yogur, expresado como la diferencia entre los distintos puntos de muestreo.	233
--	-----

Índice de Figuras

Fig. I. Destino de la producción de leche en Argentina (OCLA, 2023).....	40
Fig. II. Protocolo genérico de elaboración de yogur (estilo firme y batido).	45
Fig. III. Esquema del proceso de formación del gel durante la fermentación de yogur (Karam et al., 2013).	46
Fig. IV. Representación gráfica de la función sinusoidal del movimiento oscilatorio. Línea roja: líquido newtoniano; línea azul: sólido ideal; línea verde: fluido viscoelástico	47
Fig. V. Curvas típicas de Módulo de Almacenamiento o G' (●) y de Tangente de Pérdida (\circ) vs. Tiempo de Fermentación obtenidas por reometría oscilatoria durante una fermentación de yogur (Lee y Lucey, 2010).	49
Fig VI. Ingredientes de proteínas lácteas clasificados según el tipo de proteínas que contienen (proteínas de suero -WP-, caseínas -CN-, proteínas de leche)	52
Fig. 1. Curva típica de %Intensidad vs. Tiempo obtenido mediante el Optigraph® durante la fermentación de yogur. Fi: firmeza inicial; Ff: firmeza final; S: velocidad de agregación; GT: tiempo correspondiente al inicio de la gelificación (Serra et al., 2007).	73
Fig. 1.1. Esquema de muestreo y controles analíticos realizados durante la elaboración y almacenamiento de los yogures.	82
Fig. 1.2. Micrográficas SEM de WPC35 (izq.) y MWP (der.)	83
Fig. 1.3. Evolución de pH durante la fermentación de los yogures.	85
Fig. 1.4. Concentración de OD a tiempo inicial (0 min) y final (270 min) de la fermentación de los yogures.	86
Fig. 1.5. Porcentaje de grupos químicos de compuestos volátiles respecto al área total en los yogures (21 d).	94
Fig. 1.6. Parámetros de TPA: firmeza (N), cohesividad (adimensional) y adhesividad (J) de los yogures (21 d).	98
Fig. 1.7. Micrográficas de CLSM de los yogures (21d).	101
Fig. 1.8. Aspecto visual de los yogures (21d).	102
Fig. 2.1. Esquema de muestreo y controles analíticos realizados durante la elaboración y almacenamiento de los yogures.	109
Fig. 2.2. Micrográficas SEM del MPC70. Magnificación de 500x (izq.) y de 2500x (der.)	110
Fig. 2.3. Evolución de pH durante la fermentación de las formulaciones del Grupo 1 (izq.) y del Grupo 2 (der.)	111
Fig. 2.4. Valores de pH (izq.) y AT (der.) de leches base (LB) y yogures a 1 d y 21 d de almacenamiento.	114
Fig. 2.5. Niveles de CRA (%) en los yogures del Grupo 1 (izq.) y del Grupo 2 (der.) a 1 d y 21 d de almacenamiento.	117
Fig. 2.6. Concentración de ácidos orgánicos (mg/100 g) y carbohidratos (g/100 g) de las leches base (LB) y de los yogures del Grupo 1 (1 d y 21 d, según corresponda).	120
Fig. 2.7. Concentración de ácidos orgánicos (mg/100 g) y carbohidratos (g/100 g) de las leches base (LB) y de los yogures del Grupo 2 (1 d y 21 d, según corresponda).	122

Fig. 2.8. Porcentaje de grupos químicos de compuestos volátiles respecto al área total en los yogures del Grupo 1 (izq.) y del Grupo 2 (der.) (21 d).....	125
Fig. 2.9. Biplot de los Componentes Principales de compuestos volátiles para los yogures del Grupo 1 (21 d).....	128
Fig. 2.10. Biplot de los Componentes Principales de compuestos volátiles para los yogures del Grupo 2 (21 d).....	130
Fig. 2.11. Curvas de Viscosidad Aparente (Pa.s) vs. Temperatura (°C) de los yogures del Grupo 1 (izq.) y del Grupo 2 (der.).....	132
Fig. 2.12. Micrografías obtenidas por CLSM de los yogures (21 d).....	137
Fig. 2.13. Observación visual de los yogures (21 d).....	139
Fig. 3.1. Esquema de fraccionamiento de la LB inoculada para su posterior fermentación y análisis.....	145
Fig. 3.2. Esquema de muestreo y controles analíticos realizados durante la elaboración y almacenamiento de los yogures.....	148
Fig. 3.3. Curvas de G' vs. pH durante la fermentación de las formulaciones T (izq.) y E (der.), con los fermentos comerciales Y8, Y9 y SG.....	151
Fig. 3.4. Características (viscosidad en boca e intensidad de sabor a yogur) de fermentos comerciales para yogur productores de EPS del fabricante Chr. Hansen (Skriver y Karychev, 2007).....	155
Fig. 3.5. Valores de permeabilidad (m ²) de los yogures sin agitación (inmediatamente luego de la fermentación) y CRA (%) de los yogures sin agitación (sa) a 1 d.....	160
Fig. 3.6. Micrografías de CLSM de yogures sin agitación T_Y8sa, T_Y9sa, T_SGsa, E_Y8sa, E_Y9sa, y E_SG sa; y con agitación T_Y8ca, T_Y9ca, T_SGsa, E_Y8ca, E_Y9ca, y E_SGca.....	162
Fig. 3.7. Observación visual de los yogures con agitación (T_Y8ca, T_Y9ca, T_SGsa, E_Y8ca, E_Y9ca, y E_SGca) y sin agitación (E_Y8sa, E_Y9sa, y E_SGsa).....	163
Fig. 3.8. Curvas de Viscosidad Aparente (mPa.s) vs. Temperatura (°C) obtenidas por reometría rotacional en condiciones orales simuladas (velocidad de corte constante de 60 s ⁻¹ , temperatura de 15 a 25 °C, ~1 °C/s por 1 min; mantenimiento a 25-26 °C por 1 min), para los yogures T y E elaborados con los fermentos Y8, Y9 y SG, y con aplicación o no de agitación (1 d). Izq.: yogures sin agitación (sa); der.: yogures con agitación (ca).....	164
Fig. 4.1. Esquema de muestreo y controles analíticos realizados durante la elaboración y almacenamiento de los yogures.....	173
Fig. 4.2. Evolución de pH durante la fermentación de los yogures.....	174
Fig. 4.3. Niveles de CRA (%) de los yogures (21 d).....	176
Fig. 4.4. Porcentaje de grupos químicos de compuestos volátiles respecto al área total en los yogures (21 d).....	180
Fig. 4.5. a. Curvas de Esfuerzo de Corte (Pa) vs. Velocidad de Corte (s ⁻¹) de los yogures (21 d). b. Curvas de Viscosidad Aparente (Pa.s) vs. Esfuerzo de corte (s ⁻¹) de los yogures (21 d).....	184
Fig. 4.6. Parámetros de TPA: firmeza (N), cohesividad (adimensional) y adhesividad (J) de los yogures (21 d).....	186
Fig. 4.7. Micrografías de CLSM de los yogures (21 d).....	187
Fig. 5.1. a. Balanza empleada para pesar los ingredientes en polvo. b. Fermentador con camisa de 50 L de capacidad, con agitación mecánica. c. Envasadora manual.....	195

Fig. 5.2. Esquema de muestreo y controles analíticos realizados durante la elaboración y almacenamiento de los yogures.	196
Fig. 5.3. Planilla entregada a los participantes del análisis sensorial con consumidores.....	197
Fig. 5.4. Evolución de pH durante la fermentación para los yogures L y P.	198
Fig. 5.5. Porcentaje de grupos de compuestos volátiles agrupados según familias químicas para los yogures (21 d)	201
Fig. 5.6. Biplot de los Componentes Principales 1 (PC1) y 2 (PC2) de los compuestos volátiles, ácido láctico y lactosa de los yogures L y P (21 d).....	205
Fig. 5.7. Biplot de los componentes 1 (PLS C1) y 2 (PLS C2) de los compuestos volátiles, ácido láctico y lactosa de los yogures L y P (21 d).....	206
Fig. 5.8. Correlación de PLS:C1 vs. PCA:PC1.....	206
Fig. 5.9. Correlación de PLS:C2 vs. PCA:PC2.....	207
Fig. 5.10. Izq.: curvas de flujo (Esfuerzo de Corte vs. Velocidad de Corte). Der.: curvas de Viscosidad vs. Esfuerzo de Corte, de los yogures (21 d).	209
Fig. 5.11. Micrográficas de CLSM de los yogures (21 d). Izq.: L. Der.: P.	210
Fig. 5.12. a, b y c. Progreso de la etapa de agitación del yogur P. d. Aspecto del yogur envasado (1 d).	211
Fig. 5.13. Intensidad de los descriptores sensoriales percibidos por el panel entrenado para el yogur P (21 d).	212
Fig. 5.14. Histograma de frecuencias de la escala hedónica de 9 puntos correspondientes al yogur P (21 d), según la evaluación realizada por consumidores (149).....	213
Fig. 6.1. Esquema de muestreo y controles analíticos realizados durante la elaboración y almacenamiento de los yogures	218
Fig. 6.2. Evolución de pH y AT a lo largo del almacenamiento de los yogures obtenidos a escala piloto	225
Fig. 6.3. Concentraciones de ácido láctico, lactosa, glucosa, galactosa y galactooligosacáridos (GOS) en LB y yogur (mg/100 g y g/100 g, respectivamente), a 1, 7, 14 y 21 d de almacenamiento refrigerado.	226
Fig. 6.4. Niveles de CRA (%) (izq.), índice k (Pa.s) y viscosidad aparente (Pa.s) (der.) en el yogur a lo largo del almacenamiento.....	228
Fig. 6.5. Diagrama box-plot de las diferencias de medianas en los parámetros sanguíneos (Final-Inicial) evaluados en los participantes del estudio clínico de consumo del yogur, discriminado por sexo.	231
Fig. 6.6. Variación en los parámetros sanguíneos evaluados en cada participante, entre los resultados bioquímicos del punto inicial ('primer') y final ('segundo') y valor de mediana (línea azul) en el estudio clínico de consumo del yogur.....	232
Fig. 6.7. Gráficos de radar de síntomas y síndromes gastrointestinales en mujeres (izq.) y varones (der.). La línea negra representa el punto inicial, la línea roja el punto intermedio y la línea azul el punto final.	233
Fig. 6.8. Comparaciones de la alfa-diversidad antes y después del consumo del yogur, utilizando el índice de Shannon. Las líneas discontinuas conectan los valores del punto inicial y final para cada participante.....	234

Fig. 6.9. Diferencias en la abundancia de las familias <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Lachnospiraceae</i> y <i>Acidaminococcaceae</i> antes y después del consumo del yogur.	235
Fig. 6.10. Diferencias en la abundancia de géneros específicos antes y después del consumo del yogur (se eliminaron <i>Butyricimonas</i> y <i>Lactobacillus</i> debido a los pocos puntos de datos y se incluyeron <i>Ruminococcus</i> y <i>Eubacterium</i>).	235
Fig. 6.11. Composición de las familias de <i>Proteobacteria</i> en muestras de materia fecal de algunos participantes (16 de 43) recolectadas antes y después del consumo del yogur.	236

Abreviaturas y símbolos

N: normalidad (equivalentes/L)

°D: grados Dornic

°C: grados centígrados

≅: similar

~: aproximadamente

ANOVA: análisis de varianza

Aprox.: aproximadamente

AT: acidez titulable

CAA: Código Alimentario Argentino

CC: cilindros concéntricos

CCP: fosfato de calcio coloidal

CLSM: microscopía confocal laser de barrido

CN: Caseínas

CN:WP: relación caseína:proteína de suero

CRA: capacidad de retención de agua

Ff: firmeza del gel al final de la fermentación

GC: cromatografía gaseosa

GD: densidad del gel al final de la fermentación

GT: tiempo correspondiente al inicio de la gelificación

HPLC: cromatografía líquida de alta presión

IDF: *International Dairy Federation*

ISE: electrodo selectivo de iones

k: índice de consistencia

LB: leche(s) base

MF: microfiltración

MLMR: modelo lineal de medidas repetidas

MPC: concentrado de proteínas de leche

MWP: proteína de suero microparticulada

η_a : viscosidad aparente

NA: no analizado

ND: no detectado

NS: no significativo

OD: oxígeno disuelto

PCA: análisis de componentes principales

PLS: análisis de cuadrados mínimos parciales

PP: plato-plato

S: velocidad de agregación durante la fermentación

SEM: microscopía electrónica de barrido

SMP: leche en polvo descremada

ST: sólidos totales

TPA: análisis de perfil de textura

UF: ultrafiltración

UHT: ultra alta temperatura

WP: Proteínas de suero

WPC: concentrado de proteínas de suero

Resumen

El yogur es uno de los lácteos fermentados más consumidos en Argentina. Recientemente, se ha incrementado el interés por el yogur con alto contenido proteico, valorado por su textura cremosa, mayor saciedad y beneficios nutricionales, entre ellos el aporte de microorganismos vivos que impactarían positivamente en la microbiota intestinal. Por ello, el yogur enriquecido con proteínas es una estrategia alimentaria para personas con sobrepeso.

Una de las metodologías para aumentar la proteína en yogur es la concentración de proteínas en la leche base: tecnologías de membrana y adición de ingredientes basados en proteínas suero (concentrados al 35-80% -WPC35/WPC80-, microparticulado -MWP-, aislado -mWPI-). Independientemente del método utilizado, se pueden producir alteraciones en la fermentación y en las características fisicoquímicas y sensoriales del producto.

En este trabajo se evaluó el impacto del aumento proteico y la relación Caseína (CN): Proteínas de suero (WP) en la leche base sobre la fermentación láctica, la formación del gel, la composición nutricional, la generación de metabolitos y las características estructurales del yogur, así como su escalado piloto y efectos en parámetros sanguíneos, síntomas gastrointestinales y en la composición de la microbiota intestinal de adultos con sobrepeso luego de su consumo.

En el **Capítulo 1**, se formularon yogures con 7,0–7,5 g/100 g de proteína usando WPC35 y MWP. Se seleccionó el tratamiento térmico más adecuado en función de los parámetros estructurales. Se observaron diferencias en las propiedades finales según el tipo de ingrediente utilizado y no por la relación CN:WP, principalmente en los parámetros de formación del gel, estructura y en el perfil de compuestos volátiles.

En el **Capítulo 2**, se empleó concentrado de proteínas de leche al 70% (MPC70) combinado con WPC35, WPC80 y MWP, evaluando diferentes relaciones CN:WP comparativamente a un control preparado con MPC70 (4:1). Nuevamente se observaron diferencias asociadas al tipo de ingrediente en los parámetros de formación del gel, estructura y los compuestos volátiles de los productos, principalmente en los yogures con agregado de proteínas de suero. Se estableció una relación entre la estructura de los productos y su capacidad saciante potencial.

En el **Capítulo 3**, se elaboraron yogures firmes y batidos con contenido proteico de 7,5 y 3,5 g/100 g (control), empleado retentado de ultrafiltración y mWPI, y tres fermentos comerciales. El incremento proteico produjo una matriz más densa, mayor viscosidad evaluada en condiciones orales y menor permeabilidad en comparación al control. La formación del gel fue afectada por el efecto combinado del fermento y nivel proteico. La estructura y la capacidad saciante difirieron con la aplicación o no de agitación.

En el **Capítulo 4** se incorporó una fibra de zanahoria y una β -galactosidasa para mejorar el perfil nutricional del yogur, reducir la lactosa y generar galactooligosacáridos (GOS). Se mejoró la capacidad de retención de agua y la estructura, y se detectaron diferencias cuantitativas en algunos compuestos volátiles.

En el **Capítulo 5**, uno de los prototipos desarrollados a escala laboratorio se validó a escala piloto. Los resultados de ambas escalas se correspondieron, aunque se detectaron algunas diferencias en los compuestos volátiles. El análisis sensorial con panel entrenado calificó positivamente el aroma, sabor y textura del producto, y el análisis con consumidores demostró una alta aceptabilidad e intención de compra.

Finalmente, en el **Capítulo 6** se describe un estudio clínico en adultos con sobrepeso que consumieron, durante cuatro semanas, el yogur incrementado en proteínas (6,3 g/100 g), reducido en lactosa (1,6 g/100 g) y con GOS (1,1 g/100 g). Se observaron mejoras en algunos parámetros sanguíneos y síntomas gastrointestinales, con cambios mínimos en la composición de la microbiota en algunos individuos. Este estudio fue el primero de su tipo realizado en el ámbito académico de la Ciudad de Santa Fe.

Esta Tesis abordó desde la optimización tecnológica, nutricional y estructural de los productos incrementados en proteína a escala laboratorio, hasta el escalado, aspectos de calidad sensorial, y el estudio de la funcionalidad de uno de los productos, alcanzándose de esta manera un enfoque integral de la problemática.

Abstract

Yogurt is one of the most consumed fermented dairy products in Argentina. In recent years, interest in high-protein yogurt has increased due to its creamy texture, greater satiety, and nutritional benefits, including the contribution of live microorganisms that may positively impact the gut microbiota. Therefore, high-protein yogurt is a dietary strategy for overweight individuals.

One of the methods to increase protein content in yogurt is to concentrate proteins in the milk base, using membrane technologies or by adding whey protein ingredients (35–80% concentrates –WPC35/WPC80–, microparticulated whey protein –MWP–, or isolates –mWPI–). Regardless of the selected method, changes may occur in fermentation and in the physicochemical and sensory characteristics of the product.

This work evaluated the impact of increasing protein content and of varying the casein (CN) to whey protein (WP) ratio (CN:WP) in milk base on lactic fermentation, gel formation, nutritional composition, metabolite generation, and structural characteristics of yogurt, as well as pilot-scale production and effects on blood parameters, gastrointestinal symptoms, and gut microbiota composition in overweight adults after consumption.

In **Chapter 1**, yogurts with 7.0–7.5 g/100 g protein were formulated using WPC35 and MWP. The most suitable heat treatment was selected based on structural parameters. Differences in final product properties were observed depending on the type of ingredient used, rather than the CN:WP ratio—particularly in terms of gel formation, structure, and the profile of volatile compounds.

In **Chapter 2** yogurts contained milk protein concentrate 70% (MPC70) combined with WPC35, WPC80, and MWP, evaluating different CN:WP ratios compared to a control prepared with MPC70 (4:1). Differences associated with the type of ingredient were observed in gel formation, structure, and volatile compound profiles, especially in yogurts enriched with whey proteins. A relationship was established between product structure and potential satiety capacity.

Chapter 3 focused on the production of set and stirred yogurts with protein contents of 7.5 and 3.5 g/100 g (control), using ultrafiltration retentate and mWPI, along with three commercial starters. Protein enrichment resulted in a denser matrix, higher oral viscosity, and lower permeability compared to the control. Gel formation was affected by the combined effect of starter culture and protein level. Structure and satiety capacity differed depending on whether agitation was applied.

Chapter 4 incorporated carrot fiber and a β -galactosidase to improve the nutritional profile of yogurt, reduce lactose content, and produce galactooligosaccharides (GOS). Water-holding capacity and structure were improved, and quantitative differences in some volatile compounds were detected.

Chapter 5 involved validating one of the laboratory-scale prototypes at pilot scale. Results from both scales were consistent, although some differences were found in volatile compounds.

Sensory analysis with a trained panel positively rated the aroma, flavor, and texture of the product, and consumer testing showed high acceptability and purchase intention.

Finally, **Chapter 6** describes a clinical trial in overweight adults who consumed, during four weeks, the high-protein yogurt (6.3 g/100 g), with reduced lactose (1.6 g/100 g) and GOS (1.1 g/100 g). Improvements were observed in some blood parameters and gastrointestinal symptoms, with minimal changes in gut microbiota composition in some individuals. This was the first study of its kind conducted in Santa Fe city.

This thesis addressed the technological, nutritional, and structural optimization of high-protein yogurts at laboratory scale, their scaling-up, sensory quality aspects, and the functional assessment of one of the products, thus achieving a comprehensive approach to the issue.

Introducción

I. Definición, características y aspectos legales del yogur

Las leches fermentadas han sido parte de la dieta humana durante miles de años, en gran medida porque la fermentación es uno de los métodos más antiguos para extender la vida útil de la leche. Este proceso modifica tanto los macronutrientes como los micronutrientes confiriendo beneficios nutricionales, entre ellos, el aporte de vitaminas y minerales en una forma fácilmente utilizable, reducción en el contenido de lactosa de la leche, formación de péptidos con bioactividad, y aporte de microorganismos vivos (Gómez-Gallego et al., 2018). Además, la disminución del pH y la formación de compuestos antimicrobianos inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos y de descomposición, entre otros efectos (Fisberg y Machado, 2015; Kok y Hutkins, 2018; Savaiano y Hutkins, 2021). Hace más de 100 años, que el microbiólogo ucraniano Elie Metchnikoff estableció en su trabajo “La Prolongación de la Vida: Estudios Optimistas”, que el consumo de leche fermentada estaba relacionado con una mayor longevidad y con la salud intestinal (Metchnikoff, 1907).

Las leches fermentadas se originaron en diferentes regiones del mundo adoptando nombres diversos tales como yogur, kefir, koumiss, entre otras. Se trata esencialmente del mismo alimento con variaciones en el origen de la leche utilizada como materia prima (vaca, oveja, cabra, etc.), los microorganismos involucrados (bacterias, levaduras o sus combinaciones), las condiciones de fermentación (temperatura y tiempo) y el drenaje parcial del suero para obtener un producto más espeso (Tamime y Robinson, 2000). La urbanización, los cambios en el estilo de vida y los patrones de consumo, los avances tecnológicos, el desarrollo de la bacteriología y la aparición de fermentos lácticos comerciales que permitieron la estandarización de los procesos de manufactura y de la calidad de los productos en el tiempo, condujeron a la obtención de productos industrializados. El yogur es la leche fermentada más popular, de mayor producción y consumo. La producción industrial de yogur tiene más de 100 años a partir de la primera elaboración por parte de la empresa Danone (Aryana y Olson, 2017).

El yogur tiene un importante papel en la dieta en numerosos países del mundo, y su popularidad se ha incrementado en las últimas décadas. El *Codex Alimentarius* define al yogur como una leche fermentada obtenida por la actividad de cultivos simbióticos de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que deben encontrarse viables y activos en el producto durante el período de validez (contenido total mayor a 10^7 ufc/g al momento del consumo) (FAO/OMS, 2011a). La concentración de proteína láctea debe superar un mínimo de 2,7 g/100 g y la grasa láctea no debe ser mayor al 15 g/100 g. La acidez mínima, expresada como porcentaje de ácido láctico, debe ser 0,6 g/100 g (FAO/OMS, 2011a). La legislación alimentaria de nuestro país, el Código Alimentario Argentino (CAA), define al yogur en el Art. 576 del capítulo VIII y coincide en gran parte con aquella del *Codex*, aunque con algunas modificaciones. Establece un contenido proteico mínimo de 2,9 g/100 g y el valor de acidez debe

estar comprendido entre 0,6 y 1,5 g de ácido láctico/100g de yogur. Según el contenido de grasa se definen varios tipos de productos: yogur con crema (mínimo 6 g/100 g), yogur entero o integral (3,0 a 5,9 g/100 g), yogur parcialmente descremado (0,6 a 2,9 g/100 g) y yogur descremado (máximo 0,5 g/100 g) (CAA, 2006). En relación al contenido proteico, el CAA no realiza una clasificación de productos en función del mismo, mientras que el *Codex Alimentarius* define como leches fermentadas concentradas a aquellas que contengan más de 5,6 g/100 g de proteína.

La industria establece un período de validez entre 30 y 35 días, y de acuerdo al CAA deben conservarse y comercializarse a una temperatura no superior a 10 °C.

Durante la fermentación las bacterias lácticas presentes en el fermento o cultivo *starter* transforman la lactosa (principal azúcar de la leche) produciendo principalmente ácido láctico y otros productos derivados (otros ácidos orgánicos y compuestos volátiles), lo que conduce a cambios profundos en las características fisicoquímicas, nutricionales, estructurales, sensoriales y funcionales (gusto, aroma, olor y textura), y en la aceptabilidad por parte del consumidor (Tamime, 2002).

El CAA señala que cuando en la elaboración de las leches fermentadas se adicionan ingredientes opcionales no lácteos, antes, durante o después de la fermentación, éstas se clasifican como leches fermentadas con agregados.

En la elaboración de las leches fermentadas se utilizan:

a) Ingredientes obligatorios: leche o leche reconstituida estandarizada en su contenido de materia grasa. Cultivos de bacterias lácticas. Cultivos de bacterias lácticas específicas, según corresponda a las definiciones establecidas.

b) Ingredientes opcionales: leche concentrada, crema, manteca, grasa anhidra de leche o butteroil, leche en polvo, caseinatos alimenticios, proteínas lácteas, otros sólidos de origen lácteo, sueros lácteos, concentrados de sueros lácteos; frutas en trozos, pulpa, jugo u otros preparados a base de frutas; otras sustancias alimenticias tales como miel, coco, cereales, vegetales, frutas secas, chocolate, especias, café, otras, solas o combinadas; cultivos de bacterias lácticas subsidiarias; azúcares y/o glúcidos (excepto polisacáridos y polialcoholes), maltodextrinas, almidones o almidones modificados, en una proporción máxima de 1 g/100 g del producto final. Los ingredientes opcionales no lácteos solos o combinados deberán estar presentes en una proporción máxima del 30 g/100 g del producto final.

c) Aditivos: No se admite el uso de aditivos en la elaboración de las leches fermentadas para las cuales se hayan utilizado exclusivamente ingredientes lácteos. Se exceptúa de esta prohibición la clase "Descremadas", en cuyo caso se admite el uso de espesantes/estabilizantes. Los aditivos espesantes/estabilizantes permitidos son: carboximetilcelulosa sódica, metil celulosa, metiletil celulosa, hidroxipropilcelulosa, carragenina goma guar, goma garrofin, goma xántica, goma karaya, goma arábica, goma tragacanto, goma gellan, goma konjac, agar, ácido algínico, alginato de amonio, alginato de calcio, alginato de potasio, alginato de sodio, alginato de propilenglicol,

celulosa microcristalina, en concentración máxima de 5 g/kg (solos o combinados); pectina y pectina amidada, gelatina, en concentración máxima de 10 g/kg (solos o combinados). También están permitidos varios aditivos colorantes y saborizantes/aromatizantes.

II. Aspectos nutricionales y beneficios a la salud del yogur

El yogur es un alimento completo ya que provee hidratos de carbono, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales. En su composición destacan altos niveles de varios nutrientes esenciales, incluyendo proteínas de alta calidad, calcio, fósforo, potasio, vitaminas A, D, E y K, y del grupo B (Savaiano y Hutkins, 2021).

Hidratos de Carbono

Entre los hidratos de carbono, la lactosa es prácticamente el único presente en la leche de mamíferos (Jelen, 2022). En la leche bovina también se encuentran a nivel de trazas otros carbohidratos asociados a las proteínas y lípidos, como glicoproteínas y glicolípidos formando parte de la membrana del glóbulo graso, y oligosacáridos (compuestos por N-acetilgalactosamina, galactosa, glucosa, fucosa, y ácido siálico). En el yogur, la lactosa se encuentra en menor concentración respecto a la leche base o mezcla de partida (aprox. 20-30% menos), ya que se hidroliza durante la fermentación generando glucosa y galactosa; por ello, en el yogur, también se encuentra galactosa en baja cantidad y en menor medida glucosa, ya que ésta última es fácilmente metabolizada por el fermento.

Para que la lactosa se absorba a nivel intestinal, debe necesariamente hidrolizarse en sus monosacáridos constituyentes: glucosa y galactosa. En este proceso interviene la enzima β -galactosidasa (β -D-galactósido galacto-hidrolasa, E.C. 3.2.1.23), también conocida por su nombre trivial: lactasa. Esta enzima está anclada en las microvellosidades de la mucosa del intestino delgado y presenta una actividad máxima en el yeyuno y un nivel más bajo en el duodeno e íleon. Los monosacáridos se absorben activamente en el intestino delgado. Luego, la galactosa se convierte en glucosa en el hígado por la vía Leloir, que involucra tres enzimas (galactoquinasa, galactosa-1-fosfato uridiltransferasa y uridina-difosfogalactosa-4-epimerasa). La pérdida de actividad de la β -galactosidasa o un bajo nivel de la enzima provoca que la lactosa no se absorba correctamente y por lo tanto que llegue al colon sin degradarse, lo que ocasiona diversos síntomas, englobados en los que se conoce como 'intolerancia a la lactosa'. Por otro lado, la deficiencia de alguna de las enzimas involucradas en la digestión de la galactosa produce galactosemia.

En particular, la intolerancia a la lactosa describe la presencia de síntomas gastrointestinales como diarrea, dolor abdominal, calambres, hinchazón, formación de gases (flatulencia), náuseas y pérdida de apetito. Los estudios han demostrado que la digestión de la lactosa mejora con la ingesta de yogur en comparación con la de leche. Si bien los mecanismos implicados en este

aspecto no están claros, se cree que esta mayor absorción se debe en parte a la producción de β -galactosidasa por las bacterias viables del fermento. Otro mecanismo sugiere que la estructura del yogur promueve una mejor digestibilidad de la lactosa (Marco et al., 2017; Perotti et al., 2012). Sin embargo, en casos severos de intolerancia a la lactosa, incluso el yogur puede no ser bien tolerado. Por ello, existen en el mercado productos lácteos (leche, yogur, quesos) bajos o reducidos en lactosa. Se entiende por alimento de contenido bajo en lactosa y de contenido reducido en lactosa, a aquellos alimentos en los que se restringen los ingredientes que contienen lactosa, en los que se separa la lactosa del alimento, en los que se descompone la lactosa, o una combinación de estos u otros procesos tecnológicos adecuados. El alimento de bajo contenido de lactosa no contendrá más de 5% de la proporción de lactosa del alimento corriente correspondiente, listo para el consumo. El alimento de contenido reducido de lactosa no contendrá más del 30% de la proporción de lactosa del alimento corriente correspondiente, listo para el consumo. El alimento libre de lactosa o sin lactosa o deslactosado o cero lactosa o 0% lactosa, no contendrá más de 100 mg de lactosa por cada 100 g ó 100 mL de alimento listo para el consumo (CAA, 2021).

Lípidos

Otro componente del yogur son los lípidos. La grasa láctea consiste en un 95-96% de triglicéridos, y la fracción restante conformada por diglicéridos, monoglicéridos, fosfolípidos, colesterol y ácidos grasos libres, estos últimos en muy baja proporción. Los ácidos grasos (AG) son mayoritariamente saturados (65-70%), seguidos por monoinsaturados (23-25%) y poliinsaturados (5%). Una particularidad de la grasa láctea es que presenta AG saturados de cadena corta (C4-C8, en un 7-8%); también de cadena media (C10-C12, 5%) y de cadena larga (C14-C18, 84-85%). Al igual que otras grasas naturales, los AG insaturados son en su mayoría de configuración *cis*. También presenta aprox. 3,9% de AG insaturados con configuración *trans*, con uno o más dobles enlaces. El principal es el ácido vaccénico (C18:1 11t) (Chandan, 2006; Lindmark Månsson, 2008; MacGibbon y Taylor, 2006).

Es frecuente asumir que el consumo de grasa láctea tendría efectos negativos para la salud, principalmente por el aumento de colesterol en plasma sanguíneo luego del consumo de leche o productos lácteos enteros. Sin embargo, no ha sido posible establecer una relación directa y significativa entre el consumo de productos lácteos y la prevalencia de enfermedades coronarias. Estudios de cohorte han demostrado un incremento del nivel de colesterol HDL (lipoproteína de alta densidad, conocida como colesterol bueno), reducción de la presión arterial, reducción del riesgo de enfermedad coronaria, infartos y diabetes. También se ha encontrado una asociación inversa entre la incidencia de cáncer de colon y el consumo de productos lácteos (Elwood et al., 2010; O'Sullivan et al., 2020). Se han realizado numerosos estudios para conocer los efectos específicos de los distintos AG presentes en la leche en la salud. Los AG insaturados con

configuración *cis* generalmente se asocian con beneficios a la salud, mientras que los AG saturados tienen efecto neutro o son perjudiciales (vinculados principalmente a enfermedades cardiovasculares, aumento de colesterol, etc.) (Chen et al., 2014).

Entre los AG saturados se ha observado que el ácido butírico (C4:0) es un regulador de la función génica y también participa en la prevención de algunos tipos de cáncer; los ácidos caprílico (C8:0) y cáprico (C10:0) presentan actividad antiviral, y en particular el caprílico retrasa el crecimiento de tumores; el ácido láurico (C12:0) presenta propiedades antibacterianas y antivirales y podría actuar como agente anticariogénico y en la prevención de la formación de placas de ateroma; por su parte, el ácido esteárico (C18:0), no ha mostrado incrementar el colesterol sérico y es considerado no aterogénico. Por otro lado, los ácidos mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0) contribuirían en el aumento del colesterol y del índice de aterogenicidad, que se emplea como indicador para medir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Fernández-Macías et al., 2019; Haug et al., 2007).

Entre los AG insaturados, el que se encuentra en mayor concentración en la leche es el ácido oleico (C18:1 9c). Los AG monoinsaturados se consideran beneficiosos para la salud, ya que dietas altas en ellos redujeron el colesterol plasmático, el colesterol LDL (lipoproteína de baja densidad, conocida como colesterol malo) y los triglicéridos en sangre. El ácido linoleico (C18:2 9c, 12c, ω -6) y el α -linolénico (C18:3 9c, 12c, 15c, ω -3) son los AG poliinsaturados más representativos de la leche. Estos AG son esenciales, es decir que deben ser incorporados con la alimentación, y son precursores de otros AG con 20 átomos de carbono, como el ácido araquidónico (C20:4 ω -6). A su vez, el ácido araquidónico es el precursor de los denominados eicosanoides mediante la acción de distintas enzimas, y actúan como mediadores en diferentes sistemas del organismo. Frente a situaciones patológicas, estos compuestos incrementan su producción en respuesta a los procesos inflamatorios (Cantú et al., 2017).

Por otra parte, los productos lácteos son fuente de ácido linoleico conjugado (CLA), grupo de isómeros posicionales del ácido linoleico, siendo el ácido ruménico (C18:2 9c, 11t) el más representativo, cuyos efectos positivos en la salud han sido ampliamente discutidos. Algunos estudios demuestran que el CLA podría modular la concentración plasmática de lípidos tanto en modelos humanos como animales, y en modelos animales se ha demostrado un efecto anticarcinogénico (Haug et al., 2007). También se ha señalado la participación de este compuesto en la reducción de la grasa corporal y en el aumento de la masa muscular, la prevención de arterioesclerosis, la estimulación del sistema inmune y posiblemente una acción antioxidante (Abbas et al., 2014; Hur et al., 2007; Pariza, 1999).

Respecto a la incidencia de la grasa de la dieta en la obesidad y el sobrepeso, los resultados publicados son contradictorios (Mulet-Cabero y Wilde, 2021). Algunos estudios sugieren un efecto protector del consumo de lácteos sobre el riesgo de sobrepeso y obesidad, aunque la evidencia todavía no es concluyente (O'Sullivan et al., 2020). La grasa es el macronutriente que

más calorías provee por gramo (9 kcal/g vs. 4 kcal/g de azúcares y proteínas). Durante la digestión, los AG con cadenas menores a 12 átomos de carbono se absorben en el intestino, pasan a la circulación y alcanzan el hígado donde son oxidados, produciendo energía. Por el contrario, los AG de cadena larga son utilizados para re-sintetizar triglicéridos, para lo cual se empaquetan en quilomicrones, pasan a la circulación y son transportados a los tejidos periféricos para su utilización o almacenamiento en el tejido adiposo, contribuyendo a la ganancia de peso corporal. Recientemente se realizó un meta-análisis de estudios observacionales publicados entre 2016 y 2020, sobre la asociación entre el consumo de leche y sus derivados, y el sobrepeso u obesidad en niños y/o adultos sanos. De los 17 estudios identificados, 12 encontraron una asociación inversa entre consumo de lácteos y sobrepeso u obesidad y 4 reportaron una asociación principalmente neutra. Solo un estudio reportó asociaciones positivas en relación con el consumo de algunos lácteos específicos (Fuentes et al., 2021). En un metaanálisis y revisión sistemática de estudios de cohorte publicados hasta abril de 2021, se halló una disminución del riesgo de sobrepeso y obesidad del 25%, 7% y 12% frente al consumo de 200 g/día de productos lácteos (total), productos lácteos altos en grasa y de leche, respectivamente. En particular, para el yogur se detectó una disminución del riesgo de sobrepeso y obesidad del 13% al incrementar el consumo de yogur en 50 g/día (aunque no se especifica el tipo y características del yogur) (Feng et al., 2022). Se ha propuesto que la asociación positiva entre el consumo de productos lácteos (entre ellos, el yogur) y la mejora en el perfil lipídico (disminución en el nivel de colesterol total y LDL) podría vincularse a la presencia de calcio en las matrices lácteas. Aunque los mecanismos no están completamente dilucidados, se ha demostrado que el aumento de la ingesta de calcio se asocia con un incremento en la excreción de grasas en materia fecal, lo que sugiere que el calcio puede reducir la absorción de grasas en el intestino (Mulet-Cabero y Wilde, 2021). A pesar de que este efecto es considerado menor en términos de regulación del peso corporal, podría contribuir como una estrategia para la disminución del sobrepeso y obesidad.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. La causa fundamental de ambas condiciones es un desequilibrio energético entre las calorías consumidas y las gastadas, desencadenado por un aumento en la ingesta de alimentos de alto contenido calórico ricos en grasa y un descenso en la actividad física vinculado a los patrones laborales actuales, el acceso a los medios de transporte y la urbanización. El sobrepeso y la obesidad representan un importante factor de riesgo de enfermedades no transmisibles (ECNT), tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes, trastornos del sistema locomotor y algunos tipos de cáncer (OMS, 2021). En Argentina, según datos de la 4° Encuesta Nacional de Factores de Riesgo realizada en 2019, el porcentaje de la población que presenta sobrepeso y obesidad aumentó en las últimas 4 décadas y alcanzó el 61% en 2018 (INDEC, 2019).

Proteínas

Otro constituyente del yogur de enorme importancia nutricional son las proteínas, formadas por uniones de α -aminoácidos que conforman estructuras con diversas propiedades biológicas. La calidad nutricional de una proteína está relacionada principalmente con el contenido de aminoácidos esenciales y su digestibilidad (Bandyopadhyay et al., 2022).

En el caso de la leche, el nitrógeno total está distribuido mayoritariamente entre las caseínas y las proteínas de suero; también hay una fracción pequeña o minoritaria que representa el nitrógeno no proteico (5-6% del nitrógeno total) y es una fracción muy heterogénea constituida por amoníaco, urea, creatina, creatinina, ácido úrico, entre otros. Los cambios que ocurren en las proteínas de la leche durante la elaboración de yogur y la acidez producida provocan una mayor digestibilidad (Adolfsson et al., 2004). Además, la acción proteolítica ejercida por las bacterias durante la fermentación posibilita la formación de péptidos y liberación de aminoácidos. Los péptidos liberados han recibido particular interés debido a sus potenciales bioactividades como antihipertensiva, inmunomoduladora, hipolipemiante y una relación con la prevención de acumulación de grasa abdominal (Babio et al., 2017; Chourasia et al., 2022).

Desde un punto de vista nutricional, los aminoácidos se clasifican como indispensables (o esenciales), dispensables y condicionalmente indispensables (**Tabla I**). Los indispensables son aquellos que no pueden ser sintetizados por el organismo, por lo tanto, deben ser provistos por la dieta. Los dispensables son aquellos que el organismo puede sintetizar en cantidades suficientes en cualquier situación, mientras que los condicionalmente indispensables son los que el organismo normalmente puede sintetizar en cantidades suficientes, pero que deben proveerse en la dieta en condiciones particulares cuando su utilización es más rápida que su síntesis (Pellegrino et al., 2013).

Tabla I. Aminoácidos indispensables, dispensables y condicionalmente indispensables (Pellegrino et al., 2013).

Indispensables	Dispensables	Condicionalmente indispensables
Histidina	Alanina	Arginina
Leucina	Ácido aspártico	Cisteína
Isoleucina	Asparagina	Glutamina
Lisina	Ácido glutámico	Glicina
Metionina	Serina	Prolina
Fenilalanina		Tirosina
Treonina		
Triptófano		
Valina		

La leche contiene en sus proteínas a todos los aminoácidos indispensables (**Tabla II**).

Tabla II. Aminoácidos presentes en las proteínas de la leche (%) (McSweeney y Fox, 2003).

Aminoácido	Caseína	Proteína de suero
Ácido aspártico/Asparagina	7,1	10,5
Treonina	4,9	7,0
Serina	6,3	4,8
Ácido glutámico/glutamina	22,4	17,6
Prolina	11,3	5,9
Glicina	2,7	1,8
Alanina	3,0	4,9
Cisteína	0,34	2,3
Metionina	2,8	1,7
Valina	7,2	5,7
Isoleucina	6,1	6,4
Leucina	9,2	10,3
Tirosina	6,3	2,9
Fenilalanina	5,0	3,1
Triptófano	1,7	2,4
Lisina	8,2	8,7
Histidina	3,1	1,7
Arginina	4,1	2,3

La digestibilidad de una proteína se define como la proporción de nitrógeno ingerido que es absorbida durante la digestión en el organismo (nitrógeno absorbido / nitrógeno ingerido x 100) y el nitrógeno absorbido la diferencia entre el nitrógeno ingerido y el nitrógeno fecal (nitrógeno no absorbido, secreciones digestivas, descamación, nitrógeno producido por la microbiota intestinal). Sin embargo, la medición de la digestibilidad puede ser controversial, ya que la medición de nitrógeno fecal incluye en gran parte el nitrógeno producido por actividad de la microbiota intestinal. Por lo tanto, se considera que el valor más representativo es la digestibilidad del nitrógeno medido en el íleon (proveniente de la digestión de aminoácidos dietarios y de secreciones endógenas), aunque es una medición que presenta dificultades experimentales (FAO/OMS, 2011b).

Como ya se indicó, el tipo de aminoácidos presentes y la digestibilidad proteica, son indicadores de la calidad de una proteína y se emplean para calcular el DIAAS (*Digestible Indispensable Amino Acid Score*) (FAO/OMS, 2011b). El DIAAS (%) se calcula según: $100 \times [(mg \text{ de aminoácidos indispensables digeribles en } 1g \text{ de proteína en estudio}) / (mg \text{ de los mismos aminoácidos indispensables en } 1g \text{ de proteína de referencia})]$. La proteína de referencia no es una proteína alimentaria en particular, sino que está representada por el conjunto de aminoácidos indispensables que necesita incorporar una persona según su edad (**Tabla III**).

Las proteínas de la leche presentan un DIAAS > 100; sin embargo, este parámetro se trunca en un valor de 100, indicando que la leche posee el mayor nivel de aminoácidos indispensables digeribles.

Tabla III. Score de aminoácidos recomendado según grupo etario por día (FAO/OMS, 2011b).

Grupo etario	mg de aminoácidos requeridos/g de proteína								
	His	Ile	Leu	Lys	SAA	AAA	Thr	Trp	Val
0-6 meses	21	55	96	69	33	94	44	17	55
6 meses-3 años	20	32	66	57	27	52	31	8,5	43
>3 años, adolescentes y adultos	16	30	61	48	23	41	25	6,6	40

Micronutrientes

El yogur también aporta importantes micronutrientes tales como vitaminas y minerales. Contiene vitaminas liposolubles, principalmente vitaminas A, D, E y K, vitaminas del grupo B, tales como riboflavina (B2), tiamina (B1), ácido fólico (B9) y cobalamina (B12), y minerales como calcio (el cual se encuentra en un estado biodisponible), fósforo, potasio, magnesio, zinc,

entre otros (Hill, 2022). La absorción de los minerales no sólo depende del nivel en el cual se encuentren en el alimento, sino también de la biodisponibilidad.

La biodisponibilidad de un nutriente se define como la fracción que llega a la circulación sanguínea desde el tracto gastrointestinal, y que de esta manera se encuentra disponible para promover su acción dentro del organismo. La biodisponibilidad considera, además, la solubilidad de la forma química del nutriente. En particular, la acidez del yogur mejora la biodisponibilidad de los minerales, ya que a bajos valores de pH los mismos están en forma iónica o solubles, lo que facilita su absorción intestinal (Adolfsson et al., 2004; Delisle et al., 1995; Singh y Muthukumarappan, 2008).

El yogur se considera una excelente fuente de calcio no solo por la cantidad que contiene, sino también porque los constituyentes de esta matriz favorecen su absorción. El calcio es ionizado en el estómago, y una vez que llega al intestino delgado interacciona con otros componentes de la dieta, formando complejos cuya solubilidad modificará su absorción: las proteínas, algunos péptidos como los caseino-fosfopéptidos, el ácido cítrico, la lactosa y ciertos aminoácidos básicos forman complejos solubles que la favorecen, mientras que los oxalatos, los fitatos, los AG de cadena larga, los fluoruros y los fosfatos forman complejos insolubles que se excretan en las heces, por lo que la disminuyen. La mayor parte de la absorción se produce en el duodeno, porque las sales de calcio son más solubles en solución ácida. La absorción intestinal ocurre de dos maneras: por transporte activo, contra gradiente de concentración, que se lleva a cabo en el duodeno y en el yeyuno proximal, controlada por la acción de la vitamina D, y por difusión iónica pasiva, no-saturable e independiente de la vitamina D, que se realiza en el resto del intestino (Sbodio, 2004).

Por otra parte, existe evidencia de una asociación inversa entre la ingesta de calcio y la obesidad, el colesterol total y la presión sanguínea (Barba y Russo, 2006; Torres et al., 2011; van Mierlo et al., 2006). En efecto, el consumo suficiente de calcio también se ha propuesto como un factor de regulación del peso corporal, reduciendo la lipogénesis y estimulando la lipólisis y la oxidación lipídica (Major et al., 2008).

Otros estudios sobre los beneficios del yogur en la nutrición se han centrado en su rol en la saciedad, y en consecuencia en la ingesta de alimentos, y en los valores de glucemia. En este sentido, el contenido y tipo de carbohidratos, de proteínas y de grasas, son determinantes de la saciedad, la ingesta y las respuestas de la glucemia y la insulinemia (Bowen et al., 2006). La lactosa contribuye a disminuir la glucemia en mayor medida que otros azúcares o almidón; es decir, yogures que no contienen azúcares agregados presentan un índice glucémico bajo (Panahi y Tremblay, 2016). Las proteínas proveen mayor saciedad que los carbohidratos y las grasas (Morell y Fizmann, 2017). Las dos fracciones proteicas mayoritarias del yogur (caseínas y proteínas de suero) disminuyen la ingesta de alimentos a corto plazo y participan en la regulación metabólica por la estimulación de hormonas que regulan el apetito y la utilización de glucosa

(insulina, péptido tipo glucagón, péptido tirosina-tirosina, colecistoquinina y grelina). Además, a estos efectos se suman aquellos promovidos por algunos péptidos producidos por actividad proteolítica del fermento durante la fermentación. Por otra parte, la estructura semisólida del yogur y su viscosidad, producto de la coagulación proteica durante la fermentación, influye en la manera en la que los nutrientes son digeridos, liberados de la matriz alimentaria y absorbidos, sobre todo en el tiempo que se requiere para que estos nutrientes estén disponibles (Panahi y Tremblay, 2016).

El consumo regular de yogur también ha demostrado aportar microorganismos vivos que contribuyen a la composición de la microbiota intestinal. La microbiota intestinal, antes denominada flora intestinal, es el conjunto de microorganismos que se hospedan en el intestino grueso, llevando a cabo numerosas funciones importantes para nuestra salud, como la fermentación de la fibra de los alimentos, la producción de vitaminas, la estimulación del sistema inmune, la prevención de infecciones intestinales, la regulación y/o modulación de numerosas funciones metabólicas, entre otras (Marco et al., 2017). Una fracción importante de los microorganismos presentes en el yogur (10^6 - 10^9 ufc/g) sobreviven a las condiciones del sistema digestivo humano, llegan viables al intestino grueso y son capaces de aportar enzimas y otros metabolitos al mismo (Marco et al., 2017). Diversas investigaciones sugieren que el consumo sostenido de yogur podría tener un impacto positivo en la composición de la microbiota intestinal (aumento de la diversidad microbiana, aumento de especies bacterianas intestinales benéficas, disminución de potenciales microorganismos patógenos) y en parámetros sanguíneos (glucemia, insulinemia, dislipemia, proteína C reactiva). Por ejemplo, en un estudio realizado entre consumidores (200-400 g/día, consumo regular diario) y no consumidores de yogur, se encontró mayor presencia de *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* en las heces de los consumidores de yogur, en niveles que fueron asociados con efectos benéficos en la salud, respecto a los no consumidores. También se detectó un menor número de enterobacterias, incluyendo patógenas, en las heces de consumidores de yogur respecto a los no consumidores, indicando que los microorganismos presentes en el yogur pueden modificar positivamente la composición de la microbiota intestinal (Alvaro et al., 2007). Del mismo modo se ha reportado una relación positiva entre el consumo de yogur y la disminución en la frecuencia y duración de diarreas (principalmente en niños), disminución de la constipación y distensión abdominal, prevención y/o efectos terapéuticos de la enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer de colon (en modelos animales), y un probable efecto benéfico en la erradicación de *Helicobacter pylori* (causante de desórdenes en la parte alta del sistema digestivo como gastritis) (Adolfsson et al., 2004).

Aunque la dieta es uno de los factores principales en la composición y actividad de la microbiota intestinal, en los últimos años también se ha propuesto que el estilo de vida, el estrés fisiológico (actividad física extrema y alteraciones en el sueño) y psicológico (relativo a las emociones), la actividad física regular, el consumo de medicamentos, la calidad del aire, la

contaminación y el hábito de fumar, también tendrían una influencia importante (Redondo-Useros et al., 2020).

III. Mercado de yogur. Escenario mundial y en Argentina.

La producción industrial de leches fermentadas ha evolucionado mucho, tanto a nivel mundial como en nuestro país. Se han estandarizado los procesos en vistas a obtener productos con calidad constante, con mayor vida útil y también para mantener su tipicidad. Además, la aplicación de modernas tecnologías y la obtención y empleo de nuevos ingredientes y fermentos con propiedades nutricionales, funcionales y tecnofuncionales específicas, ha conducido a que el *portfolio* de productos que se comercializan sea cada vez más amplio y novedoso.

El yogur es una de las leches fermentadas más populares a nivel nacional y mundial (Observatorio de la Cadena Láctea Argentina -OCLA- 2023; Tamime, 2002). Su mercado es muy complejo y diverso, y depende de varios factores tales como las preferencias de los consumidores y del sector al que se destine, los cambios en el estilo de vida de la población, las modificaciones en la dieta, y el mayor interés por la salud y el acceso a una alimentación saludable. Esto ha motivado el lanzamiento de nuevos productos para satisfacer esta creciente demanda. En nuestro país, el yogur se consume en el desayuno, en la merienda o se incorpora a la dieta como una colación, a diferencia de lo que sucede en otros países, en los que el yogur natural, por ej., se lo emplea como ingrediente para la preparación de platos salados, ensaladas, etc.

El tamaño del mercado de yogur a nivel mundial representó U\$S127 billones en 2024 y se espera que alcance U\$S200 billones para 2033 (pronosticando un 5,4% de incremento en ese lapso). Actualmente, Europa domina el mercado mundial, con una cuota de mercado del 33,6% en el 2024 (Imarc, 2025). En el continente americano, Estados Unidos lidera la comercialización. Las tendencias de crecimiento del mercado segmentado por región, posiciona a África en primer lugar y a América del Sur en segunda posición, con una tasa de crecimiento estimada en 7,6% y 6,2%, respectivamente, para el período 2023-2029 (Mordor Intelligence, s. f.).

Según datos recopilados por el OCLA, el 3,6% de la producción total de leche en Argentina se destinó a la elaboración de yogur y leches fermentadas en 2024 (OCLA, 2024). Este dato se calcula en base a las empresas que procesan más de 60.000 L diarios, englobando 45 empresas que representan entre el 75 y 80% de la producción total de leche del país; el 20-25% restante no se tiene en cuenta en este cálculo, y corresponde a empresas más pequeñas cuya producción se destina mayoritariamente a la elaboración de quesos (OCLA, 2022). En cuanto al consumo de yogur, en 2023 fue de 25 kg per cápita, y también se espera un crecimiento del mercado entre los años 2025 y 2034, proyectando una tasa del 8,3% (EMR, 2024). El mayor caudal de información sobre el destino de la producción lechera corresponde al año 2022, como se muestra en la **Fig. I**.

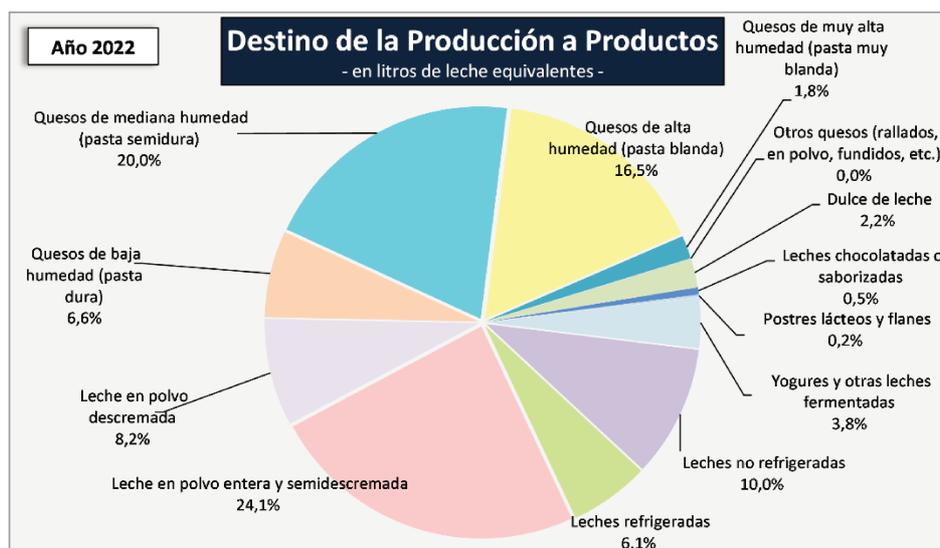


Fig. I. Destino de la producción de leche en Argentina (OCLA, 2023).

Diferentes variedades están al alcance del consumidor en nuestro país. En relación al contenido de materia grasa pueden ser enteros, parcialmente descremados o descremados. Existen productos con agregado de ingredientes de diferente naturaleza, por ej. con agregado de sacarosa o de edulcorantes no nutritivos (sucralosa, stevia, entre otros), con aromatizantes/saborizantes, y/o con agregado de frutas en diferentes formatos: trozos, pulpas, jugos. Todas estas variedades se pueden presentar con diferente consistencia o textura: bebible, batido y firme (Chandan, 2017; Tamime, 2002). También están las versiones naturales, es decir sin ningún agregado, que no son muy populares en nuestro país. El consumidor argentino se inclina hacia productos dulces, saborizados, a diferencia de consumidores europeos, que prefieren productos menos dulces y más ácidos.

Entre los últimos productos que se han lanzado al mercado se tienen los yogures con agregados que aportan o incrementan su funcionalidad, tales como aquellos con agregado de bacterias probióticas y con sustancias prebióticas (inulina, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos - GOS-, etc.) (Fazilah et al., 2018). Hay bibliografía que contempla dentro del concepto de yogur funcional a los adicionados de vitaminas y minerales, los reducidos o bajos en lactosa, y también los reducidos o bajos en grasa, y aquellos con agregado de compuestos/sustancias bioactivas (fibras, lípidos bioactivos, péptidos bioactivos, etc.) (Pontonio et al., 2020).

El CAA establece en el Art. 1389 la definición de probióticos, como “microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del consumidor...”, y en el Art. 1390 la definición de “prebiótico” como el “ingrediente alimentario o parte de él (no digerible) que posee un efecto benéfico para el organismo receptor, estimulando el crecimiento selectivo y/o actividad de una o de un número limitado de bacterias en el colon y que confiere beneficios para su salud”. Las definiciones más actuales para estos conceptos fueron establecidas mediante un consenso de expertos por la *International Scientific Association for*

Probiotics and Prebiotics (ISAPP); siendo los ‘probióticos’ microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del huésped (Hill et al., 2014); y un ‘prebiótico’ un sustrato que es selectivamente utilizado por los microorganismos del huésped confiriendo un beneficio a la salud (Gibson et al., 2017).

El interés del consumidor por los alimentos saludables, lo ha llevado a familiarizarse con la información que proveen los rótulos de los alimentos envasados. También se ha promovido el uso de menos ingredientes en la formulación de los alimentos, el empleo de ingredientes que sean conocidos o familiares para el consumidor, y/o el uso de menos aditivos y alérgenos, lo que se conoce como *clean label* o etiqueta limpia. El término fue acuñado en la década del 80 cuando los consumidores comenzaron a evitar los números E (INS en nuestro país), que aparecen en la lista de ingredientes del rótulo de los alimentos, con los que se identifican los diferentes aditivos alimentarios, por su asociación con efectos negativos para la salud que se atribuyen a muchos de ellos. Sin embargo, el uso del término etiqueta limpia alcanzó mayor popularidad hace diez años (Díaz de Apodaca, 2018). Si bien no hay una regulación o definición legal del término etiqueta limpia, en general los consumidores lo asocian con varios conceptos, tales como ‘natural’ (sin aditivos artificiales o ingredientes con nombres químicos), ‘simples’ (mínimamente procesados, con una lista concisa de ingredientes reconocibles) y ‘transparentes’ (ingredientes que provengan de fuentes sustentables) (Patel et al., 2020).

Sin embargo, desarrollar alimentos con etiqueta limpia representa un verdadero desafío para la ciencia y la tecnología de los alimentos ya que se necesita comprender la química, las propiedades y la tecnofuncionalidad de los componentes o ingredientes para poder plantear su eliminación o reemplazo en la matriz alimentaria sin comprometer la calidad organoléptica (color, olor, sabor, textura), la estabilidad, vida útil y seguridad alimentaria. También hay que considerar el costo de producción y el precio de venta del alimento y los procesos legales especialmente para nuevos ingredientes o aditivos (Díaz de Apodaca, 2018).

Es en este contexto que la formulación de yogures con propiedades funcionales y nutricionales incrementadas (altos en proteína, reducidos en grasa y en lactosa, y con sustancias prebióticas) pueden ajustarse fácilmente a este concepto de etiqueta limpia si se utiliza en su formulación solo ingredientes lácteos. De hecho, están disponibles en el mercado ingredientes lácteos basados en proteínas de suero que se han desarrollado como una alternativa *clean label* a los estabilizantes convencionales, permitiendo crear texturas personalizadas sin la necesidad de agregar otros aditivos (Arla Foods Ingredients, 2023). Yogures con estas características son prácticamente ausentes en el mercado argentino.

IV. Tecnología de elaboración de yogur

En términos fisicoquímicos, el yogur es un gel ácido producido por la interacción y precipitación de las proteínas lácteas durante la fermentación (Karam et al., 2013). El contenido promedio de proteínas de la leche bovina es de 3,4 g/100 mL. Las caseínas representan el 80% y las proteínas de suero el 20% del total de proteínas, es decir, la relación caseínas (CN): proteínas de suero (WP) es de 4:1. Ambas fracciones, caseínas (α S1, α S2, β y κ) y proteínas de suero (α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, albúmina sérica, inmunoglobulinas y proteosa-peptona), están implicadas en la formación del gel de yogur. En las **Tablas IV y V** se presentan la composición y características de ambos grupos de proteínas.

Tabla IV. Composición y características de las caseínas (Chandan, 2006).

Caseínas	% del total de caseínas	Nº de residuos de aminoácidos	Grupos fosfato	Peso molar aprox. (Da)	Punto isoeléctrico (pH)
α S1-caseína	38	199	8	23164	4,1
α S-caseína	10	207	10-13	25388	4,1
β -caseína	35	209	5	23983	4,5-5,3
κ -caseína	13	169	1	19038	4,1-4,5

Tabla V. Composición y características de las proteínas de suero (Chandan, 2006).

Proteínas de suero (WP)	% del total de WP	Nº de residuos de aminoácidos	Peso molar aprox. (Da)	Punto isoeléctrico (pH)
β -lactoglobulina	7-12	162	18277	5,2
α -lactoalbúmina	2-5	123	14175	5,1
Albúmina sérica	0,7-1,3	582	69000	4,8
Inmunoglobulinas	1,9-3,3	-	150000-1000000	4,6-6,0
Proteosa-peptona	2-6	-	4000-40000	3,7

En general, se recomienda aumentar el contenido de sólidos totales (ST) de la leche para conseguir un producto con mayor viscosidad y mejor retención de suero (menor sinéresis) (Chandan, 2017). El contenido de ST puede oscilar desde 8 g/100 g en un yogur descremado hasta 20-22 g/100 g en un yogur concentrado (Lee y Lucey, 2010). Varias tecnologías se pueden aplicar para lograr este objetivo, tales como evaporación bajo vacío, concentración por membranas y agregado de ingredientes lácteos y no lácteos. Este último método es uno de los más utilizados.

La leche en polvo (SMP) es el ingrediente más frecuentemente empleado y su adición produce un aumento en la viscosidad y fuerza del gel. El nivel de agregado recomendado es 2-4 g/100 g y se considera que con 2 g/100 g se consigue una mejora en la textura del yogur. Niveles mayores

(6 g/100 g) se asocian con sabor a polvo y excesiva acidez en el producto final por la elevada producción de ácido láctico (como consecuencia del elevado nivel de lactosa de la mezcla de partida) (Karam et al., 2013). Otros ingredientes lácteos, generalmente en polvo, que pueden ser empleados incluyen los basados en proteínas de suero como concentrados (WPC), aislados (WPI), hidrolizados (WPH), microparticulados (MWP), o los basados en caseínas como concentrados (caseína micelar) y caseinatos y también los concentrados de proteínas de leche (MPC).

Por su parte, en algunas variedades de yogur se incluyen en la formulación varios ingredientes no lácteos, como se mencionó. La sacarosa, edulcorante nutritivo, es uno de los más utilizados para la variedad de yogur endulzado. Su agregado aumenta en gran medida los ST ya que se incorpora en grandes cantidades (8-13 g/100 g en yogures saborizados) a la mezcla base. El límite recomendado es de 10-11 g/100 g, ya que mayores niveles podrían ejercer un efecto inhibitorio del fermento. La sacarosa se emplea en forma sólida o como jarabe, siendo el formato sólido el más comúnmente utilizado. En general, se incorpora antes del tratamiento térmico para asegurar la inocuidad y lograr una consistencia adecuada. En caso de agregar sacarosa post fermentación, se aconseja que sea en forma de jarabe y que el mismo esté pasteurizado (Chandan, 2006).

Otros ingredientes no lácteos usualmente empleados son los espesantes/estabilizantes, que cumplen la función de mejorar la consistencia, aumentar la viscosidad, minimizar la separación de suero reteniendo más agua, y mantener la estructura del gel luego de la agitación, bombeo y enfriamiento (Chandan, 2006). Los permitidos por el CAA fueron mencionados anteriormente. En particular, la gelatina no se utiliza sola, a menos que se combine con otros estabilizantes, principalmente almidón modificado y/o pectina, para evitar una consistencia gelatinosa en el yogur firme, o la aparición de grumos indeseados en el yogur batido (Chandan, 2006). Varios hidrocoloides cumplen con esta función. Los hidrocoloides alimentarios pueden definirse como polímeros de cadenas de alto peso molecular que se caracterizan por su propiedad de formar dispersiones viscosas y/o geles cuando se mezclan con el agua. Se pueden obtener de diversas fuentes que incluyen plantas, algas y microorganismos.

En la **Fig. II** se presenta el esquema del proceso tradicional de elaboración de yogur, de estilo firme y batido (Tamime, 2002). El primer paso es la preparación de la leche base (o mezcla de partida) que en general involucra ajustar el contenido de ST y/o estandarizar el contenido de grasa, y también incorporar los ingredientes en polvo que se integran a la mezcla mediante agitación mecánica para obtener una mezcla homogénea. Luego la leche base se homogeneiza. Este proceso provoca modificaciones fisicoquímicas principalmente en la fracción grasa, previniendo su separación y formación de una línea de crema (defecto que se debe evitar en yogures enteros). También, la homogeneización garantiza la correcta dispersión de los ingredientes, reduce la separación de suero y contribuye a eliminar el oxígeno de la mezcla favoreciendo la acción de los microorganismos que componen el fermento, que, al ser anaerobios facultativos, prefieren para su crecimiento y metabolismo ambientes con baja o nula concentración de oxígeno disuelto

(Horiuchi y Sasaki, 2012). Posteriormente se aplica un tratamiento térmico, típicamente de 80-85 °C/30 min o 95 °C/5 min, con el objetivo de desnaturalizar las proteínas de suero (en general entre 80-85%), además de garantizar la inocuidad, eliminar el oxígeno disuelto y otros gases, etc. Temperaturas mayores a 75 °C producen, además de la desnaturalización de las proteínas de suero, la interacción entre estas proteínas desnaturalizadas con las caseínas a través de puentes disulfuro e interacciones hidrofóbicas, la interacción entre WP-WP y la disociación parcial de las micelas de caseína (principalmente κ -caseína). Este proceso en general conduce a la obtención de geles con mayor capacidad de retención de agua, mayor viscosidad y mejor textura respecto a geles sin un tratamiento térmico tan intenso (Chandan, 2017).

La leche base tratada térmicamente se enfría hasta la temperatura de fermentación (40-45 °C). El fermento o cultivo *starter*, compuesto por *S. thermophilus* y *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* se inocula en la leche. El fermento es el encargado de iniciar y conducir la fermentación, produciendo los cambios necesarios en los componentes presentes en la leche base para alcanzar el cuerpo, textura y *flavor* deseados en el yogur. Además, cumple la función de preservar el producto evitando la proliferación de microorganismos adventicios y retardando o inhibiendo la actividad de microorganismos patógenos. Como fue mencionado previamente, la principal función del fermento es la producción de ácido láctico por el metabolismo de la lactosa; esto causa un decrecimiento gradual del pH que provoca la desmineralización de las micelas de caseínas y la pérdida de organización micelar, conduciendo a la desestabilización y agregación del complejo proteico. El comienzo de la gelificación en las leches que han sufrido tratamientos térmicos intensos como el del yogur se produce al punto isoeléctrico de las proteínas de suero (pH~5,0-5,5), ya que prácticamente toda la β -lactoglobulina desnaturalizada se encuentra enlazada a la κ -caseína, cubriendo la superficie de las micelas (Lucey, 2020). El pH utilizado comúnmente como punto final de la fermentación es ~4,6, el cual se debe alcanzar sin perturbar la matriz láctea para no generar defectos de textura (Chandan, 2006). En la **Fig. III** se presenta un esquema de la formación del gel durante la fermentación de yogur. Una vez alcanzado dicho pH, el yogur se enfría para restringir el crecimiento y la actividad metabólica del fermento, y detener la fermentación. La velocidad de enfriamiento debe ser continua pero no muy rápida ya que esto podría generar cambios en la estructura (textura y sinéresis) del yogur. Se recomienda alcanzar 18-20 °C dentro de la primera hora de enfriamiento. En el caso del yogur batido, junto con el enfriamiento también se lleva a cabo la agitación, que no debe ser muy prolongada ni intensa especialmente en yogures naturales (Chandan, 2017). Por su parte, para obtener yogur firme, la leche inoculada se fermenta y enfría directamente en el recipiente en el cual será comercializado sin perturbar el gel en ningún momento del proceso (Chandan, 2017).

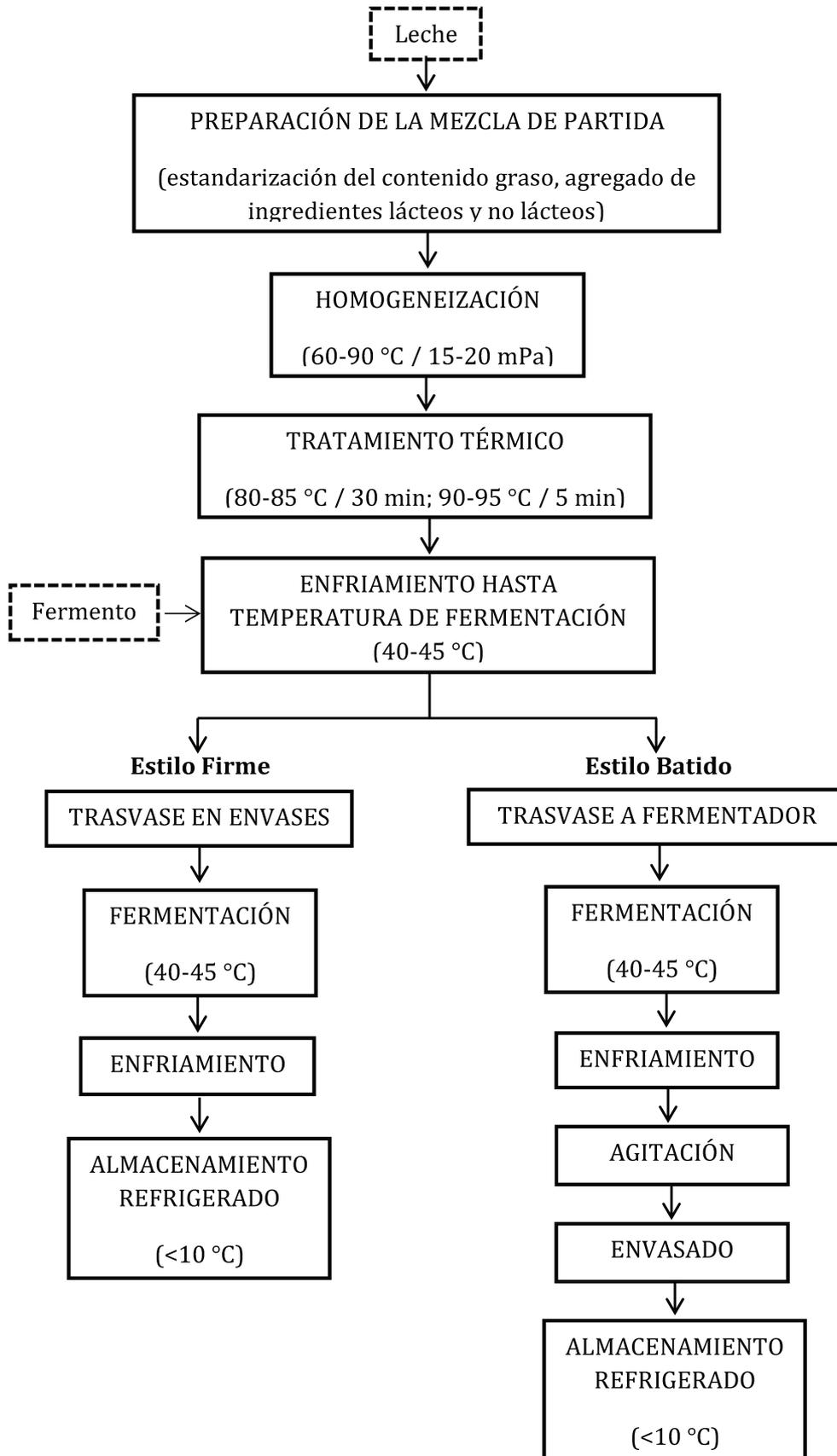


Fig. II. Protocolo genérico de elaboración de yogur (estilo firme y batido).

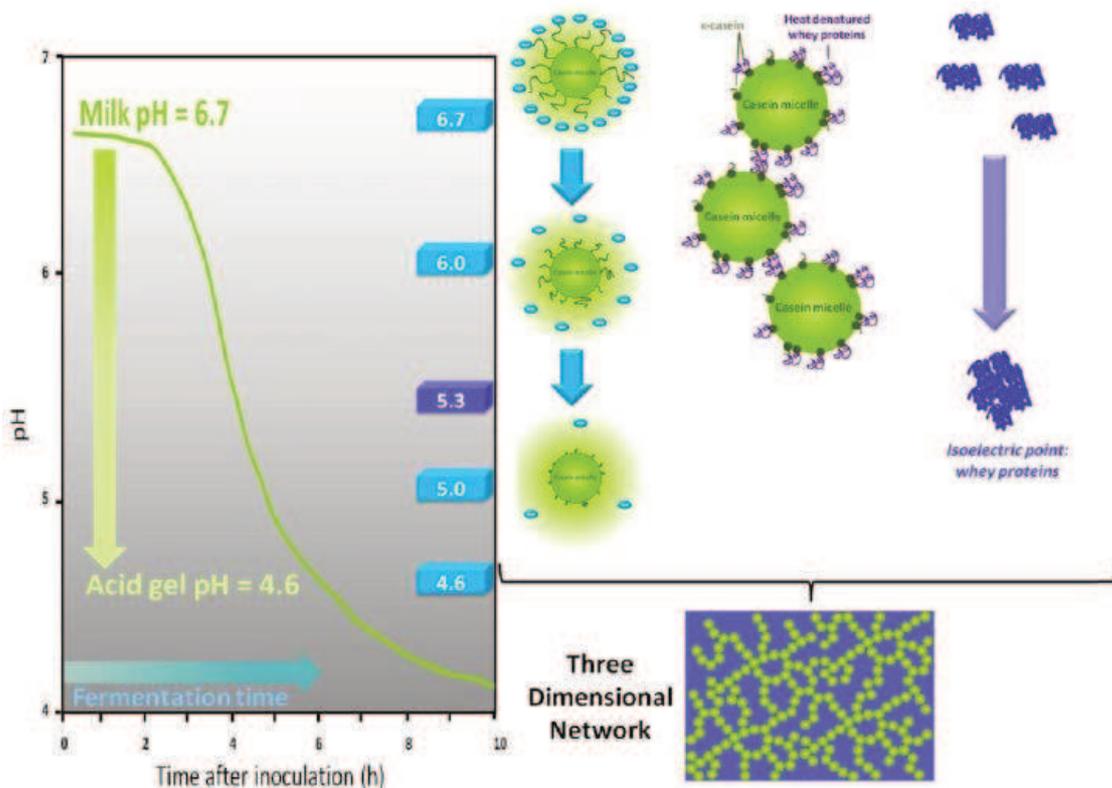


Fig. III. Esquema del proceso de formación del gel durante la fermentación de yogur (Karam et al., 2013).

V. Estudio de la formación del gel y comportamiento reológico del yogur

Como se mencionó previamente, el yogur es un gel ácido que se forma por la interacción, agregación y precipitación del complejo proteico, debido a la acidificación producida por las bacterias del fermento. En la leche, las micelas de caseína se encuentran estabilizadas en la fase coloidal por dos mecanismos principales, que son las interacciones hidrofóbicas y la formación de nanoclusters de fosfato de calcio coloidal (CCP), mientras que las proteínas de suero se encuentran en solución (Lucey y Horne, 2018). El tratamiento térmico que se aplica a la leche de partida en la elaboración de yogur provoca la desnaturalización de las proteínas de suero y la interacción de las mismas con la κ -caseína, como se mencionó. Esto impacta en la formación del gel y el comportamiento reológico del yogur, lo que ha sido ampliamente estudiado (Lee y Lucey, 2006, 2010; Lucey, 2016; Lucey et al., 2022; Lucey y Singh, 1998; Peng, Horne, et al., 2009; Peng, Serra, et al., 2009; Ramaswamy y Basak, 1991; Robinson et al., 2006).

La reología es la rama de la física que estudia la deformación y el comportamiento de flujo de los materiales. La reometría es la técnica de medida aplicada para obtener parámetros reológicos (Mezger, 2006). Las técnicas reométricas pueden ser oscilatorias o rotacionales y permiten el uso de distintas geometrías, siendo las más comunes la de platos paralelos (PP), cono-plato y cilindros

concéntricos (CC). Las mismas se seleccionan dependiendo de las características de la muestra y del análisis que se desee realizar (Mezger, 2006).

Desde el punto de vista reológico, el yogur es un producto viscoelástico, es decir, presenta un comportamiento intermedio entre un líquido viscoso y un sólido elástico (Genovese et al., 2007). La metodología más difundida para el estudio de la formación del gel es la reometría oscilatoria de baja amplitud o de baja deformación (*Small Amplitude Oscillatory Rheometry* -SAOR-) en geometría de cilindros concéntricos por el comportamiento newtoniano de la leche de partida. La baja deformación se define como una deformación relativa de ~1% que no perturba el desarrollo de la formación del gel en la región viscoelástica lineal (donde el módulo complejo, que se definirá a continuación, es independiente del esfuerzo o la deformación aplicada) (Lee y Lucey, 2010). Para ello, la leche inoculada se introduce en el cilindro exterior (o copa del reómetro), el mismo se coloca en el peltier del reómetro con control de temperatura que se configura a 40-45 °C. El cilindro superior (o sonda de medición) se introduce en la copa. El instrumento puede controlar la velocidad (amplitud y frecuencia) a la cual se mueve el cilindro superior, y también puede registrar la fuerza requerida para operar la sonda de medición. Como el nombre de la técnica lo indica, el movimiento de la sonda es oscilatorio y se puede describir como una función sinusoidal entre la deformación (o el esfuerzo aplicado) y el tiempo de aplicación de dicha deformación (**Fig. IV**).

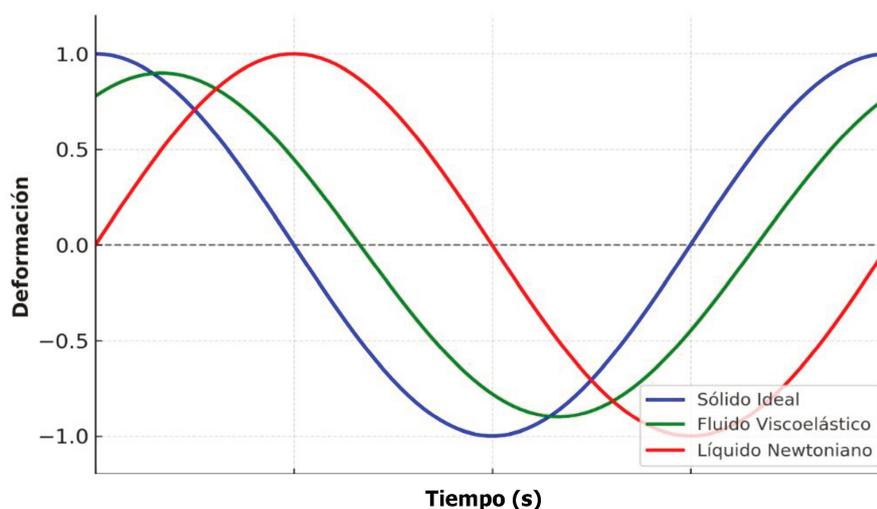


Fig. IV. Representación gráfica de la función sinusoidal del movimiento oscilatorio. Línea roja: líquido newtoniano; línea azul: sólido ideal; línea verde: fluido viscoelástico.

Matemáticamente, una deformación sinusoidal (γ) se expresa como:

$$\gamma = \gamma_0 \text{sen}(\omega t)$$

donde γ_0 es la amplitud de deformación, ω es la frecuencia de oscilación y t es el tiempo de aplicación.

El esfuerzo resultante de la deformación (τ) es:

$$\tau = \tau_0 \text{sen}(\omega t + \delta)$$

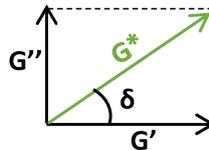
Donde τ_0 es el esfuerzo umbral y δ es el ángulo de fase.

Para un sólido elástico, $\delta=0^\circ$, y para un líquido viscoso $\delta=90^\circ$. Para los materiales viscoelásticos, $0^\circ < \delta < 90^\circ$, y para los fluidos viscoelásticos $45^\circ < \delta < 90^\circ$.

A partir del análisis por números complejos del movimiento oscilatorio se arriba a la definición del módulo complejo (G^*) que representa todo el rango viscoelástico:

$$G^* = \frac{\tau}{\gamma}$$

El módulo complejo está compuesto por el módulo elástico o de almacenamiento (G') y el módulo viscoso o de pérdida (G'') y su relación se puede observar claramente a partir de la representación trigonométrica:



De esta manera, se obtiene que:

$$G^* = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2}$$

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'}$$

La $\tan \delta$ también se conoce como tangente de pérdida.

El G' expresa la magnitud de energía almacenada por ciclo de deformación e indica las características de sólido (comportamiento elástico) de la muestra. El G'' indica la magnitud de energía que se pierde por disipación por cada ciclo de deformación y refleja las características de líquido (comportamiento viscoso) de la muestra. Se puede observar que cuando $G' < G''$, el aporte de G'' en G^* es mayor que el de G' y se puede decir que predomina el comportamiento de líquido viscoelástico; lo contrario sucede cuando $G' > G''$, donde predomina el comportamiento de sólido viscoelástico. Para el yogur batido y firme, en general se esperan valores de $G' > G''$ (Lee y Lucey, 2010).

Durante una fermentación de yogur, se pueden obtener curvas de G' , G'' y/o $\tan \delta$ vs. Tiempo de Fermentación o pH, como la que se muestra en la **Fig. V**. Los valores de G' aumentan durante la fermentación, dado por las interacciones entre las partículas proteicas, reordenamientos de la red proteica y posible adhesión de pequeñas cadenas proteicas a la red. También se puede observar que ocurre un máximo en la curva de Tangente de Pérdida vs. Tiempo de Fermentación. Esto ocurre en sistemas con caseínas y proteínas de suero que han sido sometidos a un tratamiento térmico. El máximo de la curva se interpreta como una pérdida parcial de la estructura original de las micelas de caseína, por la solubilización de CCP (en $\text{pH} \sim 5,0$), mientras que la disminución de la tangente de pérdida luego de este máximo puede deberse a la disminución de la repulsión electrostática y el aumento de las interacciones caseína-caseína enlazadas a la β -lactoglobulina, mientras el sistema se acerca a su punto isoeléctrico ($\text{pH} = 4,6$) (Lucey, 2004b). La solubilización del CCP provoca el aumento de la capacidad buffer del sistema, el aumento de la fuerza iónica del suero y la pérdida de la estructura micelar (Wilbanks et al., 2023).

Otra información importante que se obtiene de la curva G' vs. Tiempo de Fermentación es el punto en el cual comienza la gelificación, que ha sido definido como el momento en el que $G' \geq 1$ Pa. En una fermentación de yogur, donde la leche ha sufrido un tratamiento térmico lo suficientemente elevado como para producir la desnaturalización de las proteínas de suero y su precipitación sobre la κ -caseína, este punto coincide con un $\text{pH} \sim 5,5-5,0$, alrededor del punto isoeléctrico de la β -lactoglobulina (Lucey et al., 1998).

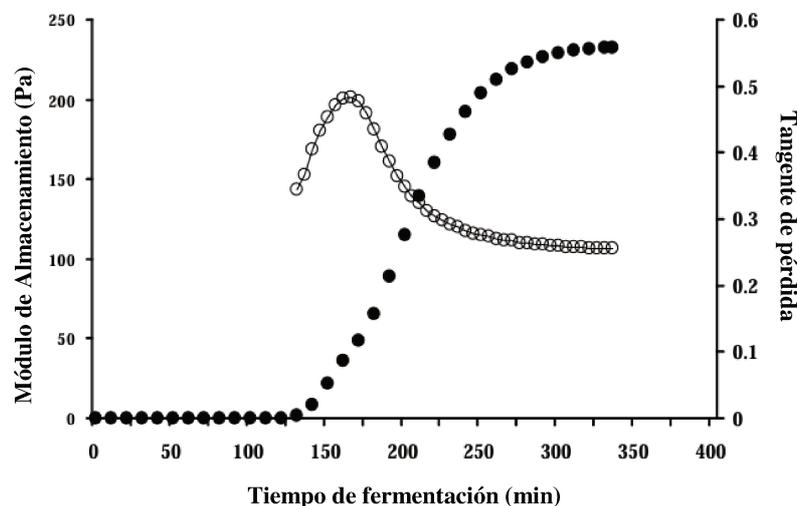


Fig. V. Curvas típicas de Módulo de Almacenamiento o G' (\bullet) y de Tangente de Pérdida (\circ) vs. Tiempo de Fermentación obtenidas por reometría oscilatoria durante una fermentación de yogur (Lee y Lucey, 2010).

Por otro lado, existe otro grupo de técnicas reométricas donde se aplican grandes deformaciones, en las que el reómetro se opera de manera rotacional. En un reómetro

convencional, se pueden realizar análisis a esfuerzo de corte controlado o a velocidad de corte controlada.

Algunos parámetros que se pueden estudiar mediante estas técnicas reométricas son el comportamiento de flujo y la viscosidad de los productos. La relación entre el esfuerzo de corte (σ) y la velocidad de corte (γ), permiten calcular la viscosidad (η):

$$\eta = \frac{\sigma}{\gamma}$$

En los materiales viscoelásticos, la viscosidad no es constante respecto a la velocidad de corte aplicada, por lo que se la denomina viscosidad aparente (η_a), a diferencia de los fluidos newtonianos, en los que la viscosidad es constante con el esfuerzo de corte y con el tiempo de aplicación del mismo.

A partir del ajuste matemático de los datos de las curvas de Esfuerzo de Corte vs. Velocidad de Corte, se pueden obtener parámetros relacionados al comportamiento de flujo del material estudiado. Los modelos matemáticos más empleados para yogur son:

$$\text{Ley de Potencia: } \sigma = k\gamma^n$$

$$\text{Herschel-Bulkley: } \sigma = \sigma_0 + k\gamma^n$$

$$\text{Casson: } \sigma^{1/2} = \sigma_0^{1/2} + \eta_{ap} \gamma^{1/2}$$

siendo σ : esfuerzo de corte; γ : velocidad de corte; η_{ap} : viscosidad aparente; n : índice de comportamiento de flujo; k : índice de consistencia y σ_0 : esfuerzo umbral (Rao, 1999) La principal diferencia entre la Ley de Potencia y los otros modelos es que esta no contiene un término que represente el esfuerzo umbral (es decir, el esfuerzo que necesita la muestra para comenzar a fluir). Dicho esfuerzo es esperable en productos que no han sido perturbados antes de la medición, o que tuvieron un tiempo suficiente de reestructuración entre la perturbación y el momento de la medición. Justamente, en yogures batidos se debe considerar que el paso de agitación resulta en una disminución de la viscosidad aparente y en una pérdida del esfuerzo umbral, que se recuperan solo parcialmente al finalizar la deformación en un proceso dependiente del tiempo (reestructuración) (Lee y Lucey, 2010).

VI. Estrategias para incrementar el contenido proteico en yogur

La tradición de producir leches fermentadas o yogures concentrados (o altos en proteínas) en países como Turquía, India, Grecia, Dinamarca y del Mediterráneo Oriental existe hace mucho tiempo. En cambio, en países como Estados Unidos, Canadá, países Nórdicos, Reino Unido,

Irlanda, Australia y Nueva Zelanda, su ingreso al mercado en forma de yogur griego es más reciente, observándose un incremento en el consumo en los últimos años (Jørgensen et al., 2019; Tamime et al., 2014). En Argentina, estas variedades son escasas y han sido lanzadas recientemente.

Específicamente, la tecnología para elaborar yogur griego requiere la separación de suero del producto ya fermentado, produciendo un incremento del contenido proteico. La manera tradicional de obtener este tipo de yogur es la filtración en bolsas de tela a 4 °C (*overnight*), aunque las condiciones resultan poco higiénicas y el producto no alcanza la vida útil esperada. Por este motivo, en la actualidad el drenaje del suero se realiza por ultrafiltración o por centrifugación (Chandan, 2006). La desventaja principal de este proceso es la generación de suero ácido, que requiere ser tratado para su disposición porque presenta una alta demanda biológica de oxígeno. Además, su bajo nivel proteico limita su utilización en alimentación animal, y el elevado contenido de minerales y ácido láctico dificulta recuperar la lactosa por cristalización (Valencia et al., 2018). Es por este motivo que las estrategias de concentración proteica previas a la fermentación resultan de interés (Jørgensen et al., 2019; Körzendörfer y Hinrichs, 2019).

Dentro de los métodos que se aplican antes de fermentar, uno de los más comunes consiste en formular la leche base con ingredientes conteniendo proteínas lácteas, como los mencionados anteriormente. Las diferencias composicionales de los ingredientes deben ser tenidas en cuenta a la hora de formular el alimento en cuestión (Kelly, 2018). De hecho, dependiendo el proceso empleado para incrementar proteína, se puede provocar un desbalance en la relación CN:WP respecto a la original de la leche (Zhao et al., 2016a). También se pueden tener distintos grados de desnaturalización proteica inherente al proceso de manufactura de los ingredientes. Todos estos aspectos pueden afectar en mayor o menor medida la fermentación, las características del producto y su calidad final. Además, la disponibilidad y el costo de los mismos puede influir en su aplicación a nivel industrial dependiendo de la región.

En la **Fig. VI** se presenta un esquema de ingredientes lácteos clasificados según el tipo de proteínas que contienen.

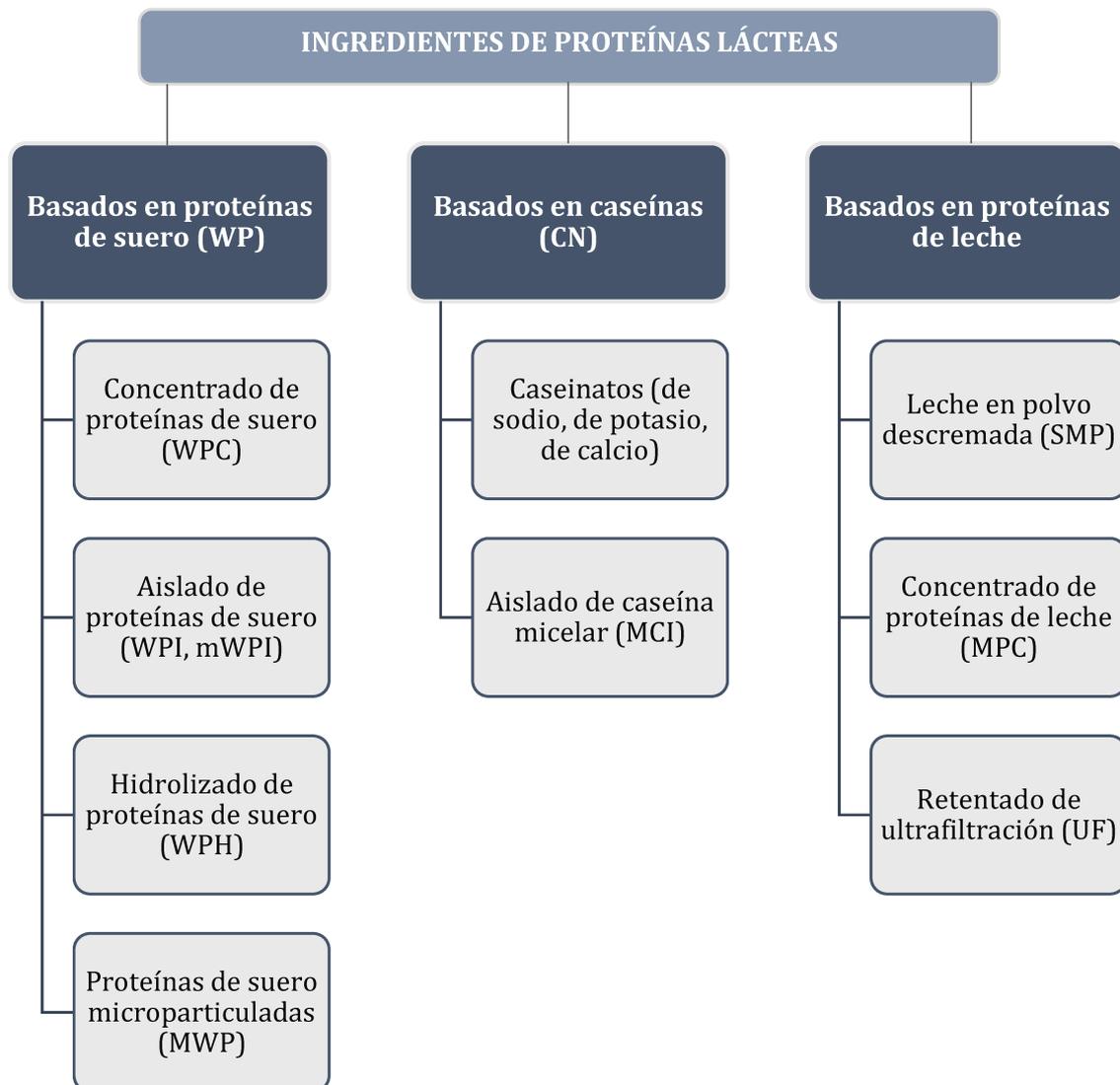


Fig VI. Ingredientes de proteínas lácteas clasificados según el tipo de proteínas que contienen (proteínas de suero -WP-, caseínas -CN-, proteínas de leche)

En la **Tabla VI** se presenta la composición de los ingredientes más comúnmente empleados para la elaboración de yogur.

Tabla VI. Composición aproximada (g/100 g) de ingredientes lácteos (Tamime, 2009).

Producto	Agua	Grasa	Proteína	Carbohidratos	Cenizas
SMP	3,5	0,7-1,3	35-37	49-52	7,5-8,0
MPC70	4,2	1,4	70	16,2	8,2
MPC80	3,9	1,8	80	4,1	7,4
Caseinato (Na, Ca, K)	3-5	0,9-1,5	89-95	0,2	3,3-5
WPC35	4,6	2-4	34-36	44-53	7-8
WPC70/80	4-5	0,3-7,0	72-81	2-13	2,5-6,5
WPI	2,5-6	0,1-0,7	89-93	0,1-0,8	1,4-3,8
WPH	4,0	5,0	81,5	3,0	4,5
MWP	5,0	6,0	45,0	40,0	6,0

SMP: leche en polvo descremada; MPC70: concentrado de proteínas de leche al 70%; MPC80: concentrado de proteínas de leche al 80%; WPC35: concentrado de proteínas de suero al 35%; WPC70/80: concentrado de proteínas de suero al 70%/80%; WPI: aislado de proteínas de suero; WPH: hidrolizado de proteínas de suero; MWP: proteínas de suero microparticuladas.

A continuación, se detallan los reportes previos del uso de los distintos ingredientes en elaboraciones de yogur o geles ácidos.

El uso de MPC presenta la ventaja de incrementar el contenido de proteína sin aumentar significativamente el nivel de lactosa ni modificar la relación CN:WP original de la leche (Qi et al., 2022). Mistry y Hassan (1992) utilizaron MPC84 en polvo para obtener yogures descremados, con 5,2-11,3 g/100 g de proteína, 1,6-7,9 g/100 g de lactosa y 11,1-15,0 g/100 g de sólidos totales; concluyeron que el producto con 5,6 g/100 g de proteína fue el que presentó las mejores características texturales, ya que con mayores niveles de proteína los yogures desarrollaron excesiva firmeza y granulosidad. Shah et al. (2022) utilizaron MPC70 en polvo en la formulación de un yogur con 6,3 g/100 g de proteína, y encontraron mayor viscosidad y menor sinéresis en comparación a otros yogures con menor contenido proteico (3-3,7 g/100 g) elaborados con otros ingredientes (SMP, MPC40).

Por el contrario, la relación CN:WP puede modificarse por el agregado de ingredientes basados en caseínas o en proteínas de suero. Se ha reportado el uso de concentrados de caseína micelar (Bong y Moraru, 2014; Jørgensen et al., 2015), aislados de caseína micelar (Wilbanks et al., 2023) y caseinatos (Akalın et al., 2012; Giacometti Cavalheiro et al., 2020) para la formulación de yogures con niveles de proteína >5,6 g/100 g. Entre los caseinatos, el de calcio es el más utilizado porque presenta la ventaja de mejorar la estructura del yogur por la mayor cantidad de puentes interproteicos que se pueden formar vinculado a la mayor concentración de este mineral (Remeuf et al., 2003). Giacometti Cavalheiro et al. (2020) emplearon este ingrediente en la obtención de yogures con 7 g/100 g de proteína y 0,2 g/100 g de grasa, observándose que el incremento de

proteína aumentó la actividad inhibitoria de la enzima convertora de angiotensina (efecto antihipertensivo) respecto a un control con 4 g/100 g de proteína, lo cual se atribuyó a la mayor formación de péptidos con esta bioactividad.

Entre los ingredientes basados en proteínas de suero, el más utilizado es el concentrado de proteínas de suero (WPC). El uso de WPC80 es el más reportado en la producción de yogures altos en proteína (>5,6 g/100 g) (Akalın et al., 2012; Brodziak et al., 2020; Morell et al., 2017; Wherry et al., 2019); aunque también se ha informado el uso de WPC60 (da Silva et al., 2022) y WPC40 en yogures con ~5 g/100 g de proteína (Vénica et al., 2023a).

En general, el agregado de proteínas de suero, que provoca una reducción de la relación CN:WP, conduce a redes proteicas más densas, con poros más pequeños y una reticulación fina entre las caseínas y las proteínas de suero (Lesme et al., 2020). Pero el excesivo agregado de proteínas de suero puede generar sabores y texturas indeseadas; por ejemplo, un reemplazo de >20% de los sólidos no grasos de la leche con WPC generó una textura granulosa (Lucey y Singh, 1998). La baja proporción de caseínas da como resultado una estructura de gel más abierta, con mayor tendencia a la sinéresis (González-Martínez et al., 2002), comportamiento que ha sido atribuido a los enlaces más fuertes que se establecen entre las proteínas de suero (puentes disulfuro) que entre las caseínas; es por esto que geles enriquecidos con caseínas son más débiles y menos firmes que los enriquecidos con proteínas de suero (Krzeminski et al., 2011).

Diversos estudios han demostrado que el aumento de proteínas de suero aumenta el diámetro efectivo de las partículas post tratamiento térmico, dado por la deposición de las proteínas de suero desnaturalizadas sobre las caseínas, formando agregados de mayor tamaño. Se sugirió que a relaciones CN:WP $\leq 3:1$ ocurre la saturación de la superficie de κ -caseína con proteínas de suero desnaturalizadas, y que las proteínas de suero restantes forman agregados solubles (Beaulieu et al., 1999). Tamaños de partículas/agregados >150 μm en yogur son percibidos como ásperos, granulados y poco cremosos; además, el tamaño, la forma y dureza de esas partículas también influyen en la percepción de cremosidad. El exceso de proteína de suero se vincula a la formación de estas partículas irregulares, con tamaños heterogéneos (Krzeminski et al., 2011). En general, los estudios realizados coinciden en que relaciones CN:WP <2:1 conducen a productos con mayor viscosidad, firmeza y menor sinéresis, pero que presentan la formación de agregados proteicos de tamaños >100 μm , generando granulosidad (Chua et al., 2017; Küçükçetin, 2008; Laiho et al., 2017; Puvanenthiran et al., 2002; Tomaschunas et al., 2012).

También se ha estudiado el uso de proteínas de suero microparticuladas (MWP). Este ingrediente se ha utilizado como sustituto de materia grasa por sus propiedades tecnofuncionales vinculadas al pequeño tamaño de las partículas que se obtienen en su proceso de manufactura, que combina tratamientos térmicos y mecánicos a pH bajo para crear dispersiones de partículas pequeñas (1-10 μm) que luego son sometidas a un proceso de secado (Kelly, 2018; Shi et al., 2023). En este sentido, Hossain et al. (2020) investigaron el efecto de MWP con distintos tamaños

de partícula en yogures bajos en grasa (<0,5 g/100 g) en comparación a un yogur entero con 3,5 g/100 g de grasa; a partir de un análisis sensorial encontraron que dos de las formulaciones propuestas se asemejaban al yogur entero. Además, el tamaño de las partículas demostró ser un factor influyente en los parámetros texturales como la firmeza, viscosidad y cremosidad. También Silva y O'Mahony (2018) emplearon distintas concentraciones de MWP en la formulación de yogures con 8 g/100 g de proteína y <0,3 g/100 g de grasa, detectándose diferencias en la estructura del gel (menor firmeza, mayor porosidad, menor capacidad de retención de agua) que un yogur control sin este ingrediente.

Otro ejemplo de ingrediente de proteínas de suero, muy poco difundido para la elaboración de yogur, es el aislado de proteínas de suero nativa (mWPI), que se obtiene por aislamiento de las proteínas de suero de la leche a través de membranas de microfiltración. A diferencia del WPI obtenido de suero de quesería, este ingrediente se considera más 'limpio' en cuanto a su sabor, coloración, acidez, etc. Hay muy pocos reportes de su uso en yogur incrementado en proteínas, ya que se destaca por sus propiedades nutraceuticas para deportistas y adultos mayores, más que por su tecnofuncionalidad (Fabre et al., 2022; Garcia-Vicencio et al., 2018; Guggisberg et al., 2007).

Otro de los métodos para incrementar proteínas es la concentración de la leche por filtración tangencial por membranas. Este es un proceso no térmico que permite separar los componentes por tamizado en función del peso molecular, minimizando la desnaturalización proteica. La ultrafiltración (UF) separa las proteínas en su estado nativo (retentado), del material de bajo peso molecular (lactosa, sales, vitaminas y agua) que atraviesa la membrana (permeado). En general se emplean presiones comprendidas entre 70 a 170 kPa. Las membranas pueden ser de polietilensulfona, poliamidas aromáticas, acetato de celulosa, cerámicas, entre otras, y con peso molecular de corte desde aprox. 1000 hasta 100000 Dalton (Kelly, 2011). Un retentado de leche obtenido con una membrana con tamaño de corte ~10kDa (o menor) tendrá una relación CN:WP igual a la de la leche de partida (80:20) (Jørgensen, 2017).

Esta metodología fue ensayada en yogures altos en proteína (Biliaderis et al., 1992; Magenis et al., 2006; Marini et al., 2022; Narayana y Gupta, 2016; Sobti et al., 2024; Uduwerella et al., 2018; Valencia et al., 2018). Por ejemplo, Uduwerella et al. (2018) utilizaron leche concentrada por UF hasta 23 g/100 g de sólidos totales para elaborar yogures con ~10 g/100 g de proteína y 2,4 g/100 g de lactosa y 8-10 g/100 g de grasa. También, Valencia et al. (2018) emplearon leche concentrada por UF con 17 g/100 g de sólidos totales, obteniendo un yogur con ~10 g/100 g de proteína y 1,5 g/100 g de lactosa.

Por su parte, las caseínas se pueden concentrar por microfiltración (MF) con membranas de 0,05-0,20 µm y en el permeado se recuperan las proteínas de suero nativas. Esta estrategia fue propuesta por Jørgensen et al. (2015) para obtener yogur alto en proteínas (~8 g/100 g) utilizando leche concentrada por MF y permeado de MF; a la leche base se le aplicaron distintos tratamientos

térmicos para estudiar el efecto del grado de desnaturalización de las proteínas de suero sobre parámetros estructurales del yogur.

Por otro lado, el método empleado para incrementar el nivel proteico afecta la concentración de lactosa de la leche base y esto puede provocar efectos en la fermentación y en la calidad del producto final. Los polvos de proteína de suero con alta concentración de proteína (por ej., WPC80), concentrados de proteína de leche (MPC70 o MPC80), concentrados de caseína o caseinatos y retentado de UF/MF aportan bajas cantidades de lactosa a la leche de partida (5 g/100 g o menor) (**Tabla VI**). Por el contrario, el empleo de ingredientes con bajo nivel de proteína (30-35 g/100 g, como SMP y WPC35) para formular una leche base con 7-8 g/100 g de proteína conduce a niveles de lactosa cercanos al 10 g/100 g, que derivarán en un yogur con ~7 g/100 g de lactosa final. Se ha reportado que una concentración de lactosa de 15 g/100 g puede afectar el desempeño de las cepas de *S. thermophilus* y *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* e impactar en la producción de ácido láctico (Vinderola et al., 2002). También se ha reportado que la lactosa ejercería un efecto protector frente a la desnaturalización por calor de las proteínas de suero (β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina), aumentando el ordenamiento de las moléculas de agua alrededor de las proteínas y estabilizando su estructura nativa, lo que podría afectar la estructuración de la matriz proteica durante la fermentación (Anema et al., 2006). Al respecto, se evaluó la desnaturalización de las proteínas de suero obtenidas a partir de SMP de bajo tratamiento térmico (que tiene una alta proporción de proteínas de suero en estado nativo), en presencia de diferentes concentraciones de lactosa (5, 10 y 15 g/100 g) aplicando diferentes tratamientos térmicos (75 a 100 °C, 0-60 min); se observó que la desnaturalización irreversible de la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina disminuyó a mayor concentración de lactosa presente en la mezcla, aunque este efecto protector fue mucho menor para la β -lactoglobulina con calentamiento mayor a 90 °C (95 °C/5 min) (Anema et al., 2006). En otro estudio, se analizó el efecto de distintos niveles de lactosa (sin lactosa agregada, con 5,6 y con 11,2 g/100 g de lactosa) en la reología de un gel ácido (4 g/100 g de proteína) formulado con MPC calentado a 90 °C/10 min (Meletharayil et al., 2016). El aumento de lactosa produjo geles con mayor valor de módulo de almacenamiento (indicando comportamiento más cercano a un sólido), mayor capacidad de retención de agua y menor porosidad. Acorde a estos resultados, el estudio de la concentración de lactosa resulta de interés en yogures altos en proteína como un factor de modulación de la textura, reología y capacidad de retención de agua (Jørgensen et al., 2019).

Además de los efectos sobre la tecnología de elaboración, un contenido elevado de lactosa en el yogur podría ser rechazado por el consumidor dada la tendencia actual a la reducción de este carbohidrato para la población con deficiencia en su digestión-absorción, como fue detallado previamente. Una alternativa es la hidrólisis enzimática de la lactosa en sus monosacáridos constituyentes (glucosa y galactosa), mediada por la enzima β -galactosidasa. Esta estrategia se ha estudiado minuciosamente en el INLAIN empleando una enzima comercial, en cuanto al

momento y dosis de agregado durante la elaboración de yogur, formulación de la leche base (nivel de grasa, niveles de SMP y WPC, nivel de sacarosa, aspartamo, inulina) (Vénica et al., 2020a; Vénica et al., 2014). Sin embargo, estos estudios se realizaron en yogures con niveles de proteína <5,6 g/100 g.

VII. Estrategias para incorporar fibras al yogur

La fibra dietaria se define como las partes comestibles de plantas o carbohidratos análogos (extraídos o sintéticos) resistentes a la digestión por ácido y enzimas digestivas del ser humano y absorción en el intestino delgado, con fermentación completa, parcial o incompleta en el intestino grueso (Dhingra et al., 2012; Stribling y Ibrahim, 2023; Yegin et al., 2020). Están presentes naturalmente en una variedad de cereales, vegetales, frutas, legumbres, y también en algunas fuentes marinas (exoesqueletos de crustáceos) (Yegin et al., 2020).

Desde el punto de vista químico, la fibra no es una entidad única. Está representada por una mezcla de carbohidratos con diferentes estructuras (peso molecular, grado de polimerización - GP-, tipo de enlaces glicosídicos), incluyéndose también a la lignina (polímero fenólico que forma parte de las paredes celulares de plantas y algas) (Nevara et al., 2021).

La fracción fibra se clasifica en componentes de alto peso molecular que incluyen los polisacáridos no amiláceos (celulosa, hemicelulosas, gomas, mucílago, pectinas, β -glucanos), almidones resistentes y lignina, y componentes de bajo peso molecular que incluyen oligosacáridos (con GP de 3 a 9, tales como fructooligosacáridos -FOS-,GOS, oligofruktosa, maltodextrinas resistentes) y la inulina (con GP > 10) (Guo et al., 2018; Stribling y Ibrahim, 2023; Vilcanqui-Pérez y Vélchez-Perales, 2017). Otra clasificación posible es en fibras solubles (viscosas) e insolubles. En general, las solubles se refieren a las de bajo peso molecular y las insolubles a las de alto peso molecular (Mudgil, 2017). En particular, algunos oligosacáridos tienen rol prebiótico (Gibson et al., 2017; Muñoz-Labrador et al., 2024). Inulina, FOS y GOS son los que reúnen el mayor caudal de evidencia científica al respecto (Gibson et al., 2017).

A la fibra se le atribuyen múltiples funciones fisiológicas positivas para la salud: incremento de la saciedad, mejora de la salud intestinal, mejora de la laxación, atenuación de los niveles de triglicéridos, colesterol y glucosa en sangre, reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares, prevención de ciertos tipos de cáncer (por ej., cáncer de colon) (Anderson et al., 2009; Dabour et al., 2022; Stribling y Ibrahim, 2023). Sin embargo, se desconocen los efectos sobre la salud de la fibra agregada en comparación con la fibra intrínseca, y en el etiquetado de los alimentos no se distingue entre fibra intrínseca o añadida, lo que podría resultar confuso para los consumidores (Stribling y Ibrahim, 2023).

Las fibras son resistentes a las enzimas pancreáticas y salivares, son estables al medio ácido del estómago, y las enzimas del intestino delgado no las pueden hidrolizar. La fibra actúa

diluyendo el contenido en el estómago y prolonga el vaciado gástrico. En el intestino delgado, la fibra actúa aumentando la viscosidad de la capa de agua instilada, lo que potencialmente influye en la eficiencia de la digestión y la absorción. En el intestino grueso, la fibra (prebiótica) es un sustrato (fuente de carbono) para la microbiota que habita en el mismo. La fermentación bacteriana de la fibra produce un aumento de la producción de ácidos de cadena corta (acético, propiónico, butírico), ocasionando posteriormente una reducción del pH colónico. Los valores bajos de pH intestinal impiden el crecimiento de ciertas especies bacterianas patógenas al tiempo que fomentan el crecimiento de la microbiota beneficiosa (por ejemplo, bifidobacterias y bacterias lácticas). Un pH colónico bajo también puede ayudar a la excreción de ciertos carcinógenos, que se unen a la fibra dietética en el colon. Se ha demostrado que un pH bajo en las heces se asocia con una menor incidencia de cáncer de colon (Yegin et al., 2020). Además de los ácidos de cadena corta, se sintetizan análogos de hormonas, vitaminas y neurotransmisores, activando el sistema inmune y aumentando la resistencia intestinal a la flora patógena (Liu et al., 2024).

Los efectos fisiológicos están relacionados con las propiedades fisicoquímicas, tales como capacidad de retener agua y aceite, capacidad de hinchamiento, capacidad de adsorción, viscosidad, habilidad para formar geles, unión a cationes y colesterol, y capacidad de fermentación (Dhingra et al., 2012; Guo et al., 2018; Rosdi et al., 2022). Estas características y la función fisiológica están íntimamente relacionadas con la estructura del compuesto (Nevara et al., 2021). Las propiedades fisicoquímicas y el comportamiento reológico de las fibras, son aspectos esenciales para el desarrollo de nuevos alimentos, la estabilidad durante el almacenamiento, estructura y aspectos sensoriales de los alimentos, y el diseño de equipos de procesamiento de alimentos (Nevara et al., 2021).

La baja ingesta de fibras es una característica de la típica dieta “occidental” que es alta en grasas saturadas, azúcar refinada y sal, y baja en alimentos basados en plantas (Stribling y Ibrahim, 2023). De esta manera, el agregado de ingredientes como fuente de fibras (extraídas o sintéticas) a los alimentos de consumo habitual, constituye una estrategia novedosa y actual para incrementar el consumo de las mismas (Stribling e Ibrahim, 2023), sobre todo si nos referimos a los lácteos, dado que la leche está exenta de este nutriente.

Por la habilidad que poseen las fibras de enlazar agua y gelificar, como se mencionó, son ingredientes ideales para disminuir la sinéresis y reemplazar grasas en los alimentos, pero pueden producir textura granulosa y una desagradable sensación en la boca, disminuyendo la aceptabilidad del alimento (Banks y Weimer, 2007; Guo et al., 2018; Karimi et al., 2015; Ng et al., 2018; Ribes et al., 2021). Además, y en el caso particular de su inclusión en la tecnología de lácteos fermentados, estos carbohidratos agregados podrían ser metabolizados por los fermentos, modificar la viabilidad y el metabolismo microbiano, impactar en la cinética de fermentación y en los metabolitos producidos, y dar lugar a *off-flavors*, disminuyendo la calidad sensorial del alimento (Banks y Weimer, 2007).

El aumento de nivel de fibra en yogur puede lograrse adicionando ingredientes fuente de fibras o aplicando tecnologías que conduzcan a su formación *in situ*.

a. Incorporación de ingredientes fuente de fibras en yogur

Como se mencionó anteriormente, fibras de diferentes orígenes y de diferente GP pueden emplearse como ingredientes alimentarios. En cuanto a su aplicación en yogur, son abundantes los reportes publicados, pudiéndose citar como ejemplos: Chen et al., 2023; El-Kholy et al., 2020; Espírito-Santo et al., 2013; Hasani et al., 2017; Hashim et al., 2009; Hoppert et al., 2013; Ozcan y Kurtuldu, 2014; Prasad et al., 2013; Ribes et al., 2021; Sanz et al., 2008; Staffolo et al., 2004; Yildiz y Ozcan, 2019; Zhang et al., 2024. Sin embargo, los estudios de la evaluación de estos ingredientes en la formulación de yogur alto en proteína son escasos (Costa et al., 2019; Lal Bajya et al., 2024).

En el caso particular de este trabajo de tesis se evaluó la inclusión de un ingrediente de fibra de zanahoria en yogur. La zanahoria (*Daucus carota* subsp. *sativus*) es una hortaliza de raíz de gran distribución en todo el mundo. La producción mundial fue de aprox. 41 millones de toneladas en 2021, siendo China el principal productor, seguido por Uzbekistán y Estados Unidos (<https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/produccion-zanahoria-argentina-hasta-2021-2022.pdf>). En Argentina la producción de zanahoria se incrementó 43% en los últimos 30 años, alcanzando en 2021 las 300.000 toneladas. El principal destino es el consumo en fresco, salvo una pequeña proporción que se utiliza para deshidratación y otros procesos (<https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/produccion-zanahoria-argentina-hasta-2021-2022.pdf>). En los últimos años, el consumo de zanahoria y sus productos derivados se ha incrementado por ser una fuente importante de antioxidantes (carotenoides y antocianinas), vitaminas, minerales y fibra (Que et al., 2019).

Santa Fe es una de las provincias productoras de zanahoria, luego de Mendoza, Santiago del Estero y Buenos Aires. Gran parte de lo que se cosecha en Santa Fe (aprox. 40%) no se comercializa por no cumplir con las exigencias del mercado en cuanto a forma y tamaño, destinándose una parte a la alimentación animal y la otra parte se descarta ocasionando contaminación al medio ambiente. En un intento por revalorizar los residuos agrícolas de la región y brindar una alternativa sustentable, un grupo de investigadores de la Facultad de Ingeniería Química-Universidad Nacional del Litoral (Programa de Valorización, Desarrollo y Escalado de Procesos Agroindustriales, PROVADE, UNL-CONICET) optimizó un proceso para el aprovechamiento de las zanahorias de descarte y obtuvieron un residuo rico en fibra, compuesto mayoritariamente por componentes de alto peso molecular (fibra insoluble), para ser usado como ingrediente alimentario. En estudios previos, se han obtenido resultados satisfactorios de la aplicación de este ingrediente en yogur (4,2 g/100 g proteína y 1,5 g/100 g grasa) (Vénica et al.,

2020b). Además de estos reportes, se identifican muy pocos datos publicados sobre el agregado de fibra de zanahoria en yogur y su efecto en la tecnología y en las características del producto (Dong et al., 2022; McCann et al., 2011; Puvanenthiran et al., 2014; Yildiz y Ozcan, 2019). Para yogur alto en proteínas, según nuestro conocimiento, no hay reportes actuales.

b. Formación in situ de GOS en yogur

Los GOS están dentro del grupo de las fibras solubles, con rol prebiótico, como se mencionó. Desde el punto de vista estructural, son una mezcla compleja de oligosacáridos de galactosa con diferente GP (2-10), peso molecular y enlaces glicosídicos. Los GOS se sintetizan por vía enzimática con enzimas β -galactosidasas a partir de la lactosa, en una reacción de transgalactosilación que ocurre simultáneamente con la reacción de hidrólisis (Deshmukh et al., 2024; Gosling et al., 2010). Varios factores influyen en la síntesis y en las características y propiedades de los GOS obtenidos (concentración de lactosa de partida, origen de la enzima y actividad, dosis de enzima, entre otros) (Gosling et al., 2010).

La industria láctea emplea GOS como ingrediente funcional en fórmulas infantiles. También se los propone como ingrediente para varios tipos de alimentos (lácteos, panificados, etc.) debido a que son estables a las altas temperaturas y en un amplio rango de pH, entre otras características (Crisà, 2013). La incorporación de GOS a lácteos fermentados ha sido reportada en pocos trabajos. Costa et al. (2019) adicionaron GOS (2,5 g/100 mL) en la leche para yogur y reportaron que mejoró la consistencia y no afectó el perfil de volátiles del producto. Prasad et al. (2013) informaron que la incorporación de 2,0 g/100 mL de GOS mejoró el crecimiento de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* acortando el tiempo de fermentación, incrementando la proteólisis y la concentración de ácidos láctico y acético, y produciendo una disminución de la sinéresis, aunque no hubo diferencia en la firmeza. Ng et al. (2018) observaron que el agregado de GOS en distintos niveles (9,1, 11,3 y 13,6 g/100 g) redujo la sinéresis y aumentó ligeramente la lubricación al tiempo que mantuvo la textura y las características sensoriales del yogur.

Otra estrategia al agregado como ingrediente, lo constituye la formación *in situ* de GOS en la matriz alimentaria en ciertas condiciones (Playne, 2003). Los estudios reportados de formación *in situ* de GOS en yogur no son abundantes, y en su mayoría son sobre yogures con contenido tradicional de proteínas (Martins et al., 2011; Martins et al., 2014; Toba et al., 1986). En el INLAIN se trabaja desde hace años en esta línea (Seijo et al., 2022; Vénica et al., 2015, 2016, 2020a). Vénica et al., (2015) informaron que los niveles de GOS no disminuyeron durante el almacenamiento de yogur infiriendo la incapacidad de los fermentos para metabolizar estos compuestos bioactivos y la protección que brindó la matriz láctea para evitar su degradación. Por otro lado, Vénica et al. (2016) detectaron retrasos en la fermentación y diferencias en los niveles de post acidificación y de compuestos volátiles (diacetilo, etanol, ésteres etílicos) de yogures

elaborados a partir de leches con diferente perfil de carbohidratos; sin embargo, estos hallazgos no fueron acompañados por cambios en los recuentos microbianos del fermento. En un estudio recientemente publicado, se estudió la formación in situ de GOS en yogures incrementados en proteínas (6,6-7,8 g/100 g), formulados con leche concentrada por UF e ingredientes en polvo (Vénica et al., 2024).

Objetivos

Objetivo general

Desarrollar un yogur incrementado en proteínas, parcialmente descremado y reducido en lactosa, que contribuya a las estrategias globales planteadas contra el sobrepeso y la obesidad mediante el uso de estrategias innovadoras y el estudio de su impacto en la calidad global del producto.

Objetivos específicos

1. Aplicación de distintas estrategias **a escala laboratorio**: adición de ingredientes proteicos de origen lácteo y aplicación de membranas, y procesos enzimáticos, para el diseño de formulaciones de yogur con contenido proteico incrementado, parcialmente descremado, reducido en lactosa, y con adición de fibras.
2. Evaluación del impacto de las estrategias empleadas en la dinámica de fermentación y en las características fisicoquímicas, microbiológicas, estructurales y de *flavor* de los productos obtenidos.
3. Validación en elaboraciones **a escala piloto** y caracterización del producto obtenido. Análisis del impacto del cambio de escala en la tecnología y características y calidad del producto.
4. Evaluación de la capacidad funcional del yogur desarrollado mediante un estudio de eficacia en humanos, a partir del análisis de la composición de la microbiota intestinal y de parámetros sanguíneos de los consumidores.

Técnicas Analíticas

TA 1. pH y acidez titulable (AT)

El pH se determinó con el método de la American Public Health Association (Bradley et al., 1992), utilizando un pHmetro digital provisto con un electrodo combinado de vidrio y diafragma capilar cerámico (Porotrode, Metrohm, Suiza) que se calibró con soluciones tamponadas de pH 4, 7 y 10.

La AT se determinó por titulación potenciométrica con NaOH N/9 (IDF 150:2012) empleando un titulador automático (pH Stat 902, Tritando Dosino, Metrohm, Suiza) y el electrodo mencionado. El software Tiamo 3.0 permitió controlar, adquirir y procesar los datos.

Las mediciones se realizaron por inmersión del electrodo directamente en la muestra de leche o yogur (10 g + 10 g de agua), se registró el valor de pH y luego se comenzó a titular hasta pH 8,3, registrándose el volumen gastado. El valor de AT se calculó automáticamente y se expresó en °Dornic (1 °D=0,01 g de ácido láctico/100 g). El análisis de ambos parámetros se realizó por duplicado.

TA 2. Concentración de oxígeno disuelto (OD)

La concentración de OD (mg/L) fue determinada mediante un sensor óptico portátil (Orion STAR A223, Estados Unidos) que fue introducido directamente en la muestra de yogur. El sensor fue previamente calibrado con aire saturado en agua, utilizando una esponja humedecida con agua destilada que fue colocada en el extremo de la manga protectora del sensor, hasta la estabilización de la medida (aprox. 5 min, 100% de OD). La concentración de OD se leyó en el visor de la pantalla.

TA 3. Contenido de proteína total

El contenido de proteína total fue determinado por el método de Kjeldahl (IDF 20-1:2001), con modificaciones para yogur. El método se basa en digerir la muestra con ácido sulfúrico para convertir el nitrógeno proteico y no proteico (proveniente de compuestos orgánicos) 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 1,5-2,0 g de la muestra en papel libre de nitrógeno y se colocó en el tubo de digestión conteniendo 5,25 g de K₂SO₄, 0,15 g de Cu₂SO₄ · 5H₂O y 0,10 g del catalizador TiO₂. Luego, se adicionaron, bajo campana, 12 mL de H₂SO₄ concentrado. La mineralización de la muestra se llevó a cabo en una unidad digestora con capacidad para seis tubos provisto de un sistema de aspiración de vapores (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. Posteriormente, el tubo conteniendo la muestra

digerida se conectó en el equipo de destilación por arrastre con vapor automático (Büchi Distillation Unit B-324, Suiza), y se agregaron 50 mL de NaOH 32% m/v para la alcalinización del medio y la transformación del amonio proveniente de las proteínas, péptidos y aminoácidos en amoníaco. El destilado se colectó en un erlenmeyer conteniendo 60 mL de H₃BO₄ 4% m/v y gotas de una solución indicadora, preparada con partes iguales de una solución 0,2% m/v de rojo de metilo y una solución 0,2% m/v de verde de bromocresol, ambas preparadas a partir de los indicadores en polvo disueltos en alcohol etílico 96% v/v (pH de viraje 4,65). Finalmente, se realizó la titulación manual del borato de amonio formado, con una solución valorada de H₂SO₄ 0,1 N hasta viraje del indicador (verde a rosado) utilizando una microbureta de 5 mL; se corroboró el punto final de la titulación (pH 4,65) midiendo el pH. El contenido de nitrógeno total se expresó en g/100 g. El contenido de proteínas totales (proteína cruda) se calculó multiplicando el nitrógeno total por el factor 6,38 correspondiente a productos lácteos y se expresó en g/100g.

TA 4. Contenido de materia grasa

El contenido de materia grasa fue determinado por el método volumétrico de Gerber (IDF 152A:1997), con modificaciones para su aplicación a yogur bajo en grasa y alto en proteína. Se utilizó un butirómetro para queso (para 2,5 g de muestra) y H₂SO₄ de $\delta = 1,522$ g/mL.

Se pesaron 5 g de yogur en la copa del butirómetro, y se adicionaron 15 mL de H₂SO₄. El butirómetro se colocó en un baño termostatzado (65-70 °C) para favorecer la degradación de la materia orgánica (hasta color rosáceo opaco). Luego se adicionó lentamente y por las paredes, 1 mL de alcohol amílico, se tapó y se agitó el butirómetro con suavidad. Se centrifugó durante 10 min en centrífuga de Gerber para facilitar la liberación de grasa. Se sumergió nuevamente en el baño (65 °C) por 10 min, se volvió a centrifugar y se realizó la lectura midiendo la altura de la columna de grasa en la escala graduada del butirómetro. El contenido de grasa se expresó en g/100 g según el siguiente cálculo:

$$\frac{\text{Materia grasa [g]}}{100 \text{ g muestra}} = \frac{\text{Lectura} \times 2,5}{\text{Peso muestra [g]}} \cdot 100 \text{ g muestra}$$

TA 5. Contenido de sólidos totales (ST)

El contenido de ST se determinó por secado de la muestra a 102 ± 2 °C hasta pesada constante (IDF151:2005).

Un cristalizador de aluminio con tapa 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/12 h). Luego, el cristalizador tapado se colocó en desecador y se registró su masa. Se agregaron 5 g de muestra y 5 mL de agua destilada, dispersándose la muestra con ayuda de la varilla; se colocó el

cristalizador en baño maría durante 30 min, mezclando intermitentemente para aumentar la superficie de contacto y facilitar el proceso de evaporación. Posteriormente, se colocó en estufa a 102 ± 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 contenido de ST se obtuvo por diferencia de peso de la muestra antes y luego del secado y se expresó en g/100g, según la siguiente expresión:

$$\frac{\text{ST [g]}}{100 \text{ g muestra}} = \frac{\text{Peso muestra seca [g]}}{\text{Peso muestra húmeda [g]}} \cdot 100 \text{ g muestra}$$

TA 6. Contenido de cenizas

La determinación del contenido de cenizas se realizó por calcinación en mufla (AOAC 945.46:2007).

Los crisoles fueron tratados térmicamente en mufla (TecnoDalvo, Argentina, 550 °C/2 h) y enfriados en desecador. En el caso de los ingredientes proteicos en polvo, se pesó 1 g y se procedió a la calcinación. En el caso del yogur, se pesaron 3 g, se colocó en estufa (100 °C/20 h) para secar la muestra y luego se procedió a la calcinación. El proceso se realizó a 550 °C el tiempo necesario para obtener cenizas blancas. Los crisoles se enfriaron en desecador hasta temperatura ambiente y se pesaron. El contenido de cenizas se obtuvo por diferencia de peso de la muestra antes y luego de la calcinación y se expresó en g/100 g, según la siguiente expresión:

$$\frac{\text{Cenizas [g]}}{100 \text{ g muestra}} = \frac{(\text{crisol} + \text{cenizas}) - \text{crisol} \text{ [g]}}{\text{Peso muestra [g]}} \cdot 100 \text{ g muestra}$$

TA 7. Contenido de calcio

Se empleó la técnica potenciométrica propuesta por Pedro (2013), con modificaciones, empleando un electrodo selectivo de iones Ca^{2+} (ISE, modelo 9720BNWP, Thermo Scientific, Estados Unidos) instalado en un equipo (Orion Dual Star pH/ISE Meter, Thermo Scientific, Estados Unidos); el análisis se realizó a partir de las cenizas obtenidas según la metodología descrita en el apartado **TA 6**.

Debido a que esta metodología de análisis de calcio se puso a punto en el marco de la presente tesis, el procedimiento de optimización se describe a continuación como así también la comparación de los resultados con los obtenidos por aplicación del método de referencia (espectrometría de absorción atómica de llama) para evaluar la validez de los mismos.

Las cenizas se disolvieron en 10 mL de HCl 10% v/v, la solución se trasvasó a un matraz de 50 mL y se enrasó con agua destilada. Se tomaron 20 mL de la solución de cenizas con bolpipeta, se ajustó el pH a 6,5 con KOH 4 mol/L, se adicionó 1 mL de la solución para ajustar la fuerza

iónica (ISA, Cat. No. 932011, Thermo Scientific, Estados Unidos) y se enrasó con agua destilada en matraz de 50 mL.

La calibración del electrodo se realizó con soluciones patrón de calcio. Para ello, se prepararon soluciones (50 mL) de 1, 10, 100 y 1000 mg/L de Ca^{2+} a partir de la solución patrón de CaCl_2 0,1 mol/L (4008 ppm de Ca^{2+}); en todos los casos se adicionó 1 mL de solución ISA, para asegurar que todas las muestras tuvieran una fuerza iónica elevada y constante en relación a la concentración del ión medido. Esto se realizó para que, mediante la ecuación de Nernst, se pueda relacionar el potencial medido con la concentración del ión Ca^{2+} , ya que el potencial presenta una relación logarítmica lineal con su actividad en la solución. Aumentar la fuerza iónica del medio con electrolitos inertes hace que la contribución de los electrolitos originales (Ca^{2+}) sea despreciable en la misma, siendo el valor del coeficiente de actividad muy bajo. Por lo tanto, se verifican las siguientes relaciones:

$$C_{\text{Ca}^{2+}} = \frac{a_{\text{Ca}^{2+}}}{\gamma_{\text{Ca}^{2+}}} \cong a_{\text{Ca}^{2+}}$$

$$E = k + \frac{0,059}{2} \cdot \log(C_{\text{Ca}^{2+}})$$

Donde $C_{\text{Ca}^{2+}}$, $a_{\text{Ca}^{2+}}$ y $\gamma_{\text{Ca}^{2+}}$ son la concentración, actividad y coeficiente de actividad de Ca^{2+} en la solución, E es el potencial medido con el electrodo, y k es un valor constante del sistema.

El electrodo, previamente acondicionado según las instrucciones del fabricante, se sumergió en las soluciones en orden creciente de concentración, y a partir de los valores registrados el equipo construyó automáticamente la curva de calibrado. Posteriormente, se sumergió el electrodo en la muestra preparada. El contenido de calcio se expresó en mg/100 g muestra, según la siguiente expresión:

$$\frac{\text{Ca}^{2+} [\text{mg}]}{100 \text{ g muestra}} = \frac{\text{Lectura electrodo} \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right] \cdot 0,05 [\text{L}] \cdot 0,05 [\text{L}]}{0,02 [\text{L}] \cdot \text{Peso muestra} [\text{g}]} \cdot 100 \text{ g muestra}$$

Los resultados obtenidos con el método potenciométrico implementado se validaron con el método de referencia de Espectrometría de Absorción Atómica de Llama (FAAS, Perkin Elmer, Estados Unidos). Para ello, 8 muestras de yogur (4 de elaboración propia –Y1, Y2, Y3, Y4- y 4 comerciales – C1, C2, C3, C4-) fueron analizadas simultáneamente por ambos métodos a partir de la misma solución de cenizas. La determinación por FAAS se solicitó como servicio en el PRINARC (FIQ-UNL). Se aplicó un test de hipótesis para muestras pareadas con un nivel de confianza del 95%, para comparar ambos métodos. No se presentaron diferencias significativas entre ambas metodologías (**Tabla 1**).

Tabla 1. Comparación de métodos para análisis de calcio (Espectrometría de Absorción Atómica de Llama -FAAS- y Electrodo Selectivo de Iones -ISE-), por test t de Student. Los resultados de concentración de calcio se expresan como mg/100g yogur

Yogur	FAAS	ISE	Diferencia (FAAS-ISE)
Y1	178,72	177,54	1,18
Y2	172,95	167,90	5,04
Y3	166,75	154,74	12,02
Y4	166,30	168,12	-1,83
C1	129,51	113,83	15,68
C2	103,81	84,05	19,76
C3	390,35	396,47	-6,12
C4	406,25	396,47	9,77

TA 8. Contenido de fósforo

La determinación del contenido de fósforo se realizó mediante la técnica normalizada AOAC 991.25:2007, a partir de la solución de cenizas obtenida mediante la técnica **TA 6**. El mismo se basa en la reacción del P inorgánico con el reactivo de molibdovanadato, dando un compuesto amarillo, cuya absorbancia se lee a 400 nm.

TA 9. Análisis del perfil de carbohidratos y de ácidos orgánicos

Las concentraciones de carbohidratos (lactosa, glucosa, galactosa y galactooligosacáridos) y ácidos orgánicos (láctico, cítrico, orótico e hipúrico) fueron determinadas de acuerdo a Vénica et al. (2014) mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con dos detectores conectados en serie: UV e índice de refracción (IR) (Perkin Elmer, EE.UU.), que permitieron la cuali- y cuantificación de los ácidos orgánicos y los carbohidratos, respectivamente.

Se pesaron 5 g de la muestra de leche o yogur y se suspendieron en 50 mL con H₂SO₄ 0,01 mol/L. La suspensión se homogeneizó en Ultraturrax® (modelo T25, IKA, Alemania) y se centrifugó a 15000 g/20 min/4 °C. Se tomó el sobrenadante y se filtró a través de una membrana de 0,45 µm (Millex, Millipore, Brasil) y se inyectó en el cromatógrafo usando un loop de 60 µL. Se empleó una columna Aminex HPX-87H (300 mm × 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos). La separación se realizó en forma isocrática a 0,6 mL/min y a 65 °C usando H₂SO₄ 0,01 mol/L como fase móvil. Los compuestos se identificaron por comparación con los tiempos de retención de sustancias patrón (Sigma Aldrich, Estados Unidos) analizadas en condiciones similares. El software Chromera® fue empleado para el control, adquisición y procesamiento de los datos cromatográficos. La cuantificación de los compuestos identificados se realizó utilizando

curvas de calibrado construidas con los patrones correspondientes. Los resultados fueron expresados en g/100 g de muestra para los carbohidratos y en mg/100 g de muestra para los ácidos orgánicos.

TA 10. Análisis del perfil de compuestos volátiles

Los compuestos volátiles fueron aislados de la muestra de yogur por microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME). La separación, identificación y semi cuantificación se realizó por cromatografía gaseosa (GC) acoplada a dos detectores: ionización de llama (FID) y espectrometría de masas (MS).

La muestra de yogur (5 g), solución saturada de cloruro de sodio (5 mL) y una barra magnética fueron introducidos en un vial de vidrio (40 mL) provisto con tapa a rosca y con septum de silicona (PTFE/Silicone septa, Supelco, Estados Unidos). El vial se introdujo en un bloque de aluminio dispuesto sobre una manta calefactora/agitadora (IKA Instruments, Estados Unidos), y se mantuvo a 45 °C con agitación a 250 rpm. Una fibra de SPME (DVB/Car/PDMS 50/30 µm, Supelco, Estados Unidos), contenida en un soporte para muestreo manual, fue introducida en el espacio de cabeza del vial. Luego de 10 min, se expuso la fibra a 45 °C por 30 min. Los compuestos volátiles retenidos en la fibra fueron desorbidos térmicamente (250 °C/5 min; modo splitless) en el puerto de inyección del GC-FID (model 9000, Perkin Elmer, Estados Unidos) provisto de una columna HP-Innowax (60 m × 0,25 mm × 0,25 µm, Agilent JyW, Estados Unidos). La rampa de temperatura de la columna fue la siguiente: 45 °C (4 min), aumento de 8 °C/min hasta 150 °C (3 min), aumento de 10 °C/min hasta 250 °C (5 min). Se usó hidrógeno como gas carrier (2,0 mL/min) y la temperatura del FID se mantuvo a 290 °C.

Los picos cromatográficos fueron identificados tentativamente mediante comparación con los tiempos de retención de sustancias patrón (Sigma Aldrich, Estados Unidos) y con los índices de retención lineales (LRI) reportados en bibliografía para el mismo tipo de fase estacionaria (Bianchi et al., 2007). Para el cálculo de los índices de retención, una mezcla de n-alcenos (C7-C30; Sigma Aldrich, Estados Unidos) se analizaron en las mismas condiciones cromatográficas que las muestras y los LRI fueron calculados como se establece en Bianchi et al. (2007).

De manera de corroborar la identificación de los compuestos, la muestra también fue analizada por GC-MS (QP2010 ULTRA, Shimadzu Corporation, Japón) equipado con una columna SH-Rtx-Wax (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Restek Corporation, Estados Unidos). El caudal de gas carrier (helio) fue de 30,3 mL/min. El procedimiento de aislamiento de los compuestos volátiles de las muestras y las condiciones cromatográficas aplicadas fueron similares a las mencionadas para el GC-FID. La línea de transferencia fue mantenida a 250 °C. El método de ionización fue por impacto electrónico a 70 eV y los datos fueron adquiridos en el rango 42-300 m/z. Los compuestos se identificaron por comparación con los espectros de masa disponibles en las

librerías provistas por el software del equipo (NIST 14, NIST 14s, Wiley Registry 11th Edition, Estados Unidos).

Las áreas absolutas de las señales identificadas en los cromatogramas obtenidos mediante GC-FID, cuya identidad fue confirmada por GC-MS, fueron integradas con el software TotalChrom® (Perkin Elmer, Estados Unidos) y expresadas en unidades arbitrarias.

TA 11. Recuento de bacterias lácticas (BAL) totales

El recuento de BAL totales se realizó en medio Agar-Plate-Count (Britania, Argentina) con el agregado de leche en polvo (10% m/v), por siembra en superficie e incubación en microaerofilia a 37 °C/48 h (Vinderola et al., 2000). Para ello, se pesó 1 g de la muestra en condiciones de esterilidad (flujo laminar) y se agregaron 9 mL de agua de peptona de caseína estéril (0,01% m/v), obteniéndose la primera dilución ($1 \cdot 10^{-1}$). A partir de ésta se realizaron diluciones decimales sucesivas hasta $1 \cdot 10^{-8}$, las cuales se sembraron en placas con el medio de cultivo agarizado. El resultado se expresó en unidades formadoras de colonias (ufc)/g de muestra.

TA 12. Recuento diferenciado de *Streptococcus. thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*

El recuento de *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* se realizó en medio MRS agar acidificado (pH=5,4) (Biokar, Francia) por siembra en superficie e incubación a 37 °C/72 h en anaerobiosis. Para el recuento de *S. thermophilus* se empleó el medio M17 agarizado (Biokar, Francia), la siembra fue en superficie y la incubación a 37 °C/48 h (IDF 117A:1988). En ambos casos se efectuaron las diluciones correspondientes como se detalló en **TA 11**. El resultado se expresó en unidades formadoras de colonias (ufc)/g de muestra.

TA 13. Recuento de mohos y levaduras

El recuento de mohos y levaduras se realizó en medio extracto de levadura-glucosa-cloranfenicol agarizado (Biokar, Francia), por siembra en profundidad e incubación a 25 °C/5 d (Vinderola et al., 2000). Para ello, se efectuaron diluciones sucesivas como se detalló en el apartado **TA 11**, se sembraron las diluciones correspondientes en profundidad, se agregaron 10 mL del medio de cultivo fundido y se homogeneizó con la siembra. El resultado se expresó en unidades formadoras de colonias (ufc)/g de muestra.

TA 14. Recuento de coliformes totales

El recuento de coliformes totales se realizó en el medio VRBL agarizado (rojo violeta bilis lactosa) (Biokar, Francia), en el producto tal cual y en una dilución del mismo en agua de peptona estéril (0,1 g/mL). La siembra se realizó en profundidad, se agregaron 10 mL del medio de cultivo

fundido y se homogeneizó con la siembra. La incubación fue a 37 °C/24 h. El resultado se expresó en unidades formadoras de colonias (ufc)/g de muestra (Peralta et al., 2020).

TA 15. Capacidad de retención de agua (CRA)

La CRA fue determinada por pesada del suero liberado luego de la centrifugación de la muestra de yogur en condiciones estandarizadas (5000 g/20 °C/10 min) (Akalin et al., 2012).

Se pesaron 20 g de la muestra de yogur en un tubo de centrifuga de 50 mL de capacidad y se procedió a la centrifugación. Luego, se tomó el suero expulsado del yogur y se pesó. El análisis se hizo por duplicado. La CRA se calculó con la siguiente expresión y el resultado se expresó como %CRA:

$$\%CRA = \frac{\text{Peso muestra [g]} - \text{Peso suero [g]}}{\text{Peso muestra [g]}} \cdot 100 \text{ g muestra}$$

TA 16. Evaluación de las propiedades de gelificación/coagulación

TA 16.1. Método óptico: Optigraph®

La evolución de la formación del gel/coágulo durante la fermentación fue analizada mediante un equipo Optigraph® (Alliance, Francia), el cual está diseñado para estudiar la coagulación de leche para quesería, pero se adaptó para su uso en yogur. El fundamento de la metodología se basa en el registro de la atenuación de la señal óptica en el infrarrojo cercano (NIR) durante el proceso fermentativo en el que se forma el gel/coágulo, la que es transformada para obtener valores relacionados a las características del gel a través de una ecuación de calibración (Arango Bedoya, 2015). La luz del NIR es mayoritariamente dispersada por algunos componentes de la leche, es decir, ocurre poca absorción. En efecto, la dispersión de la radiación se debe principalmente a los glóbulos grasos y a las micelas de caseína (la dispersión debida a las proteínas de suero y las células somáticas es despreciable), y se encuentra relacionada con el grado de agregación y la firmeza del coágulo si la concentración total de caseína no varía durante la medición (Castillo, 2001). En consecuencia, durante una prueba de gelificación/coagulación la cantidad de luz emitida que atraviesa la leche se reduce progresivamente debido a los cambios en la estructura micelar de la caseína. Esta atenuación está influenciada por numerosos factores como el contenido de proteínas y grasa de la muestra (González Cocaro et al., 2017), o el tratamiento térmico que ocurre en la elaboración de yogur (Lucey, 2020).

Como la configuración del equipo está ideada para medir la coagulación en elaboración de quesos y siendo que la formación del gel de yogur es un proceso diferente y lento (4-6 h), fue necesario probar distintas condiciones, entre ellas variar los voltajes de aplicación (1, 3, 5 y 7 V)

y los períodos de medición (6 ó 36 s). Luego de algunas pruebas preliminares se encontró que el valor más apropiado para el seguimiento de la gelificación de yogur alto en proteínas fue de 3V, a diferencia de la recomendación de 1V que se emplea para quesos, y 36 s de período.

El equipo cuenta con diez cubetas termostatazadas, permitiendo realizar diez determinaciones en simultáneo, lo que representa una ventaja en comparación a la determinación individual mediante reometría oscilatoria de baja deformación. Las formulaciones de leche base (10 mL) fueron colocadas en las cubetas inmediatamente después de la inoculación del fermento. La temperatura se mantuvo a 42 ± 1 °C y el tiempo de adquisición de datos fue de 5 h. Se obtuvieron cuatro parámetros a partir de las curvas de coagulación (% intensidad de luz emitida vs. tiempo): **GT**, tiempo correspondiente al inicio de la gelificación (min) dado por el máximo de la primera derivada de la curva; **Ff**, firmeza final del gel (V); **GD**, densidad del gel al final de la coagulación (% intensidad emitida), calculada como la diferencia entre la firmeza final y la inicial; y **S**, velocidad de agregación (% intensidad emitida/min), representado por la pendiente de la región lineal de la curva (Serra et al., 2007).

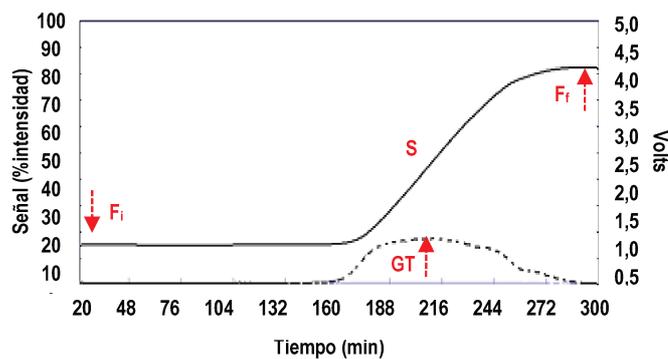


Fig. 1. Curva típica de %Intensidad vs. Tiempo obtenido mediante el Optigraph® durante la fermentación de yogur. Fi: firmeza inicial; Ff: firmeza final; S: velocidad de agregación; GT: tiempo correspondiente al inicio de la gelificación (Serra et al., 2007).

TA 16.2. Método reológico: reometría oscilatoria de baja deformación (SAOR)

La formación del gel fue estudiada por SAOR a un nivel de deformación del 0,5% y una frecuencia de 0,1 Hz (42 °C, hasta $\text{pH}=4,7-4,6$), con geometría de cilindros concéntricos en un reómetro de temperatura controlada (MCR 302e, Anton Paar, Estados Unidos) (Wilbanks et al., 2022). Se obtuvieron datos de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') y se calculó la tangente de pérdida ($\tan \delta$) durante la fermentación. En simultáneo, se realizaron mediciones de pH vs. tiempo de fermentación (Accumet XL600, Estados Unidos), lo que luego permitió obtener las curvas G' vs. pH durante la fermentación.

Las condiciones fueron seleccionadas para trabajar dentro de la región viscoelástica lineal para este tipo de muestras (Roefs et al., 1990). El inicio de la gelificación fue tomado como el momento en el cual el módulo de almacenamiento $G' \geq 1$ Pa (Lucey y Singh, 1998).

TA 17. Análisis reológico rotacional

TA 17.1. Configuración de cilindros concéntricos (CC)

Se obtuvieron las curvas de flujo (Esfuerzo de Corte vs. Velocidad de Corte) y de viscosidad dinámica (Viscosidad Aparente vs. Velocidad de Corte) por reometría rotacional de CC (5 mm de gap) a 5 °C en un reómetro con control de temperatura (HAAKE™ MARS 40, Thermo Scientific, Estados Unidos).

La muestra de yogur (~20 g) fue colocada en la copa y estabilizada a 5,0±0,1 °C por 5 min. Los barridos se realizaron en un rango de velocidades de corte de 0 a 300 s⁻¹ (ascendente y descendente). Los datos fueron ajustados mediante la Ley de Potencia utilizando el software RheoWin™ data manager (Thermo Scientific, Estados Unidos), y se calcularon los siguientes parámetros:

$$\sigma = k \gamma^n$$

donde σ es el esfuerzo de corte (Pa), k es el índice de consistencia (Pa.s), γ es la velocidad de corte (s⁻¹), y n es el índice de comportamiento de flujo (adimensional) (Huc et al., 2016, con modificaciones). La viscosidad aparente (η_a [Pa.s]) fue calculada a 50 s⁻¹ de velocidad de corte, considerado como el valor que se alcanza de manera aproximada durante la masticación en la boca, reflejando la mejor correlación con la percepción sensorial del producto (Krzeminski et al., 2011).

TA 17.2. Configuración de plato-plato (PP)

Se obtuvieron las curvas de flujo (Esfuerzo de Corte vs. Velocidad de Corte) y de viscosidad dinámica (Viscosidad Aparente vs. Velocidad de Corte) por reometría rotacional PP (1,5 mm de gap) a 25 °C en un reómetro con control de temperatura (HAAKE™ MARS 40, Thermo Scientific, Estados Unidos).

La muestra de yogur (~1,5 g) fue colocada en el plato fijo y estabilizada a 25,0±0,1 °C por 5 min. Los barridos se realizaron en un rango de velocidades de corte de 0 a 300 s⁻¹ (ascendente y descendente). Los datos fueron ajustados mediante la Ley de Potencia utilizando el software RheoWin™ data manager (Thermo Scientific, Estados Unidos), y se calcularon los siguientes parámetros:

$$\sigma = k \gamma^n$$

donde σ es el esfuerzo de corte (Pa), k es el índice de consistencia (Pa.s), γ es la velocidad de corte (s⁻¹), y n (adimensional) es el índice de comportamiento de flujo (adimensional) (Huc et al., 2016).

TA 18. Análisis reológico en condiciones orales simuladas**TA 18.1. Configuración de cilindros concéntricos (CC)**

Se obtuvieron las curvas de viscosidad en condiciones orales simuladas (Viscosidad Aparente vs. Temperatura), y de flujo (Esfuerzo de Corte vs. Velocidad de Corte) por reometría rotacional de CC (1,5 mm de gap) en un reómetro con control de temperatura (MCR 302e, Anton Paar, Estados Unidos).

La muestra (~20 g) fue colocada en la copa y estabilizada a $15,0 \pm 0,5$ °C/5 min. La medida de viscosidad se realizó a 60 s^{-1} de velocidad de corte, con una rampa de temperatura de 15 °C a 25 °C con un incremento de ~ 1 °C/s, y luego se sostuvo durante 1 min a 25 °C, resultando un tiempo total de 75 s. La pendiente de la región lineal de la curva fue calculada mediante regresión lineal, para evaluar de manera aproximada cómo varía la viscosidad del yogur durante el procesamiento oral (Huc et al., 2016, con modificaciones).

TA 18.2. Configuración de plato-plato (PP)

Se obtuvieron las curvas de viscosidad en condiciones orales simuladas (Viscosidad Aparente vs. Temperatura), y de flujo (Esfuerzo de Corte vs. Velocidad de Corte) por reometría rotacional PP (1,5 mm de gap) en un reómetro con control de temperatura (HAAKE™ MARS 40, Thermo Scientific, Estados Unidos).

Para el análisis de viscosidad en condiciones orales simuladas, la muestra (~1,5 g) fue colocada en el plato fijo y estabilizada a $10,0 \pm 0,5$ °C/5 min. La medida de viscosidad se realizó a 60 s^{-1} de velocidad de corte, con una rampa de temperatura de 10 °C a 25 °C con un incremento de ~ 1 °C/s, luego la misma velocidad de corte se sostuvo durante 1 min a 25 °C, resultando un tiempo total de 75 s. La pendiente de la región lineal de la curva fue calculada mediante regresión lineal, para evaluar de manera aproximada cómo varía la viscosidad del yogur durante el procesamiento oral (Huc et al., 2016).

TA 19. Perfil de textura (TPA)

Los parámetros de textura fueron evaluados por ensayo de penetración acorde a lo propuesto por Puvanenthiran et al. (2002), en una máquina universal de ensayos Instron Model 3344 (INSTRON, Estados Unidos). Se empleó una sonda cilíndrica ($\phi = 17,2$ mm) y se aplicaron dos ciclos de compresión a un nivel de deformación del 30%.

La muestra de yogur fue colocada en un vial (35 mm de diámetro) hasta una altura de 30 mm y se estabilizó a 10 °C/10 min. Una fuerza de contacto de 0,05 N fue aplicada a una velocidad de 1 mm/s con un intervalo de 5 s entre el primer y el segundo ciclo. El software Instron Bluehill® (INSTRON, Estados Unidos) fue empleado para el control del equipo y adquisición de datos. Se

obtuvieron los siguientes parámetros de las curvas Fuerza (N) vs. Tiempo de aplicación (s): firmeza (N), como fuerza máxima en el primer ciclo de compresión; cohesividad (adimensional), cociente entre el área positiva del segundo ciclo y el área negativa del primer ciclo; y adhesividad (adimensional), área negativa luego de la primera compresión, mediante el procesamiento de los datos en Excel.

TA 20. Microestructura

La microestructura del yogur fue visualizada por Microscopía Confocal Láser de Barrido (CLSM), con un microscopio confocal invertido con sistema de detección de alta sensibilidad espectral (Leica, model TCS SP8, Alemania). Se utilizó Rhodamina B como fluoróforo para la tinción de la proteína (0,2% m/v en etanol, 10 μ L/g de muestra preparada).

La muestra de yogur se diluyó en agua destilada (0,5% m/m), y una gota (50 μ L) fue dispuesta en un portaobjetos, cubierta con un cubreobjetos. Se observó con un lente objetivo 10x en seco a una longitud de onda de excitación de 568 nm. Numerosos campos fueron observados y se obtuvieron micrografías típicas.

TA 21. Morfología de los ingredientes lácteos

Se empleó un microscopio electrónico de barrido SEM Phenom World PRO X (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) para observar la morfología de los ingredientes proteicos en polvo. Las muestras fueron montadas en un soporte con cinta adhesiva de carbono, distribuidas homogéneamente y el exceso fue removido con aire comprimido en aerosol. El SEM fue operado a un voltaje de aceleración de 10 kV. Se observaron numerosos campos y se obtuvieron micrografías características con un aumento de 500x.

Capítulo 1

Empleo de ingredientes de proteínas de suero (WPC35 y MWP) en la formulación de yogures incrementados en proteínas

Resumen

En este capítulo, el objetivo fue estudiar el impacto del agregado de dos ingredientes de proteínas de suero en polvo: concentrado de proteínas de suero al 35% (WPC35) y proteínas de suero microparticulada con 45% de proteína (MWP), en la composición global, parámetros fisicoquímicos, perfiles de fermentación y de compuestos volátiles, y propiedades estructurales (comportamiento reológico, perfil de textura y microestructura) de yogures incrementados en proteínas. Para esto, se elaboraron a escala laboratorio, cuatro yogures parcialmente descremados (<1,5 g/100 g de grasa) empleando leche parcialmente descremada, leche en polvo descremada (SMP), WPC35 y MWP. Los ingredientes se combinaron para obtener dos niveles proteicos (7,0 g/100 g y 7,5 g/100 g), dando lugar a relaciones CN:WP de 2:1 y 1,5:1. En primera instancia, se evaluó el efecto de la formulación y de dos tratamientos térmicos (85 °C/20 min y 90 °C/10 min) sobre algunos parámetros estructurales que afectan la calidad del producto, como la capacidad de retención de agua y el comportamiento reológico evaluado a través de reometría rotacional (con geometría CC). Los resultados demostraron que la composición tuvo un impacto en estos parámetros, mientras que el tratamiento térmico no fue significativo, por lo que se optó por uno de ellos para completar la experiencia.

Posteriormente, se estudió el efecto de la formulación de las leches base (LB) sobre la formación del gel durante la fermentación (mediante medidas ópticas en el infrarrojo cercano, empleando un equipo Optigraph®), la composición global, parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y estructurales y fracción compuestos volátiles de los yogures al final del almacenamiento (21 d). Las diferencias encontradas en los parámetros de formación del gel y en la estructura de los productos finales fueron asociadas al tipo de ingrediente de proteínas de suero, dado por sus diferentes tecnofuncionalidades y características morfológicas (observadas a través de microscopía electrónica de barrido). Las micrografías de los yogures, obtenidas por microscopía confocal láser de barrido, permitieron detectar diferencias que se correlacionaron con otros resultados estructurales como el índice de consistencia, calculado luego de ajustar las curvas de flujo con la Ley de Potencia, los parámetros de textura y la capacidad de retención de agua. Se pudieron observar algunas diferencias en la composición de los yogures (contenido proteico). Un total de 18 compuestos volátiles fueron identificados, pertenecientes a las familias químicas de las cetonas, ácidos y aldehídos. Diferencias cuantitativas fueron encontradas en algunos compuestos de relevancia para el *flavor* (acetaldehído, diacetilo, acetoina, algunos ácidos y metilcetonas), lo que se asoció con los distintos ingredientes empleados. Los niveles de lactosa de partida fueron elevados, y en consecuencia también lo fueron en los productos a los 21 d.

1. Materiales y métodos

1.1. Materiales

Los ingredientes empleados para la elaboración de los yogures fueron leche UHT parcialmente descremada (1 g/100 mL de grasa, 3,2 g/100 mL de proteína) (García Hnos. Agroindustrial S.R.L, Argentina), leche en polvo descremada (SMP) (0 g/100 g de grasa, 36 g/100 g de proteína) (Ilolay, Argentina), concentrado de proteínas de suero al 35% en polvo (WPC35) (Milkaut S.A., Argentina), proteínas de suero microparticuladas en polvo (MWP) (Nutrilac CH-4560, Arla Foods, Dinamarca), pectina SY 640 (Danisco, Alemania), y fermento liofilizado de adición directa para yogur YF-L811 (Chr. Hansen, Dinamarca).

En la **Tabla 1.1** se muestra la composición global de los ingredientes de proteínas de suero empleados. Además, estos ingredientes fueron caracterizados desde el punto de vista morfológico por microscopía electrónica de barrido (SEM) y se analizó su contenido de calcio.

Tabla 1.1. Composición de los ingredientes en polvo en base húmeda (según especificaciones técnicas de los fabricantes)

	Proteína (g/100 g)	Grasa (g/100 g)	Cenizas (g/100 g)	Humedad (g/100 g)	Lactosa* (g/100 g)
WPC35	≥34,5	≤6,0	≤8,6	≤4,5	46,4
MWP	43,0-47,0	≤6,0	≤6,0	≤5,0	40,0

*Calculado por diferencia

1.2. Caracterización de los ingredientes de proteínas de suero

El estudio de la morfología de los polvos de WPC35 y MWP fue realizado por SEM, como se describe en el apartado **TA 21**. También se determinó el contenido de calcio total por potenciometría con un electrodo selectivo de iones (ISE) (**TA 7**), a partir de las cenizas de los ingredientes (**TA 6**).

1.3. Diseño experimental

Se diseñaron cuatro formulaciones, dos con WPC35 (W1 y W2) y dos con MWP (M1 y M2), en las que los ingredientes mencionados fueron combinados en diferentes proporciones para obtener diferentes contenidos proteicos dando lugar a distintas relaciones CN:WP. El contenido de grasa fue similar en todos los casos (**Tabla 1.2**).

Tabla 1.2. Diseño experimental de los yogures

Parámetros	Yogur			
	W1	W2	M1	M2
Contenido de proteína (g/100 g)	7,5	7,0	7,5	7,0
Relación CN:WP	1,5:1	2:1	1,5:1	2:1
Contenido de grasa (g/100 g)	1,2	1,2	1,2	1,2

Las elaboraciones se realizaron por triplicado en diferentes días. El protocolo de elaboración implementado y los análisis realizados se indican a continuación.

1.4. Experiencias preliminares

En una instancia preliminar se evaluó el efecto de dos tratamientos térmicos aplicados durante la elaboración y de la composición de las formulaciones, sobre algunos parámetros estructurales (capacidad de retención de agua y comportamiento reológico) de los yogures, que afectan su calidad.

1.4.1. Preparación del fermento y dosis del inóculo

La preparación del fermento se realizó acorde a la dosis recomendada por el fabricante: 0,2 U/L. Para esto, 0,55 g del fermento (equivalente a 2,75 U) fue disuelto en 50 mL de leche estéril a ~40 °C, aproximadamente 20 min antes de la inoculación. Se inocularon 0,5 mL cada 100 mL de leche base (0,027 U/100 mL \equiv 0,27 U/L).

1.4.2. Elaboración de yogur

Los yogures fueron elaborados a escala laboratorio (~500 mL) según el diseño indicado en la **Tabla 1.2**. Se siguió un protocolo tradicional de elaboración de yogur batido (Tamime, 2002), con modificaciones. Para W1 y W2, se usó WPC35 en dos niveles (5,5 y 3,5 g/100 g, respectivamente) y para M1 y M2, se empleó MWP en dos niveles (4,0 y 2,5 g/100 g, respectivamente). En todos los casos, se incorporaron 7,5 g de SMP/100 g y pectina (0,15 g/100 g). Los ingredientes en polvo se disolvieron en la masa de leche UHT calculada para lograr las concentraciones propuestas.

Las mezclas fueron almacenadas (5 °C/20 h) para conseguir una correcta hidratación de los ingredientes en polvo. Posteriormente, fueron homogeneizadas (Ultraturax®, IKA Instruments, Estados Unidos) y tratadas térmicamente. Se ensayaron dos tratamientos térmicos: 85 °C/20 min y 90 °C/10 min, en un baño termostático (HH-W420, Thermostatic Water Cabinet, China). Se

enfriaron a la temperatura de fermentación (42 °C) y se inoculó con el fermento según lo descrito en el apartado **1.4.1**. La fermentación se condujo a 42,0±0,5 °C hasta que el pH descendió a 4,75±0,05. Los yogures fueron enfriados (18-20 °C), agitados manualmente (mediante movimientos envolventes del frasco) y almacenados a 5 °C por 21 d.

1.4.3. Análisis realizados

Se analizó la capacidad de retención de agua (CRA, **TA 15**) y el comportamiento reológico mediante reometría rotacional con geometría CC (**TA 17.1**) en los yogures a los 21 d.

1.4.4. Análisis estadístico

Se aplicó ANOVA de dos vías para determinar si el efecto de los factores formulación y tratamiento térmico, y su interacción, fueron significativos sobre las variables CRA, índice de consistencia (k) y viscosidad aparente (η_a) con un nivel de significancia $p < 0,05$. Se utilizó test de Tukey para comparar las medias con un nivel de significancia $p < 0,05$. El software empleado fue Statgraphics Centurion XVI (Royal Technology S.A., Estados Unidos).

1.5. Estudio del efecto de la formulación sobre la formación del gel, parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y estructurales, perfiles de fermentación y de compuestos volátiles.

1.5.1. Diseño experimental

El diseño de la experiencia fue similar al expresado en la **Tabla 1.2**.

1.5.2. Elaboración de yogur y análisis

La elaboración de los yogures se realizó acorde a la metodología indicada en el apartado **1.4.2** de este Capítulo, empleando el tratamiento térmico de 85 °C/20 min.

En esta oportunidad se monitoreó la dinámica de fermentación mediante mediciones de pH (**TA 1**) y de formación del gel (**TA 16.1**). La acidez titulable (AT) fue medida antes de la fermentación, en la leche base (LB) (**TA 1**). El oxígeno disuelto (OD) se analizó al inicio y al final de la fermentación (**TA 2**). Los perfiles de carbohidratos y de ácidos orgánicos se determinaron en la LB y en los yogures a los 21 d (**TA 9**). A los 21 d, se evaluó el pH, la AT, la composición química (proteína, grasa, sólidos totales -ST-, cenizas, y calcio total), los perfiles de compuestos volátiles, los recuentos microbiológicos, la CRA, el comportamiento reológico con geometría CC, el perfil de textura (TPA) y la microestructura (**TA 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 15, 17.1, 19 y 20**, respectivamente).

Todas las muestras de yogur requeridas para los análisis a los 21 d fueron tomadas de la masa total del yogur, excepto las muestras para los análisis de TPA y reología, que se tomaron el día de la elaboración luego del paso de enfriamiento y agitación, se almacenaron en viales de 50 mL y se conservaron en refrigeración (5 °C) hasta el momento del análisis para evitar la perturbación de la estructura.

En la **Fig. 1.1** se muestra el esquema de muestreo y las determinaciones analíticas llevadas a cabo.

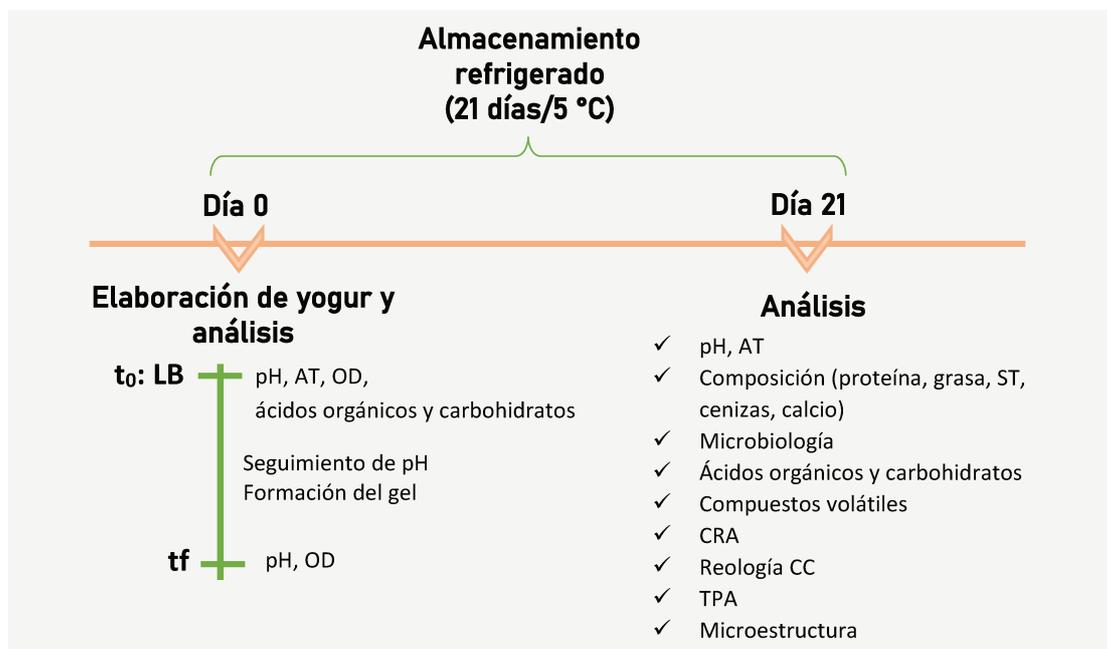


Fig. 1.1. Esquema de muestreo y controles analíticos realizados durante la elaboración y almacenamiento de los yogures.

AT: acidez titulable; OD: oxígeno disuelto; ST: sólidos totales; CRA: capacidad de retención de agua; CC: cilindros concéntricos; TPA: análisis de perfil de textura.

1.5.3. Análisis estadístico

Se aplicó ANOVA de una vía con un nivel de significancia de $p < 0,05$ para determinar diferencias en los parámetros medidos entre las formulaciones. La comparación de medias se realizó aplicando test de Tukey con un nivel de significancia $p < 0,05$. También se aplicó test-t de Student para muestras pareadas con un nivel de significancia $p < 0,05$ a las concentraciones de OD y de ácidos orgánicos y carbohidratos, para comparar el efecto de la fermentación y almacenamiento en cada formulación.

El software empleado fue Statgraphics Centurion XVI (Royal Technology S.A., Estados Unidos).

2. Resultados y discusión

2.1. Caracterización de los ingredientes proteicos

2.1.1. Microscopía SEM

Las micrografías SEM de los ingredientes de proteínas de suero, WPC35 y MWP, se muestran en la **Fig. 1.2**.

Para el WPC35, las partículas no fueron uniformes en cuanto a su tamaño y morfología, observándose numerosos aglomerados. Algunas partículas esféricas pequeñas se encontraban dispersas en la superficie, de forma individual o asociadas con partículas más grandes formando aglomerados de aproximadamente 100 μm . Por otro lado, para el MWP se pueden observar partículas esféricas de tamaños más uniformes ($\sim 50 \mu\text{m}$), aunque también aparecieron algunos aglomerados de tamaño similar a los observados en el WPC35. La distribución de partículas del MWP parece más homogénea que lo observado en WPC35. Estos aspectos estructurales han sido reportados para WPC (Gaiani et al., 2021) y MWP (Toro-Sierra et al., 2013).

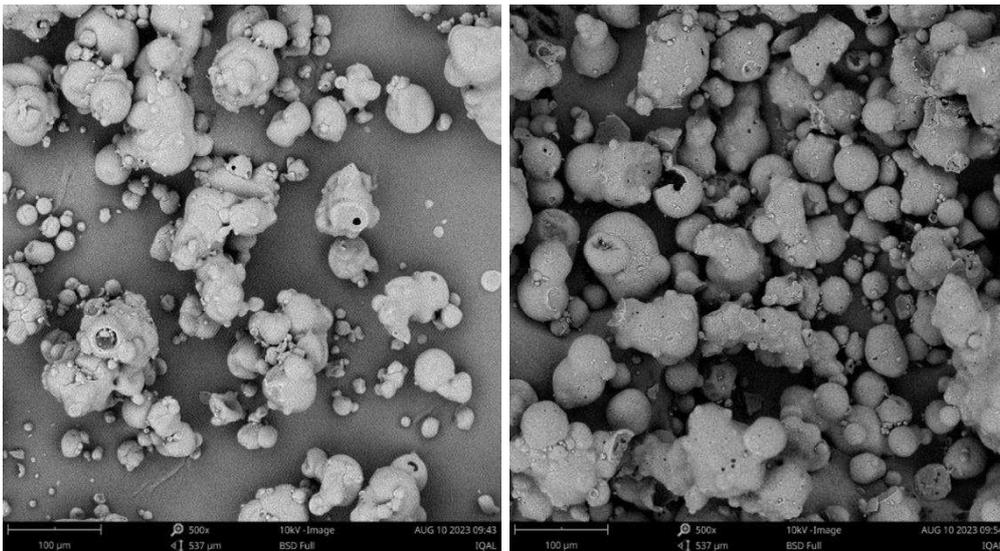


Fig. 1.2. Micrografías SEM de WPC35 (izq.) y MWP (der.)

2.1.2. Contenido de calcio

El contenido de calcio total fue 494 mg/100 g en WPC35 y 565 mg/100 g en MWP. Estos valores coinciden con los reportados previamente (Tamime, 2009). La incorporación de estos ingredientes, además de incrementar el contenido proteico, también aumenta el nivel de calcio en los productos. Como se mencionó previamente, el calcio aporta beneficios a la salud del consumidor, y los productos lácteos son la fuente más biodisponible de este mineral (Barone et al., 2022).

2.2. Experiencias preliminares

Las fermentaciones registraron distintos tiempos totales para alcanzar el pH target: 280 ± 8 min para $85\text{ }^{\circ}\text{C}/20$ min y 300 ± 7 min para $90\text{ }^{\circ}\text{C}/10$ min; este resultado indica que las fermentaciones en las que se aplicó el tratamiento térmico de $85\text{ }^{\circ}\text{C}/20$ min fueron las de menor duración.

Dentro de los parámetros estudiados, tanto la formulación como el tratamiento térmico fueron significativos sobre el índice de consistencia k , pero la interacción entre factores no tuvo efecto significativo. Los valores se ubicaron entre 47-97 Pa.s para los yogures tratados a $85\text{ }^{\circ}\text{C}/20$ min y entre 33-58 Pa.s para aquellos tratados $90\text{ }^{\circ}\text{C}/10$ min. El parámetro k fue mayor en los yogures W ($W1 \cong W2 > M1 \cong M2$). La viscosidad aparente (η_a) (a 50 s^{-1}) mostró diferencias según la formulación, pero no resultó significativamente afectada por el tratamiento térmico; W2 fue mayor a M2 y los otros yogures (W1 y M1) no mostraron diferencias con W2 y M2. Los valores de η_a fueron 1,9-3,0 Pa.s para los yogures tratados a $85\text{ }^{\circ}\text{C}/20$ min y 1,5-2,1 Pa.s para los yogures tratados a $90\text{ }^{\circ}\text{C}/10$ min. Por su parte, la CRA solo mostró diferencias significativas entre las distintas formulaciones, pero no por el tratamiento térmico; M1 fue mayor a W1, siendo W2 y M2 similares a ambos. Los valores obtenidos fueron 55-58% para los yogures tratados a $85\text{ }^{\circ}\text{C}/20$ min y 52-63% para los yogures tratados a $90\text{ }^{\circ}\text{C}/10$ min.

De los dos tratamientos térmicos evaluados, se optó por el de $85\text{ }^{\circ}\text{C}/20$ min para las próximas experiencias de elaboración de yogur, ya que se consiguieron yogures con mayor consistencia y viscosidad y además ofrece la ventaja de ser más fácilmente aplicable en las condiciones de trabajo a escala laboratorio. En cuanto a las formulaciones, si bien se encontraron algunas diferencias entre ellas, se decidió continuar con las cuatro, para profundizar el estudio en otros parámetros.

2.3. Estudio del efecto de la formulación

2.3.1. Evolución de la fermentación

La evolución de la fermentación se estudió a través de mediciones de pH, AT, OD y formación del gel.

El progreso del pH durante la fermentación se muestra en la **Fig. 1.3**.

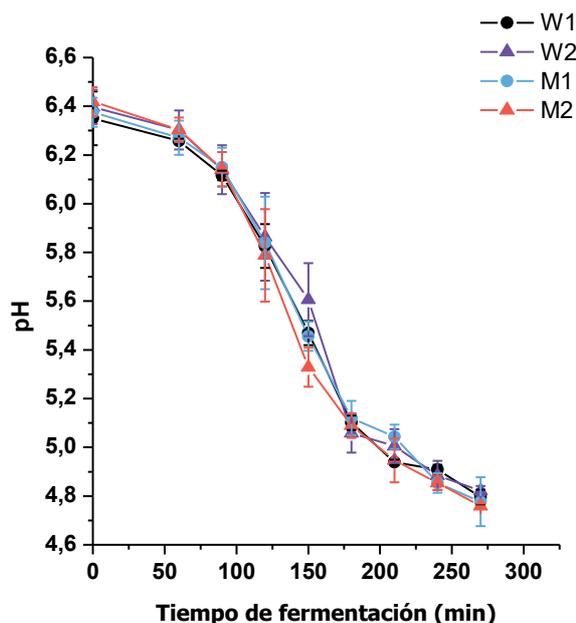


Fig. 1.3. Evolución de pH durante la fermentación de los yogures.

Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de 3 réplicas de elaboración.

La cinética de acidificación es afectada por numerosos factores: las tecnologías empleadas para formular yogures altos en proteína (concentración por membrana, incorporación de ingredientes en polvo, etc.), la relación CN:WP, la capacidad buffer, el grado de desnaturalización proteico, el contenido de minerales, la concentración de OD, entre otros (Heck et al., 2021). El pH target ($4,75 \pm 0,05$) fue alcanzado en 270 min en todos los casos. La AT inicial fue similar en todas las formulaciones: $29,5 \pm 1,6$; $26,0 \pm 13,0$; $28,5 \pm 1,2$ y $27,5 \pm 3,0$ °D, para W1, W2, M1 y M2, respectivamente. Estos valores resultaron mayores a los obtenidos por Vénica et al. (2014), en donde las LB (preparadas con SMP y WPC35) con 3,3-4,5 g/100 g de proteína y 3 g/100 g de grasa, registraron valores entre 13 y 20 °D y menores tiempos de fermentación (~250 min). En línea con lo propuesto por Jørgensen et al. (2019) y Heck et al. (2021), los yogures incrementados en proteínas muestran mayores tiempos de fermentación y mayores valores de AT, en general, atribuido a la mayor capacidad buffer de la mezcla de partida. De hecho, Vénica et al. (2023b) reportaron 20-23 °D en LB con 4,7-5,5 g/100 g de proteína y 1,5 g/100 g de grasa preparadas con distintos ingredientes (SMP, WPC40, WPI, WPC80, WPH y suero desmineralizado en polvo); en esta oportunidad las fermentaciones demoraron 255-260 min dependiendo de la formulación. La capacidad buffer está relacionada con la composición y distribución de minerales y proteínas en la leche. Las proteínas de suero tienen máxima capacidad buffer a pH 3-4 dado por los aminoácidos ácidos, y las caseínas a pH 5,0-5,5 dado por los residuos de fosfoserina e histidina (Salaün et al., 2005). Es decir, el efecto buffer en una fermentación de yogur estaría asociado a las caseínas.

La velocidad de acidificación no fue afectada por las diferentes relaciones CN:WP de las formulaciones. Contrariamente, Jørgensen et al. (2015) observaron que el tiempo de fermentación aumentó con el aumento de la relación CN:WP en yogures altos en proteína (8 g/100 g de proteína) formulados con un concentrado de caseína y WPC nativo, ambos obtenidos por microfiltración. Los valores reportados fueron de 355 min para 1,22:1; 385 min para 1,85:1; 410 min para 3:1 y 445 min para 9:1. Es decir, a mayor concentración de caseína en el sistema el tiempo de fermentación se prolonga y esto se debe al efecto buffer que provoca el fosfato de calcio coloidal (CCP) asociado a las mismas. El impacto de la composición en la capacidad buffer (medido a través de la AT en las leches base y en la evolución del pH durante la fermentación) será retomado en el **Capítulo 2**, donde este efecto fue más marcado.

Las concentraciones de OD (mg/L) al inicio y final de la fermentación se presentan en la **Fig. 1.4**.

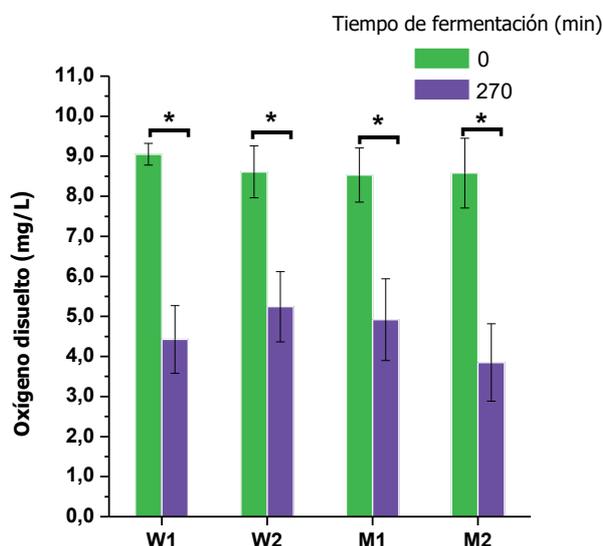


Fig. 1.4. Concentración de OD a tiempo inicial (0 min) y final (270 min) de la fermentación de los yogures.

Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de 3 réplicas de elaboración.

* indica diferencias significativas entre puntos de muestreo para una misma formulación ($p < 0,05$).

En todos los casos, las concentraciones disminuyeron a lo largo de la fermentación como consecuencia del metabolismo bacteriano, desde 8,5-9,0 mg/L hasta 3,8-5,2 mg/L. No se encontraron diferencias significativas entre las formulaciones para un mismo tiempo. *S. thermophilus* and *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* son bacterias anaerobias facultativas. Horiuchi y Sasaki (2012) estudiaron la fermentación de leche con cepas de *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* como cultivos individuales y en combinación. La presencia de OD no inhibió la producción de ácido láctico en las leches inoculadas con las cepas individuales, pero si afectó la relación simbiótica en las leches inoculadas con ambas cepas: la producción de formiato (o

ácido fórmico) por parte del *S. thermophilus* disminuyó, lo cual provocó una menor actividad proteolítica y acidificante del *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus*. Contrariamente, una notoria aceleración de la fermentación fue observada en la leche inoculada con el cultivo combinado cuando el OD fue suprimido del sistema.

Los parámetros de formación del gel obtenidos con Optigraph® se muestran en la **Tabla 1.3**.

Tabla 1.3. Parámetros de formación del gel durante la fermentación obtenidos con el equipo Optigraph®.

Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de 3 réplicas de elaboración.

Parámetros	Yogur			
	W1	W2	M1	M2
GT (min)	152 \pm 7 ^b	168 \pm 5 ^{a,b}	187 \pm 4 ^a	186 \pm 7 ^a
Ff (V)	5,4 \pm 1,0 ^c	10,7 \pm 1,9 ^b	16,2 \pm 1,3 ^a	15,2 \pm 1,9 ^a
GD (%intensidad)	13,5 \pm 1,8 ^c	26,35 \pm 3,0 ^b	40,2 \pm 2,1 ^a	39,1 \pm 1,9 ^a
S (%intensidad/min)	NC	0,33 \pm 0,04 ^a	0,13 \pm 0,02 ^b	0,13 \pm 0,02 ^b

GT: tiempo de gelificación; Ff: firmeza final; GD: densidad del gel; S: velocidad de agregación.

Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre yogures ($p < 0,05$).

NC: no calculado por el equipo.

M1 y M2 requirieron mayor tiempo de gelificación (GT) comparativamente a W1. A partir de las curvas de pH vs. Tiempo de fermentación (**Fig. 1.3**) se extrajeron los valores de pH correspondientes al punto de gelificación: 5,05 para M2, 5,10 para M1, 5,35 para W2 y 5,45 para W1. Mayores valores de firmeza final (Ff) y densidad del gel (GD) fueron encontrados en M1 y M2, y menores en W1. Las velocidades de agregación (S) de M1 y M2 fueron similares entre sí y menores que en W2, mientras que para W1 este parámetro no pudo ser registrado por el equipo, lo que podría atribuirse a una interferencia en la absorción de la radiación por la presencia de grumosidad en este yogur.

Puvanenthiran et al. (2002) emplearon SMP de bajo tratamiento térmico y WPC40 para formular yogures con 4 g/100 g de proteína y relaciones CN:WP de 0,5:1 y 2,9:1. En dicho estudio, observaron un incremento en el pH de gelificación con el incremento del contenido de proteínas de suero (pH 5,75 para la relación 0,5:1 vs. pH 5,30 para la relación 2,9:1); este resultado fue explicado por el mayor punto isoeléctrico que presentan las proteínas de suero (presentes en el WPC40) respecto a las caseínas. En nuestro trabajo, se pudo visualizar una tendencia similar para los yogures W1 y W2; es decir, a mayor proporción de proteínas de suero (como lo que se tiene en W1 respecto a W2) se observó un mayor pH de gelificación. Torres et al. (2016) estudiaron las propiedades de gelificación de diferentes geles modelo acidificados con glucono-delta-lactona (6,5 g/100 g de proteína), formulados con WPC80 y MWP, que fueron combinados

con SMP de bajo tratamiento térmico. Estos autores encontraron que los geles con WPC80 mostraron menores tiempos de gelificación que aquellos con MWP, resultados similares a los obtenidos en nuestro trabajo. Este hecho fue explicado por el mayor grado de desnaturalización de las proteínas de suero en el MWP respecto al WPC80. Aparentemente, un mayor grado de desnaturalización de las proteínas de suero, como consecuencia del proceso de manufactura del ingrediente, podría implicar una menor interacción de las proteínas de suero con las micelas de caseína durante el tratamiento térmico aplicado en la elaboración del yogur, provocando un retardo en la gelificación. Similares resultados fueron reportados por Silva y O'Mahony (2018), quienes encontraron mayores tiempos de gelificación en geles de leche a medida que la concentración de MWP se incrementó con respecto a un control (sin agregado de MWP). El MWP tendría poca interacción con las caseínas y afectaría la agregación de las caseínas entre sí durante la fermentación. Este efecto es más marcado con el incremento del nivel de agregado. Consecuentemente, la velocidad de agregación de las partículas de caseína durante la formación del gel se ve disminuída, conduciendo a un retraso en la gelificación.

En relación al grado de desnaturalización de las proteínas de suero, Guzmán-González et al. (2000) informaron valores en el rango de 4-25% para WPC comerciales con diferente contenido proteico (35, 36, 74, 70, 77 y 80 g/100 g). Aun así, estos valores fueron menores al nivel de desnaturalización encontrado en ingredientes de MWP (29-87%) por Torres et al. (2011) y Torres et al. (2018). Debido a que en nuestro trabajo la velocidad de agregación de los yogures M1 y M2 fue menor a la de W2, y los tiempos de gelificación de M1 y M2 fueron mayores a W1, podría sugerirse que el ingrediente MWP empleado tiene mayor grado de desnaturalización que el WPC35.

El monitoreo de la gelificación por medidas ópticas en el NIR fue empleado para estudiar la gelificación de yogur y geles lácteos. Por ejemplo, Serra et al. (2007) utilizaron Optigraph® para yogures (4 g/100 g de proteína) formulados con leche tratada por homogenización a alta presión en diferentes condiciones (temperatura y presión de homogeneización, en una o dos etapas). Un sensor de fibra óptica de retrodispersión de la luz de infrarrojo cercano (operado a 880 nm) fue desarrollado por Arango et al. (2020) para monitorear la coagulación durante la fermentación de yogures con ~4 g/100 g de proteína, diferentes contenidos de grasa (0,4-3,6 g/100 g) y con agregado de inulina (0,0-3,2 g/100g), y correlacionar estas mediciones con las medidas de pH y los parámetros reológicos (obtenidos por reometría oscilatoria de baja deformación) empleando modelos matemáticos. Una ventaja de utilizar el equipo Optigraph® respecto al método NIR propuesto por Arango et al. (2020) o al uso de reometría SAOR es que se puede realizar el seguimiento de 10 muestras simultáneamente. Según lo publicado hasta la fecha, no se ha reportado el uso de métodos ópticos por NIR para el seguimiento de la gelificación/coagulación en yogures altos en proteína.

2.3.2. Composición global y parámetros fisicoquímicos de los yogures

La composición química (proteína, grasa, ST, cenizas y calcio), pH, AT y CRA de los yogures al final del almacenamiento (21 d) se muestra en la **Tabla 1.4**.

Tabla 1.4. Composición global, pH, AT y CRA de los yogures a los 21 d de almacenamiento.

Parámetros	Yogur			
	W1	W2	M1	M2
pH	4,62±0,14	4,53±0,09	4,56±0,12	4,53±0,11
AT (° D)	144,13±5,66	144,48±1,41	148,23±1,92	142,23±5,32
Proteína (g/100 g)	7,78±0,08 ^a	6,99±0,09 ^b	7,72±0,12 ^a	7,03±0,11 ^b
Grasa (g/100 g)	1,15±0,39	1,10±0,28	1,12±0,19	1,07±0,20
ST (g/100 g)	20,04±0,61 ^a	18,44±0,69 ^b	19,09±0,66 ^{ab}	17,87±0,42 ^b
Cenizas (g/100 g)	1,53±0,09	1,44±0,10	1,56±0,05	1,48±0,12
Calcio (mg/100g)	168,21±13,85	161,59±9,00	163,37±7,47	161,48±9,28
CRA (%)	60,23±0,77	55,35±1,05	58,18±2,49	56,50±3,21

Los resultados se expresan como el valor medio ± desviación estándar de 3 réplicas de elaboración. Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre yogures ($p < 0,05$).

El contenido de proteína en todos los casos fue $>5,6$ g/100 g, por lo que pueden incluirse en la categoría de leches fermentadas concentradas (FAO/OMS, 2011a); los valores fueron los esperados, y mayores en W1 y M1 que en W2 y M2. El contenido de grasa fue similar en todas las muestras, $\sim 1,1$ g/100g, por lo que los productos pueden ser clasificados como parcialmente descremados según el Código Alimentario Argentino (CAA, 2006). Los ST alcanzaron 18-20 g/100 g en concordancia con el agregado de ingredientes en polvo ($W1 > W2 \cong M2$). La AT fue < 150 °D en todos los casos y coincide con lo establecido en la legislación (CAA, 2006). El pH disminuyó a $\sim 4,5$ a los 21 d. Los valores de post acidificación, calculados como la diferencia de pH al final del almacenamiento respecto al valor inicial, fueron bajos (Δ pH: 0,15-0,23) (Chuah y Mao, 2020).

Los contenidos de cenizas ($\sim 1,5$ g/100 g) y de calcio total (161-168 mg/100 g) fueron similares en todas las muestras. El contenido de calcio en yogur está vinculado con su concentración en la leche base y consecuentemente con los ingredientes empleados para su formulación (apartado 2.1.2). En yogures tradicionales bajos en grasa (4,4 g/100 g de proteína, 0,1 g/100 g de grasa), el nivel de calcio encontrado fue de 143 mg/100 g (Hashemi Gahrue et al., 2015). Similarmente, en un relevamiento de yogures batidos y firmes con contenido tradicional de proteína (4 g/100 g) y distinto contenido graso, comercializados en la región de Santa Fe, se reportaron valores promedio de 150 mg/100g (Wolf y Heer, 2015). Otros autores reportaron mayores niveles de calcio (180-

260 mg/100g) para yogures altos en proteína (8,2-8,5 g/100 g) formulados con un concentrado de caseína y con WPC nativo, ambos obtenidos por microfiltración (Jørgensen et al., 2015). De hecho, el uso de ingredientes basados en caseína aumenta la concentración de calcio en yogur ya que dos tercios del calcio total de la leche está unido a las micelas de caseína (Gaucheron, 2005).

La CRA no mostró diferencias significativas entre los yogures y los valores se encontraron entre 55,3–60,2%. La capacidad de retención de agua por parte del gel lácteo puede ser explicada por la estructura proteica, principalmente basada en el entrecruzamiento entre las caseínas y las proteínas de suero desnaturalizadas que se produce durante el tratamiento térmico en la elaboración de yogur (Lucey et al., 1999). Además, numerosos factores influyen en este parámetro, tales como la composición de la leche, el tipo y cantidad de ingredientes lácteos y no lácteos, los hidrocoloides empleados, el tipo de fermento empleado (por su capacidad para generar exopolisacáridos, que son moléculas que tienen la capacidad de modificar las propiedades reológicas de los productos lácteos, además de que pueden ejercer propiedades benéficas), etc. (Ale et al., 2023; Amatayakul et al., 2006; Liu et al., 2017). Resultados variables se han reportado para el efecto de la formulación de yogures altos en proteínas sobre la CRA. Brodziak et al. (2020) prepararon yogures (5,9 g/100 g de proteína y 4,6 g/100 g de grasa) con adición de distintos niveles de WPC80: los valores de CRA a los 21 d fueron 66-70%, sin diferencias por el nivel de agregado de WPC80. Vénica et al. (2023b) hallaron menores valores (47,5%) que los obtenidos en nuestro estudio, para un yogur con 5 g/100 g de proteína formulado con SMP y WPC40. Sodini et al. (2005) usaron diferentes WPC35 comerciales en yogures (4,0-4,2 g/100 g de proteína) y los valores de CRA fueron 60-63%, y resultaron ser un 25% más altos que el valor obtenido para un yogur con similar contenido de proteína, pero formulado solo con SMP. En un estudio con diferentes MWP comerciales, Torres et al. (2018) informaron mayores valores de CRA (77-96%) que lo obtenido en nuestro trabajo, para yogures con 4,25 y 5,0 g/100 g de proteína y 0,5 g/100 g de grasa elaborados con SMP y MWP; los yogures con 5,0 g/100 g de proteína preparados con MWP con menor grado de desnaturalización, fueron los que tuvieron mayores niveles de CRA, y sus microestructuras revelaron agregados proteicos más pequeños. Por su parte, Silva y O'Mahony (2018) encontraron menor CRA en geles de leche con alto nivel proteico y con agregado de MWP respecto al gel control sin este ingrediente. Es importante tener en cuenta que las técnicas para medir la CRA son variadas en la bibliografía, y la aplicación de diferentes condiciones (en particular, tiempo, temperatura y velocidad durante la centrifugación) puede conducir a resultados muy dispares (Lucey et al., 1998).

2.3.3. Recuentos microbianos de los yogures

El recuento de BAL totales fue elevado y similar en todos los yogures (8,13±0,10; 8,23±0,01; 8,14±0,04 y 8,27±0,02 log ufc/g para W1, W2, M1 y M2, respectivamente). El recuento de mohos

y levaduras fue $<1 \log \text{ ufc/g}$. Estos resultados cumplen con la normativa vigente, la cual establece que el recuento de BAL debe ser $>10^7 \text{ ufc/g}$, y el de mohos y levaduras $<10 \text{ ufc/g}$ (CAA, 2007).

2.3.4. Perfiles de carbohidratos y de ácidos orgánicos de las leches base y de los yogures

Las concentraciones de carbohidratos y de ácidos orgánicos de las LB y de los yogures (21 d) se muestran en la **Tabla 1.5**.

Tabla 1.5. Ácidos orgánicos (mg/100 g) y carbohidratos (g/100 g) de las leches base y de los yogures (21 d).

Compuestos	Leche base			
	W1	W2	M1	M2
Ácido cítrico	365,46±23,44	336,98±8,89	339,63±10,17	323,28±16,81
Ácido orótico	11,21±0,57	10,28±0,19	10,22±0,40	10,11±0,49
Ácido láctico	ND	ND	ND	ND
Ácido hipúrico	3,87±0,20	3,57±0,01	3,54±0,14	3,51±0,21
Lactosa	9,71±0,26 ^a	8,71±0,45 ^b	8,46±0,12 ^b	8,44±0,28 ^b
Glucosa	ND	ND	ND	ND
Galactosa	ND	ND	ND	ND
Compuestos	Yogur			
	W1	W2	M1	M2
Ácido cítrico	364,90±16,48	356,36±16,26	364,67±22,55	320,97±31,04
Ácido orótico	9,49±0,51*	9,33±0,16*	9,54±0,69	8,69±0,56*
Ácido láctico	1538,07±20,76*	1534,57±59,52*	1618,55±34,38*	1513,86±52,39*
Ácido hipúrico	ND*	ND*	ND*	ND*
Lactosa	6,56±0,62 ^a	5,89±0,46 ^{ab}	5,96±0,25 ^{ab}	5,09±0,61 ^b
Glucosa	0,37±0,01	0,49±0,05	0,51±0,06	0,46±0,09
Galactosa	1,13±0,03 ^b	1,29±0,06 ^{ab}	1,38±0,08 ^a	1,20±0,12 ^{ab}

Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de 3 réplicas de elaboración.

Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre yogures ($p < 0,05$).

* indica diferencias significativas entre la leche base y el yogur, para una misma formulación ($p < 0,05$).

ND: no detectado.

El nivel inicial de lactosa de las LB fue 8,4-9,7 g/100g, mostrando W1 el mayor valor. La fermentación y el almacenamiento condujo a valores finales de 5,1-6,6 g/100g (W1>M2, W2 y M1 sin diferencias significativas con ninguno de los yogures). El consumo de lactosa por la actividad metabólica de las BAL, que predomina durante la fermentación, osciló entre el 30 y

40%, presentando un comportamiento típico y esperado en yogur (Chandan, 2006). La concentración de lactosa del yogur depende directamente de la concentración presente en la leche base que se somete a fermentación. Menores niveles de lactosa fueron encontrados en yogures altos en proteína por Gomes da Costa et al. (2020) (14 g/100 g de proteínas y 1 g/100 g de grasa) y por Hossain et al. (2020) (4,2-7,3 g/100 g de proteínas y 0,5-3,5 g/100 g de grasa). Estos autores no reportaron el nivel de lactosa de partida, pero al día 1 hallaron concentraciones de 4 g/100g (Gomes da Costa et al., 2020) y de 3,5 g/100g (Hossain et al., 2020). La concentración de glucosa en los yogures fue baja y similar entre los productos, y en las LB no fue detectada. La galactosa tampoco fue detectada en las LB, mientras que fue mayor en el yogur M1 que en el W1. Valores de galactosa ligeramente menores fueron reportados por Vénica et al. (2014).

El ácido láctico, principal producto de la fermentación láctica, no fue detectado en las LB, y alcanzó 1500-1650 mg/100 g en los yogures a los 21 d, sin diferencias significativas entre los productos. Estos valores fueron mayores que los obtenidos para yogures con menor contenido de proteína. Vénica et al. (2014) reportaron niveles de 900-1100 mg/100 g para yogures con 3,3-4,5 g/100 g de proteína. La mayor producción de ácido láctico en yogures altos en proteína ha sido explicada por la mayor capacidad buffer de la formulación de partida, necesiéndose mayor producción de ácido láctico para reducir el pH hasta el valor final deseado (Körzendörfer y Hinrichs, 2019).

No se detectaron diferencias significativas en las LB para los ácidos cítrico, orótico e hipúrico ni en los yogures para los ácidos cítrico y orótico. La concentración de ácido cítrico en los yogures fue mayor que la reportada por Vénica et al. (2014), mientras que la concentración de orótico fue similar. No se registró consumo ni producción de ácido cítrico en ninguno de los yogures; por el contrario, el ácido orótico fue consumido en algún grado durante la fermentación y el almacenamiento en W1, W2 y M2. El ácido hipúrico fue completamente consumido a los 21 d. Los ácidos cítrico, orótico e hipúrico son productos del metabolismo bovino, por lo tanto, se encuentran presentes naturalmente en la leche y también en los ingredientes proteicos empleados. En general, las bacterias del fermento de yogur no tienen la capacidad de metabolizar el ácido cítrico; esto es posible para bacterias citrato (+), por ejemplo, algunas cepas de *Lactococcus*, *Leuconostoc* (Vénica et al., 2014). Diferente es el caso del ácido orótico, ya que se ha demostrado que algunas BAL lo utilizan como factor de crecimiento (González de Llano et al., 1996), por ejemplo, algunas cepas de *S. thermophilus* y *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* (Settachaimongkon et al., 2014). Por último, el ácido hipúrico es transformado por las BAL en ácido benzoico, que actúa como sustancia preservante (Sieber et al., 1995). Fernandez-Garcia y McGregor (1994) reportaron la formación de ácido benzoico en yogur, aunque en nuestros productos este compuesto no fue analizado.

Escasos resultados de perfiles de carbohidratos y ácidos orgánicos en yogures altos en proteína han sido reportados hasta la fecha.

2.3.5. Perfil de compuestos volátiles de los yogures

Los compuestos volátiles detectados en los yogures (21 d) y sus cantidades expresadas en unidades de área arbitrarias se presentan en la **Tabla 1.6**.

Tabla 1.6. Compuestos volátiles (valores de áreas en unidades arbitrarias x 1000) de los yogures (21 d) agrupados según familias químicas.

Compuestos	Yogur			
	W1	W2	M1	M2
<i>Aldehídos</i>				
Acetaldehído	70±18 ^c	109±13 ^{bc}	138±31 ^{ab}	185±19 ^a
Benzaldehído	57±4 ^a	29±11 ^b	27±3 ^b	18±3 ^b
<i>Cetonas</i>				
2-propanona	79±5 ^b	121±13 ^a	121±4 ^a	117±13 ^a
2-butanona	53±10	77±12	59±10	76±8
2-pentanona	46±4	50±11	59±7	58±1
Diacetilo	318±18 ^b	262±12 ^c	340±20 ^b	479±29 ^a
2,3-pentanodiona	98±4 ^a	68±13 ^b	57±5 ^b	59±10 ^b
2-hexanona	52±13 ^a	14±4 ^b	14±4 ^b	28±5 ^b
2-heptanona	255±5 ^a	278±20 ^a	155±15 ^b	18±11 ^b
Acetoína	342±31 ^c	364±28 ^{bc}	435±12 ^a	412±17 ^{ab}
2-nonanona	60±10 ^{ab}	61±21 ^a	49±6 ^{ab}	42±4 ^b
2-undecanona	13±2 ^{ab}	12±2 ^{ab}	9±1 ^b	16±3 ^a
<i>Ácidos</i>				
Acético	68±8	78±9	81±6	65±3
Butanoico	211±4 ^a	201±9 ^a	184±7 ^{ab}	170±18 ^b
Hexanoico	544±44 ^a	509±14 ^{ab}	443±36 ^b	437±19 ^b
Octanoico	281±14	282±12	244±10	245±22
Decanoico	75±8	81±8	79±8	90±3
Dodecanoico	44±3 ^a	46±2 ^a	33±2 ^b	28±3 ^b

Los resultados se expresan como el valor medio ± desviación estándar de 3 réplicas de elaboración. Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La fracción volátil fue caracterizada por la presencia de 18 compuestos pertenecientes a las familias químicas de las cetonas (10), ácidos (6), y aldehídos (2). Como se puede observar, el patrón cualitativo fue similar en todos los yogures (se identificaron los mismos compuestos en todos los casos) y las diferencias encontradas fueron cuantitativas. Los porcentajes obtenidos para los diferentes grupos químicos (calculados respecto al área total de los picos identificados) se muestran en la **Fig. 1.5**.

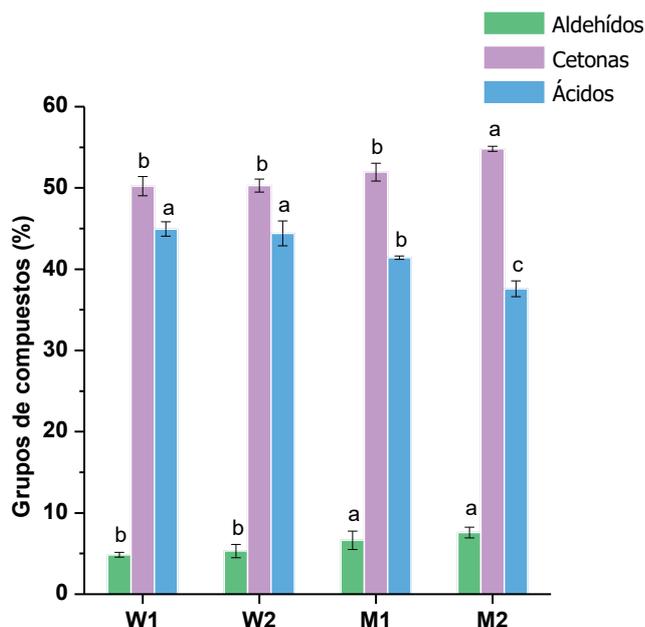


Fig. 1.5. Porcentaje de grupos químicos de compuestos volátiles respecto al al área total en los yogures (21 d).

Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de 3 réplicas de elaboración.

Letras distintas para el mismo grupo de compuestos indican diferencias significativas entre yogures ($p < 0,05$).

Todos los compuestos volátiles encontrados en las muestras han sido reportados como los componentes más representativos del aroma de yogur (Cheng, 2010; Routray y Mishra, 2011).

Las cetonas representaron el grupo mayoritario en todos los yogures, con porcentajes del 50-55%; M2 alcanzó una proporción mayor que en el resto de los yogures. Se identificaron metilcetonas (desde C3 a C11), dicetonas (2,3-butanodiona o diacetilo y 2,3-pentanodiona) y una hidroxicetona (3-hidroxi-2-butanona o acetoína). En general, el perfil de cetonas en todas las muestras fue caracterizado por la presencia mayoritaria de acetoína y diacetilo, seguidos de 2-heptanona y propanona.

Las metilcetonas con número impar de átomos de carbono son compuestos secundarios derivados típicamente del metabolismo de la grasa; los ácidos grasos libres saturados liberados de la grasa de la leche por lipólisis son primero oxidados a β -cetoácidos y luego decarboxilados a las correspondientes metilcetonas (Vagenas y Roussis, 2012). 2-propanona tuvo los niveles más bajos en el yogur W1; el contenido de 2-pentanona fue similar en todas las muestras; 2-heptanona mostró mayores áreas en los yogures W que en los M, y 2-nonanona fue mayor en W2 que en M2. 2-undecanona presentó mayor contenido en el yogur M2. En el caso de las metilcetonas con número par de átomos de carbono, como butanona y 2-hexanona, sus cantidades fueron bajas. El nivel de 2-butanona fue similar entre las muestras, mientras que mayores valores de 2-hexanona

fueron encontrados en W1. Algunos estudios sugirieron un rol menor de las metilcetonas en el *flavor* global de yogur (Cheng, 2010; Liu et al., 2022).

Dicetonas como 2,3-butanodiona y 2,3-pentanodiona, y la acetoina, producto de reducción del diacetilo, son compuestos clave en el aroma de yogur (Schlichtherle-Cerny et al., 2010). En particular, el diacetilo es considerado el primer o segundo compuesto aromático más potente (Pinto et al., 2009) debido a su extremadamente bajo umbral de percepción, contribuyendo al aroma pungente que recuerda a la manteca (Liu et al., 2022). Ott et al. (2000) propusieron que estos compuestos son producidos por decarboxilación espontánea de sus precursores, 2-acetolactato y 2-acetohidroxibutirato, respectivamente, que son compuestos intermedios derivados de la glucosa (en el caso de 2,3-butanodiona) y de la treonina y la glucosa (en el caso de 2,3-pentanodiona). Los niveles de 2,3-butanodiona y 2,3-pentanodiona fueron mayores en M2 y W1, respectivamente. Para la acetoina los mayores niveles se encontraron en M1.

Los ácidos alcanzaron porcentajes entre 37 y 45% con diferencias significativas entre muestras ($W1 \cong W2 > M1 > M2$). El perfil de ácidos fue caracterizado por ácidos carboxílicos lineales con número par de átomos de carbono de C2 a C12. Exceptuando al ácido acético o etanoico (subproducto de la fermentación de carbohidratos o catabolismo de aminoácidos), el resto de los ácidos son producidos por lipólisis de la grasa de la leche en un proceso catalizado por lipasas y esterasas provistas por las BAL. Dentro del grupo de los ácidos, se destaca la contribución del acético al *flavor* del yogur (Routray y Mishra, 2011). En todos los yogures, el ácido hexanoico fue el más abundante, seguido por el octanoico y el butanoico. Los ácidos acético, octanoico y decanoico tuvieron contenidos similares en todos los productos. El orden de áreas para el ácido butanoico fue $W1 \cong W2 > M2$; para el hexanoico, $W1 > M1 \cong M2$; y para el dodecanoico, $W1 \cong W2 > M1 \cong M2$.

Los aldehídos fueron un grupo minoritario y representaron un porcentaje del 4 al 8%; solo dos componentes de esta familia química fueron detectados: acetaldehído y benzaldehído. La fracción de aldehídos siguió el orden: $M1 \cong M2 > W1 \cong W2$. El acetaldehído provee el aroma típico de yogur y ha sido reconocido como el responsable de las notas frescas frutales (Schlichtherle-Cerny et al., 2010). Durante la fermentación de yogur, el acetaldehído puede ser producido por el metabolismo de la lactosa como resultado de la decarboxilación del piruvato: directamente vía piruvato decarboxilasa o piruvato oxidasa, o indirectamente mediante la formación de acetil coenzima-A por piruvato dehidrogenasa o piruvato formiato liasa. Además, el acetaldehído puede formarse por la actividad deoxirriboaldolasa, que degrada timidina en acetaldehído y gliceraldehído-3-fosfato. Finalmente, mientras numerosos aminoácidos pueden ser convertidos en acetaldehído vía piruvato como un intermediario metabólico, la treonina puede ser directamente convertida en acetaldehído y glicina por la actividad de la treonina aldolasa (Chaves et al., 2002). En el caso del benzaldehído, el mismo es producido por catabolismo del aminoácido fenilalanina; se ha reportado como un componente característico de la fracción aromática del yogur y contribuiría al

flavor aportando notas a almendras y azúcar quemada (Zhang et al., 2020). El contenido de acetaldehído resultó mayor en el yogur M2 y menor en el yogur W1, mientras que el benzaldehído presentó los mayores niveles en el yogur W1.

A partir del análisis precedente puede verse que el uso de MWP parece favorecer la producción de los compuestos volátiles más relevantes para el *flavor* del yogur, tales como acetaldehído, diacetilo y acetoína, mientras que el agregado de WPC35 impactó en los niveles de los algunos ácidos grasos y metilcetonas.

Resultados previos indican que la formulación de las leches base con diferentes ingredientes lácteos para obtener yogures mejorados en sus aspectos funcionales y nutricionales, afecta en diferente medida la producción de compuestos volátiles (Vénica et al., 2023b, 2024). En concordancia con nuestros resultados, otros autores reportaron que el tipo y cantidad de ingredientes lácteos utilizados en la elaboración del yogur pueden impactar en los atributos sensoriales del producto (Akalin et al., 2012; Barakat et al., 2021; Isleten y Karagul-Yuceer, 2006; Marafon et al., 2011).

2.3.6. Comportamiento reológico de los yogures

Los datos obtenidos de las curvas de flujo de los yogures al final del almacenamiento (21 d) fueron satisfactoriamente ajustados con la Ley de Potencia ($R^2 > 0.80$). El índice de consistencia (k) y el índice de comportamiento de flujo (n), obtenidos por regresión, y la viscosidad aparente (η_a) a 50 s^{-1} de velocidad de corte, obtenida por interpolación de los puntos de las curvas, se muestran en la **Tabla 1.7**.

Tabla 1.7. Comportamiento de flujo (n), índice de consistencia (k), y viscosidad aparente (η_a) a 50 s^{-1} de esfuerzo de corte de los yogures (21 d).

Yogur	Parámetros		
	n (adimensional)	k (Pa.s)	η_a (Pa.s)
W1	0,10±0,02 ^b	96,95±3,93 ^a	3,00±0,01 ^a
W2	0,07±0,01 ^b	85,32±5,04 ^a	2,88±0,33 ^a
M1	0,15±0,01 ^a	55,45±2,06 ^b	2,06±0,03 ^b
M2	0,16±0,01 ^a	46,97±2,41 ^b	1,86±0,01 ^b

Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de 3 réplicas de elaboración. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre yogures ($p < 0,05$).

Se encontraron diferencias asociadas al tipo de ingrediente, independientemente del nivel de adición y, en consecuencia, de la relación CN:WP. Como era esperado, se encontró $n < 1$ en todas las muestras, lo que permite clasificar a los productos como pseudoplásticos, que es un comportamiento típico para yogur (Lee y Lucey, 2010). El parámetro k fue mayor en los yogures

W que en los M, indicando que el WPC35 provocó mayor consistencia que el MWP. La η_a fue mayor en los productos W que en M, en línea con los resultados de k .

Resultados similares fueron encontrados por Silva y O'Mahony (2018), quienes estudiaron el comportamiento reológico y las propiedades microestructurales de geles lácteos altos en proteína y bajos en grasa (8 g/100 g de proteína, <0,3 g/100 g de grasa) que se acidificaron con glucono-delta-lactona, formulados con SMP, concentrado de proteína de leche y MWP. Las muestras con MWP mostraron menor módulo de almacenamiento (G') durante la acidificación y menores valores de esfuerzo de corte en los geles formados. Menor viscosidad aparente y consistencia se obtuvieron en los geles con MWP respecto al control sin agregado.

Akalin et al. (2012) estudiaron la viscosidad aparente de yogures (5,2 y 5,5 g/100 g de proteína) formulados con SMP y WPC80, agregados individualmente, y encontraron mayor viscosidad en los yogures con WPC80 comparado a los adicionados con SMP. Remeuf et al. (2003) también prepararon yogures (4,4-4,7 g/100 g de proteína) con SMP y WPC84, agregados. Según Saffon et al. (2013), las proteínas de suero del WPC forman agregados proteicos más grandes que los que se obtienen en geles lácteos y yogures preparados solo con SMP; esto dificulta la contracción de la red de caseínas, aumentando la viscosidad del gel (Saffon et al., 2013). Además, la formación de estos agregados proteicos permite mayor oclusión de solvente resultando en mayor viscosidad (Purwanti et al., 2013). Contrariamente, Sodini et al. (2005) encontraron menor viscosidad en yogures con WPC35 respecto a un yogur control que solo contenía SMP, atribuido al alto grado de desnaturalización de las proteínas de suero en el ingrediente empleado.

Se ha propuesto que cuando ocurre la desnaturalización de las proteínas de suero durante el tratamiento térmico en presencia de micelas de caseína, las proteínas de suero desnaturalizadas interaccionan con las caseínas y con otras proteínas de suero, comportándose como materiales de unión, propiciando un mayor G' durante la gelificación, vinculado a mayor firmeza y consistencia del gel. Esto fue experimentalmente demostrado por Lucey et al. (1999), quienes estudiaron el efecto del tratamiento térmico (80 °C/30 min) de leches base formuladas con WPC80 (1 g/100 g) para preparar geles ácidos. Dichos autores observaron que el esfuerzo de corte aumentó y que la microestructura del gel fue más ramificada en los geles tratados térmicamente en comparación a los no tratados. Por el contrario, las proteínas de suero desnaturalizadas durante la manufactura de los ingredientes no contribuyen a la agregación con las micelas de caseína durante el tratamiento térmico de la leche base en el proceso de elaboración de yogur, causando menor entrecruzamiento, y por ende menor viscosidad (Torres et al., 2018).

En base a lo propuesto en la bibliografía consultada se podrían explicar las menores viscosidades aparentes obtenidas en los yogures M por un mayor grado de desnaturalización del ingrediente MWP respecto al WPC35. Los ingredientes MWP se distinguen de otros ingredientes de proteínas de suero por su pequeño tamaño de partícula (0,1–10 μm) que habilita su uso para

reemplazar grasa (miméticos de grasa) en sistemas modelo y aplicaciones alimentarias de base láctea (Kew et al., 2020); de todas maneras, la forma de interacción de estas pequeñas partículas de proteínas con las caseínas y con otras proteínas de suero no está completamente dilucidada (Hossain et al., 2020; Torres et al., 2011).

2.3.7. Perfil de textura de los yogures

Los parámetros de textura de los yogures (21 d) se muestran en la **Fig. 1.6**.

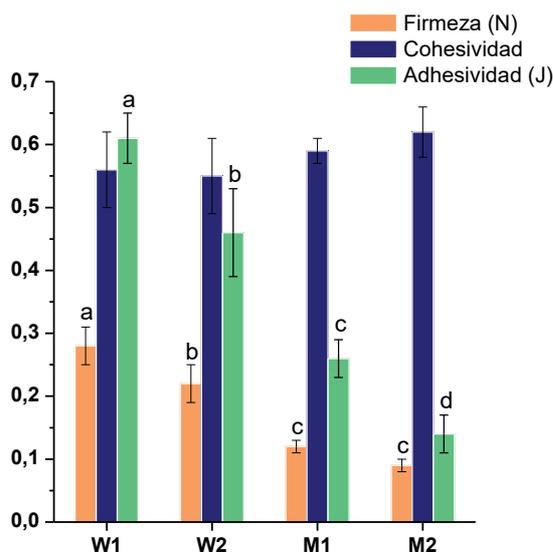


Fig. 1.6. Parámetros de TPA: firmeza (N), cohesividad (adimensional) y adhesividad (J) de los yogures (21 d).

Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de 3 réplicas de elaboración. Letras distintas para el mismo parámetro indican diferencias significativas entre yogures ($p < 0,05$).

Diferencias significativas, fueron observadas para la firmeza: W1 mostró el mayor valor, seguido por W2 y finalmente las muestras M; y para la adhesividad, que siguió el orden $W1 > W2 > M1 > M2$. La cohesividad fue similar en todos los productos.

La textura de los yogures es un parámetro importante que impacta en la aceptabilidad del consumidor (Delikanli y Ozcan, 2017). Se ha reportado que la calidad, composición, tecnofuncionalidad y proceso de manufactura de los ingredientes en polvo, la formulación de la leche base, tipo de fermento y el protocolo de producción del yogur pueden afectar los parámetros de textura (Lesme et al., 2020; Lucey, 2020). En relación al efecto de los ingredientes de proteínas lácteas, en diversos trabajos se han reportado resultados contradictorios. En efecto, en algunos casos se observó aumento de la firmeza, mientras que en otros se obtuvieron geles más débiles con el agregado de WPC. Por ejemplo, Sodini et al. (2005) detectaron mayor firmeza en un yogur que solo contenía SMP respecto a otro formulado con un WPC35 con alto grado de

desnaturalización. Contrariamente, Akalin et al. (2012) encontraron que la incorporación de WPC80 aumentó la firmeza y adhesividad en yogures con 5,2-5,5 g/100 g de proteína en comparación a un yogur con SMP. Resultados similares fueron reportados por Nastaj et al. (2019), donde observaron que la firmeza de yogures altos en proteína (6-10 g/100 g) aumentó con el nivel de agregado de WPC80, aunque la adhesividad no fue significativamente afectada. Delikanli y Ozcan (2014) no observaron diferencias en la dureza y adhesividad para yogures (4,7–5,4 g/100 g), formulados con SMP y WPC80.

El efecto del MWP en parámetros de textura de geles ácidos y yogures fue estudiado por Silva y O'Mahony (2018) y Hossain et al. (2020), respectivamente. Menor valor de firmeza fue obtenido en los yogures altos en proteínas y bajos en grasa con agregado de MWP respecto al control sin agregado. Es decir, el agregado de MWP condujo a la formación de geles de leche más blandos, observado por medidas reológicas durante el proceso de gelificación (Silva y O'Mahony, 2018). Contrariamente, Hossain et al. (2020) hallaron que la firmeza de yogures altos en proteína y bajos en grasa (7,3 g/100 g de proteína, <0,5 g/100 g de grasa) formulados con MWP fue similar a la obtenida en un yogur con igual contenido de grasa y menor contenido proteico (5,6 g/100 g) sin la adición de MWP, lo que se justificó por el comportamiento del MWP como un elemento estructural inerte.

Los resultados de adhesividad mostraron la misma tendencia que los de firmeza, lo que concuerda con lo observado por Delikanli y Ozcan (2017), quienes concluyeron que geles más débiles (que presentaron microestructuras más abiertas y menos densas) se relacionaron con menores valores de adhesividad. La adhesividad representa la energía necesaria para romper el contacto entre la muestra y la superficie de la sonda, que se da por la presencia de grupos cargados (causado por la desnaturalización) que permanecen libres luego del tratamiento térmico y la fermentación (Magenis et al., 2006; Prajapati et al., 2016). Se ha reportado que los ingredientes de MWP reducen la fricción entre las superficies por un mecanismo de rodamiento de baja fricción (definido por el término en inglés 'ball-bearing'), y que este efecto se ve incrementado con altas concentraciones de MWP (Liu et al., 2016). Este hecho también fue demostrado por Olivares et al. (2019) al estudiar el efecto del MWP como mimético de grasa, comparando la textura de dispersiones de MWP en leche descremada con aquellas preparadas con grasa láctea en leche descremada.

Por otro lado, los resultados de firmeza de los yogures medidos a los 21 d se contraponen con los valores obtenidos al final de la fermentación (aprox. 4 h a 42 °C) arrojados por las mediciones ópticas del equipo Optigraph®. De hecho, la firmeza a los 21 d fue mayor en los yogures W que en los M, y lo contrario se tuvo al final de la fermentación. Sin embargo, esta discrepancia no es sorprendente. Al final de la fermentación, W1 mostró una macroestructura áspera y grumosa; posiblemente estos aglomerados de proteína conformaron una matriz heterogénea que podría

haber afectado la transmisión/reflexión en el equipo (Optigraph®). La medida óptica fue realizada durante la formación del gel y al final de la misma, en donde el mismo tiene una organización continua más similar a la de un yogur firme (Lee y Lucey, 2010), mientras que la medida reológica se realizó luego de haber fracturado el gel por la agitación y de haber estado en reposo por 21 días a la temperatura de refrigeración, lapso en el cual se produce una evolución de la microestructura (Ramchandran y Shah, 2010). La viscosidad y la firmeza del yogur batido se relacionan con su microestructura, que depende de las interacciones entre moléculas o partículas. Durante el almacenamiento en frío la estructura del gel roto se modifica, se forman nuevas estructuras y la viscosidad del yogur aumenta (Gilbert et al., 2020). Serra et al. (2007) también señalaron que las medidas de firmeza y de densidad del gel de yogur obtenidas en el Optigraph® no representan exactamente la textura del yogur luego del almacenamiento, aunque dan una idea de la interacción de las partículas durante la formación del gel. La textura del yogur medida durante el almacenamiento está fuertemente condicionada por la cristalización de la grasa y el hinchamiento de las partículas de caseína a baja temperatura. Es decir, tanto la grasa como la proteína se encuentran en un estado físico diferente a la temperatura de la medida óptica (42 °C), que a la temperatura de refrigeración (Serra et al., 2007).

2.3.8. Microestructura y aspecto visual de los yogures

En la **Fig. 1.7** se muestran las micrografías de CLSM de los yogures (21 d.). En color rojo, se identifican los agregados proteicos.

Diferentes patrones microestructurales fueron observados dependiendo del ingrediente utilizado y su nivel de adición. Para W1, las partículas proteicas presentaron diferente tamaño y no se observó tanta interconexión como en los otros yogures. Las partículas proteicas en W2 se encontraron más interconectadas y sus tamaños fueron más regulares que en W1, siendo posible distinguir poros de diferentes tamaños. M1 y M2 mostraron una organización estructural similar entre sí, donde las cadenas de proteína fueron más delgadas que en W2. Tanto M1 como M2 presentaron poros regularmente distribuidos. Como fue previamente mencionado, los menores niveles de proteína de suero en W2 y M2 comparados a W1 y M1, y una concomitante mayor disponibilidad de micelas de caseína, permitieron la formación de un gel mejor estructurado.

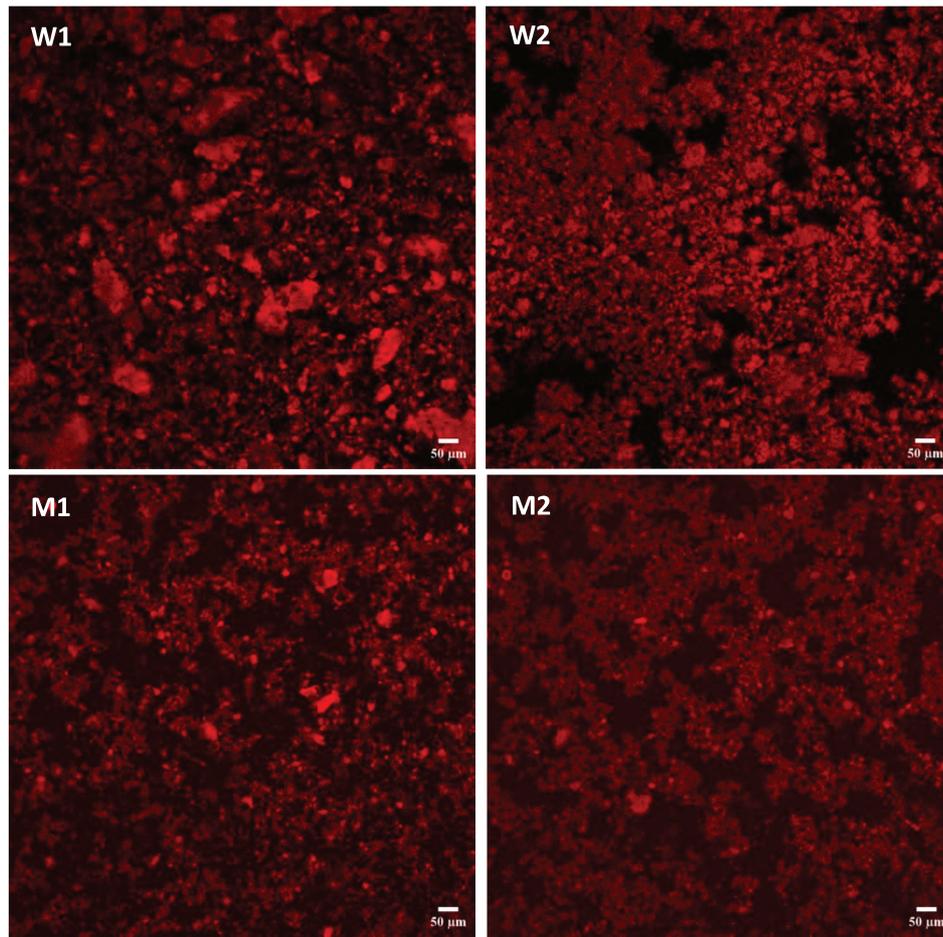


Fig. 1.7. Micrografías de CLSM de los yogures (21d).

En rojo se observan los agregados proteicos y en negro las regiones correspondientes a los poros de la estructura.

Las partículas presentes en yogur batido son típicamente suaves y de forma regular, su forma y dureza afectan la percepción de suavidad y cremosidad esperadas. Fue establecido que un exceso de proteínas de suero puede provocar heterogeneidad en el tamaño y formas de las partículas proteicas (Krzeminski et al., 2011). Esto puede ser una de las razones de la pobre interacción entre las estructuras proteicas observadas en W1, que podría haber conducido a la grumosidad y aspereza de este yogur.

Sandoval-Castilla et al. (2004) estudiaron la microestructura de yogures parcialmente descremados (1,45 g/100 g de grasa, 4,5 g/100 g de proteína) y con diferentes sustitutos de grasa basados en proteínas de suero (WPC35 y MWP), y observaron diferencias en la red proteica formada con cada ingrediente. Una apariencia filamentosa, con pocos espacios vacíos, en el yogur con WPC fue atribuida a la asociación de las proteínas de suero desnaturalizadas en la superficie de las micelas de caseína, mientras que en el yogur con MWP las partículas proteicas formaron una estructura con más poros que en el yogur con WPC, similar a lo observado en nuestro estudio entre W2, M1 y M2. La explicación dada por los autores fue que las proteínas de suero del MWP interfirieron en la aproximación de las cadenas de caseínas. Silva y O'Mahony (2018)

cuantificaron parámetros microestructurales (porosidad y tortuosidad) de los geles de leche en los que se estudió el agregado de MWP (0-4,4 g/100 g) a partir del análisis de imágenes de CLSM. El agregado de MWP produjo geles con mayor porosidad y menor tortuosidad comparativamente a la muestra sin agregado. Los geles con MWP tuvieron una estructura más abierta debido a la creación de nuevos canales o cavidades de suero en la estructura tridimensional del gel, con una mayor conectividad entre los poros y menor tortuosidad. La apertura del gel se atribuye a la menor agregación de las partículas de caseína, como se mencionó. Esta apertura de la estructura en los geles con MWP, conduce a geles más blandos y menos firmes. Esto facilitaría la mayor expulsión del suero, es decir, menor CRA. Los resultados obtenidos por Silva y O'Mahony (2018) confirmaron esta hipótesis. También le atribuyeron el menor valor de CRA de los geles con MWP respecto al que no tenía MWP, al mayor grado de desnaturalización de proteínas de suero en el ingrediente.

Para concluir, en la **Fig. 1.8** se observa el aspecto visual de los yogures. Como ya se mencionó, W1 mostró abundante grumosidad, que se puede vincular con los agregados proteicos de mayor tamaño y bordes más definidos que en el resto de los productos. W2, M1 y M2 resultaron cremosos, con una textura homogénea y sin grumosidad. M1 y M2 fueron menos consistentes que W2, característica otorgada por el MWP.



Fig. 1.8. Aspecto visual de los yogures (21d).

3. Conclusiones

El incremento proteico logrado por la adición de WPC35 y MWP permitió obtener yogures incrementados en proteína (>5,6 g/100 g de proteína) y parcialmente descremados (<1,5 g/100 g de grasa), con propiedades fisicoquímicas y microbiológicas concordantes con los requerimientos de calidad para este tipo de producto. La utilización de diferentes ingredientes de proteínas de suero introdujo cambios en la micro y macroestructura, y ligeras modificaciones en los perfiles de compuestos volátiles durante el almacenamiento refrigerado. En este último caso se destacan los mayores niveles de acetaldehído, diacetilo y acetoína en los yogures M, y de 2-heptanona, 2-nonanona y algunos ácidos grasos en los yogures W, lo que sugeriría que el tipo de ingrediente

modifica en alguna medida las rutas metabólicas de producción de los compuestos. Se obtuvieron niveles de lactosa de 5,1-6,6 g/100 g en los yogures al final del almacenamiento. El ácido láctico alcanzó niveles similares en todos los productos. Se obtuvo mayor índice de consistencia y viscosidad aparente en los yogures W respecto a los M. Esto se correlaciona con la firmeza y la adhesividad de los yogures. A pesar de estas diferencias estructurales, no se observaron diferencias en la CRA. Los yogures con MWP mostraron mejores características macroestructurales, una matriz homogénea y sin grumosidad, aunque también el uso de WPC35 en menor concentración (W2) permitió obtener un producto suave y cremoso; este último ingrediente es ampliamente utilizado dado su menor costo (US\$ 2,4/kg del WPC35 vs. US\$ 7/kg del MWP45) y mayor disponibilidad que otros ingredientes de proteínas lácteas. En general, las mayores diferencias se debieron al tipo de ingrediente más que al nivel de agregado (relación CN:WP).

Un detalle a tener en cuenta es la alta concentración de lactosa que aportan estos ingredientes respecto a otros con mayor contenido proteico, lo que impacta en el contenido de lactosa de la leche base y, en consecuencia, en el del producto final.

Capítulo 2

Empleo de concentrado de proteínas de leche (MPC70) e ingredientes de proteínas de suero (WPC35, WPC80, MWP) en la formulación de yogures incrementados en proteínas

Resumen

El objetivo de este Capítulo fue estudiar el efecto de la formulación empleando distintos ingredientes de proteínas lácteas: concentrado de proteínas de leche, concentrados de proteínas de suero y proteína de suero microparticulada, en la elaboración de yogures altos en proteína con diferentes relaciones CN:WP, en la cinética de fermentación, aspectos fisicoquímicos, microbiológicos, estructurales y perfil de compuestos volátiles. Dentro de los aspectos estructurales, se evaluó el comportamiento reológico de los yogures en condiciones orales simuladas, lo que permitió establecer un vínculo con su potencial capacidad saciante. Para ello, se elaboraron, a escala laboratorio, yogures altos en proteína (7,5 g/100 g de proteína) y parcialmente descremados (<1,5 g/100 g grasa) empleando leche parcialmente descremada y los siguientes ingredientes en polvo: concentrado de proteínas de leche al 70% (MPC70), concentrado de proteínas de suero al 35% (WPC35), concentrado de proteínas de suero al 80% (WPC80) y proteína de suero microparticulada (MWP, 45% de proteína). Los ingredientes de proteínas de suero (WPC35, WPC80 y MWP) se combinaron individualmente con MPC70, para obtener relaciones CN:WP de 2:1 y 1,5:1. Paralelamente, un yogur control (C) con relación CN:WP 4:1, fue elaborado sólo con MPC70. El estudio se realizó por separado para cada relación estudiada comparativamente con el control.

Una de las principales ventajas que presentó el uso de MPC70 fue la menor proporción de lactosa de las formulaciones, lo que resultó en yogures con menor contenido de lactosa residual que lo encontrado en el **Capítulo 1**. La producción de ácidos orgánicos y los valores de pH fueron similares en los distintos productos. La acidez titulable y nivel de microorganismos cumplieron con lo requerido por la normativa. El análisis del perfil de compuestos volátiles reveló la presencia de 22 compuestos pertenecientes a las familias químicas de las cetonas, ácidos y aldehídos, en proporciones similares (salvo los aldehídos) a los yogures del **Capítulo 1**. Diferencias cuantitativas en los compuestos se asoció también al tipo de ingrediente utilizado. La caracterización estructural reveló diferencias entre los productos, nuevamente asociadas a la naturaleza de los ingredientes más que a la relación CN:WP. Los yogures con WPC80 resultaron los más viscosos, consistentes y firmes, y por estas características podrían asumirse como los más saciantes, mientras que lo contrario se observó en los yogures con MWP. Los yogures con WPC35 tuvieron un comportamiento intermedio y bastante similar al control en algunos parámetros, lo que podría relacionarse con el nivel de desnaturalización de las proteínas de suero presentes en el WPC35 (respecto al comportamiento observado para el WPC80), o con la alta deformación que se aplicó en la etapa de agitación y enfriamiento durante la elaboración, que pudo haber ocasionado un gran impacto en la microestructura de los mismos.

1. Materiales y métodos

1.1. Materiales

Para la elaboración de los yogures se emplearon leche UHT parcialmente descremada (1 g/100 mL de grasa, 3,2 g/100 mL de proteínas) (García Hnos. Agroindustrial S.R.L, Argentina), concentrado de proteínas de leche en polvo al 70% (MPC70) (Milk Specialties Global, Estados Unidos), concentrado de proteínas de suero al 35% (WPC35) (Saputo S.A., Argentina), concentrado de proteínas de suero al 80% (WPC80) (Nutrilac QU-7560, Arla Foods, Dinamarca) y proteína de suero microparticulada (MWP) (Nutrilac CH-4560, Arla Foods, Dinamarca). La composición de los ingredientes en polvo se muestra en la **Tabla 2.1**. También se incluye el contenido de calcio total cuantificado por potenciometría (**TA 7**). Además, el ingrediente MPC70 fue caracterizado desde el punto de vista morfológico por microscopía electrónica de barrido (SEM, **TA 21**). Se empleó el fermento comercial de yogur YF-L811 (Chr. Hansen, Dinamarca).

Tabla 2.1. Composición de los ingredientes en polvo en base húmeda (según especificaciones técnicas de los fabricantes y análisis realizados).

Ingredientes	Proteína (g/100 g)	Grasa (g/100 g)	Cenizas (g/100 g)	Calcio [†] (mg/100 g)	Humedad (g/100 g)	Lactosa* (g/100 g)
MPC70	≥69,5	≤3,0	≤8,0	1928,1	≤6,0	13,5
WPC35	≥34,5	≤6,0	≤8,6	494,9	≤4,5	46,4
WPC80	73,0-78,0	≤10,0	≤7,0	NA	≤6,0	4,0
MWP	43,0-47,0	≤6,0	≤6,0	564,8	≤5,0	40,0

[†]Determinado instrumentalmente por potenciometría con ISE (**TA 7**).

*Calculado por diferencia.

NA: no analizado.

1.2. Diseño experimental

Se diseñaron seis formulaciones de yogures altos en proteína (7,5 g/100 g de proteína) parcialmente descremados (<1,5 g/100 g de grasa) con dos relaciones CN:WP (2:1 y 1,5:1), que se compararon, individualmente, con un control (4:1), constituyendo dos grupos: Grupo 1 (2:1 y 4:1) y Grupo 2 (1,5:1 y 4:1), respectivamente según lo detallado en la **Tabla 2.2**. Las elaboraciones se realizaron por triplicado en diferentes días. El protocolo de elaboración implementado y los análisis realizados se indican a continuación.

Tabla 2.2. Diseño experimental de los yogures.

Parámetros	Relaciones CN:WP						
	4:1		2:1			1,5:1	
	C	W35-1	W80-1	Mwp-1	W35-2	W80-2	Mwp-2
Contenido de proteína (g/100 g)	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Relación CN:WP	4:1	2:1	2:1	2:1	1,5:1	1,5:1	1,5:1
Contenido de grasa (g/100 g)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

1.3. Preparación del fermento

La preparación del fermento se realizó de la misma manera que fue detallado en el **Capítulo 1**, apartado **1.4.1**.

1.4. Elaboración de los yogures

Se elaboraron yogures a escala laboratorio (~500 mL) siguiendo el protocolo detallado en el **Capítulo 1**, apartado **1.4.2**, con modificaciones. La composición de las formulaciones se muestra en la **Tabla 2.3**.

Tabla 2.3. Composición de las formulaciones de yogur (g/100 g).

Ingredientes	Yogur						
	C	W35-1	W80-1	Mwp-1	W35-2	W80-2	Mwp-2
MPC70	7,2	5,5	5,5	5,5	4,5	4,5	4,5
WPC35	---	4,0	---	---	5,8	---	---
WPC80	---	---	1,8	---	---	2,7	---
MWP	---	---	---	3,0	---	---	4,5
Leche UHT*	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

*Se agregó la masa necesaria para alcanzar ~500 mL finales.

Los ingredientes en polvo fueron pesados y disueltos con la leche UHT. Las leches base obtenidas (LB) se dejaron reposar en la heladera (5 °C) durante 20 h para asegurar la completa hidratación de los ingredientes en polvo. Luego, fueron tratadas térmicamente (85° C/20 min) en un baño termostático y se enfriaron rápidamente en baño de hielo hasta 42 °C. El fermento fue preparado e inoculado, según lo detallado en **Capítulo 1**, apartado **1.4.1**. La fermentación

procedió a 42 ± 1 °C en baño termostatzado. Se realizaron controles de pH durante la fermentación cada 30 min hasta alcanzar el pH target de $4,75\pm 0,05$. Los yogures se enfriaron rápidamente en baño de hielo hasta ~ 20 °C. Luego, fueron sometidos a una agitación de 15 s (minipimer de 600 W de potencia, modelo HR1363/06/AD, Philips, Argentina). Los yogures fueron almacenados en frascos de vidrio con tapa a rosca (donde fueron fermentados) por 21 d a 5 °C.

Se determinó el pH y AT (**TA 1**), y la composición de ácidos orgánicos y carbohidratos en la LB (**TA 9**). Se monitoreó la dinámica de fermentación mediante mediciones de pH y de formación del gel (**TA 16.1**). La toma de muestras para los análisis al día 1 fue realizada el día de la elaboración, luego del paso de enfriamiento y agitación. Las muestras necesarias (pH, AT, capacidad de retención de agua -CRA- (**TA 15**), ácidos orgánicos y carbohidratos) fueron almacenadas en viales individuales a 5 °C por 1 d. Las muestras para los análisis de perfil de textura -TPA- (**TA 19**), reometría rotacional PP (**TA 17.2**) y viscosidad en condiciones orales PP (**TA 18.2**), fueron almacenadas individualmente en viales de 50 mL y se conservaron en refrigeración (5 °C) hasta el momento del análisis (21 d). El resto de las muestras de yogur requeridas para los análisis al punto final de muestreo (21 d) (pH, AT, composición -**TA 3, 4, 5, 6 y 7**-, recuentos diferenciados -**TA 11 y 12**-, CRA, ácidos orgánicos y carbohidratos, compuestos volátiles -**TA 10**-) se tomaron de la masa total del yogur contenida en el frasco de vidrio, conservado en refrigeración.

El esquema de muestreo y análisis se presenta en la **Fig. 2.1**.

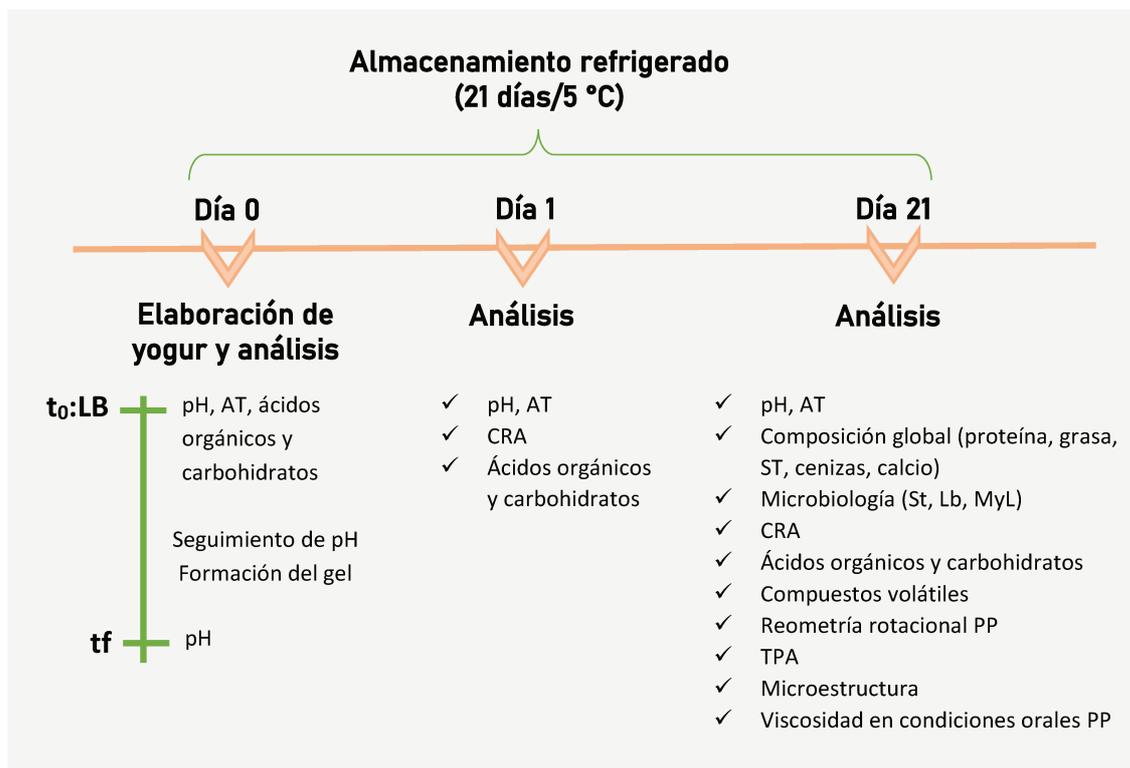


Fig. 2.1. Esquema de muestreo y controles analíticos realizados durante la elaboración y almacenamiento de los yogures.

LB: leche base; AT: acidez titulable; CRA: capacidad de retención de agua; ST: sólidos totales; St: Streptococcus thermophilus; Lb: Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus; MyL: mohos y levaduras; PP: plato-plato; TPA: análisis de perfil de textura.

1.5. Análisis estadístico

Se empleó ANOVA de una vía y test de Tukey (nivel de significancia $p < 0,05$) para determinar diferencias en los parámetros medidos entre las formulaciones con relación CN:WP 2:1 y 4:1 (Grupo 1), y entre las formulaciones con relación CN:WP 1,5:1 y 4:1 (Grupo 2). También se evaluó la evolución de los parámetros con el tiempo (LB, día 1 y 21 de almacenamiento) para cada formulación mediante test-t de Student para muestras pareadas (nivel de significancia $p < 0,05$), según corresponda. Se utilizó el software Statgraphics Centurion XIV (Royal Technology S.A., Estados Unidos). Los perfiles de compuestos volátiles también fueron analizados por análisis de componentes principales (PCA), empleando el software Past 4.0 (University of Oslo, <https://www.nhm.uio.no/english/research/resources/past/>). Este análisis busca reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos multivariantes, creando nuevas variables lineales (componentes principales) que maximizan la varianza de los datos. Estas nuevas variables son combinaciones lineales de las variables originales y están ordenadas de manera que el primer componente captura la mayor variabilidad posible en los datos, el segundo componente captura la segunda mayor variabilidad, y así sucesivamente. Al proyectar los datos en este nuevo

sistema de coordenadas, se facilita la visualización de patrones, similitudes y diferencias entre las muestras, lo que puede ser útil para la exploración y análisis de los datos.

2. Resultados

2.1. Microscopía del ingrediente MPC70

Las micrografías SEM del MPC70 se muestran en la **Fig. 2.2**. Se pueden apreciar partículas de diferentes tamaños (<10-100 μm), predominantemente esféricas, con superficie rugosa y colapsada. Un aspecto similar fue reportado por Cenini et al. (2020), donde estudiaron la morfología de ingredientes MPC con diferentes concentraciones de proteína, utilizando microscopía electrónica de barrido ambiental. La apariencia morfológica del MPC70 difiere notoriamente de lo observado para los ingredientes de proteína de suero (WPC35 y MWP) caracterizados en el **Capítulo 1**.

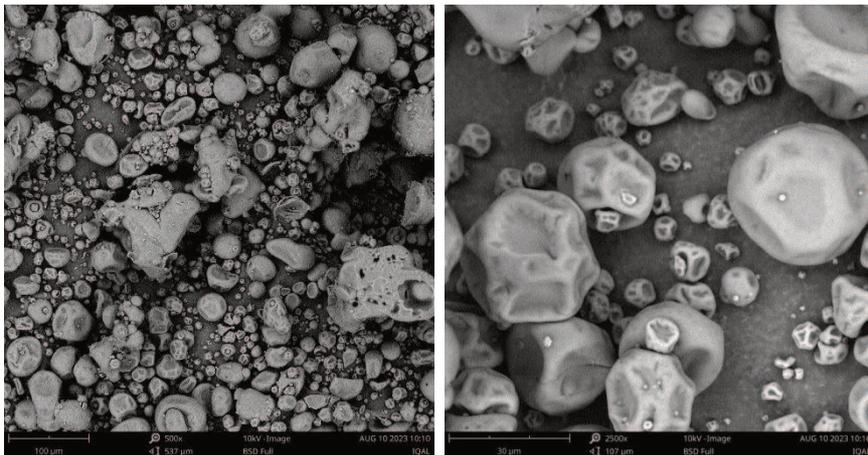


Fig. 2.2. Micrografías SEM del MPC70. Magnificación de 500x (izq.) y de 2500x (der.).

2.2. Evolución de la fermentación

La evolución de la fermentación se estudió a través de mediciones de pH y de formación del gel.

Las curvas de pH vs. Tiempo de Fermentación (min) obtenidas durante la elaboración de los yogures de ambos Grupos se muestran en la **Fig. 2.3**.

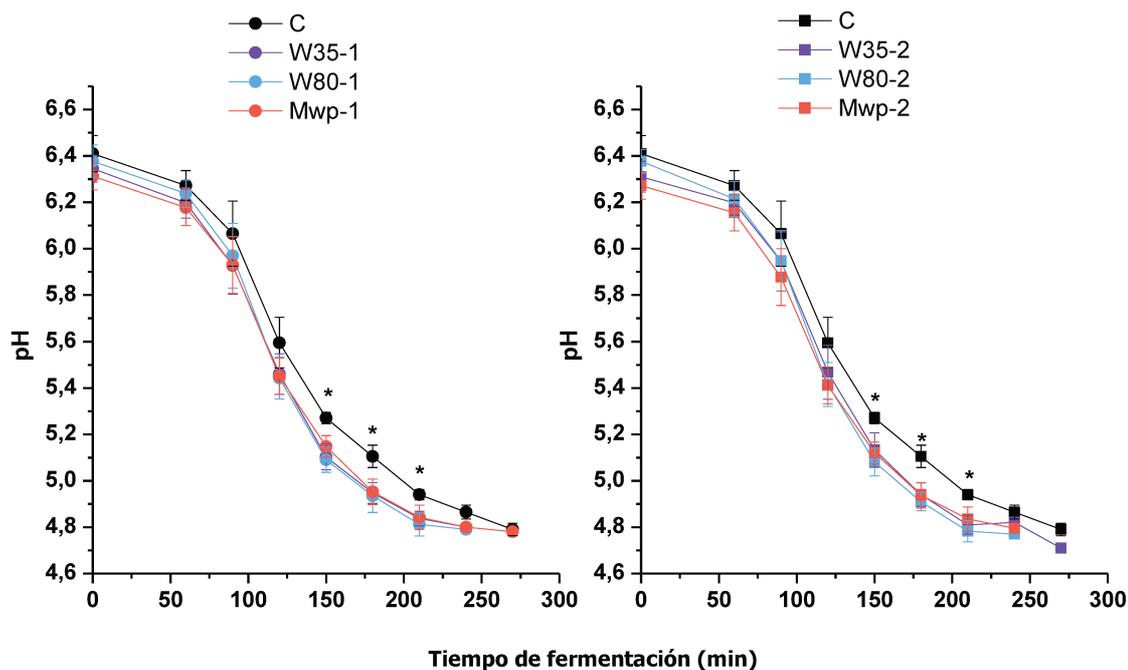


Fig. 2.3. Evolución de pH durante la fermentación de las formulaciones del Grupo 1 (**izq.**) y del Grupo 2 (**der.**).

Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de 3 réplicas de elaboración.

* indica diferencias significativas para un determinado tiempo entre formulaciones ($p < 0,05$).

La fermentación de la formulación C se extendió por 260 ± 13 min, Mwp-1 y W35-2 demoraron 260 ± 30 min, y para el resto de los yogures el pH target se alcanzó a los 245 ± 15 min. Se observaron diferencias significativas en el pH de las formulaciones con CN:WP 1,5:1 y con 2:1 respecto a C a los 150, 180 y 210 min de fermentación. Estas diferencias se podrían explicar por la mayor concentración de caseína y de fosfato de calcio coloidal (CCP) en el yogur C, y por ende mayor capacidad buffer, respecto al resto de los yogures. Como ya se mencionó, el CCP se solubiliza a pH 5,5-5,0 produciendo un efecto buffer del medio por la liberación de iones fosfato (Dalgleish y Law, 1988; Horne, 1998), y en estos resultados este comportamiento se revela más claramente que en lo observado en el **Capítulo 1**.

Los parámetros de formación del gel obtenidos con Optigraph® se muestran en la **Tabla 2.4** y **2.5**.

Tabla 2.4. Parámetros de formación del gel durante la fermentación obtenidos con el equipo Optigraph® para los yogures del Grupo 1.

Parámetros	Yogur			
	C	W35-1	W80-1	Mwp-1
GT (min)	105±3	105±2	108±1	104±4
Ff (V)	46,3±2,4 ^a	15,3±1,2 ^c	21,8±0,2 ^b	45,2±1,6 ^a
GD (%intensidad)	21,7±1,4 ^b	19,9±2,6 ^b	20,9±0,1 ^b	44,1±1,8 ^a
S (%intensidad/min)	0,17±0,05 ^c	0,44±0,04 ^a	0,21±0,01 ^{bc}	0,32±0,05 ^{ab}

Los resultados se expresan como el valor medio ± desviación estándar de 3 réplicas de elaboración.

GT: tiempo de gelificación; Ff: firmeza final; GD: densidad del gel; S: velocidad de agregación.

Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre yogures ($p < 0,05$).

Tabla 2.5. Parámetros de formación del gel durante la fermentación obtenidos con el equipo Optigraph® para los yogures del Grupo 2.

Parámetros	Yogur			
	C	W35-2	W80-2	Mwp-2
GT (min)	105±3	105±2	106±2	106±5
Ff (V)	46,3±2,4 ^a	9,2±0,2 ^c	11,6±1,0 ^c	32,3±0,4 ^b
GD (%intensidad)	21,7±1,4 ^b	13,8±2,2 ^c	20,9±1,9 ^b	40,5±0,9 ^a
S (%intensidad/min)	0,17±0,05 ^c	1,06±0,08 ^a	0,45±0,08 ^b	0,33±0,06 ^{bc}

Los resultados se expresan como el valor medio ± desviación estándar de 3 réplicas de elaboración.

GT: tiempo de gelificación; Ff: firmeza final; GD: densidad del gel; S: velocidad de agregación.

Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre yogures ($p < 0,05$).

No se observaron diferencias significativas en el tiempo de gelificación entre los yogures del Grupo 1 (104-108 min), ni entre los yogures del Grupo 2 (105-106 min), aunque se esperaba que los yogures con mayor proporción de proteínas de suero (W35-1, W80-1 y Mwp1 del Grupo 1, y W35-2, W80-2 y Mwp2 del Grupo 2) mostraran un tiempo de gelificación menor que el yogur C. Estos tiempos de gelificación coinciden con valores de pH de 5,9 para el yogur C y de 5,8 para el resto de los yogures, tanto del Grupo 1 como del Grupo 2, que son algo más elevados que los valores esperados (pH 5,5-5,0, coincidente con el punto isoeléctrico de la β -lactoglobulina). Estos resultados difieren de los observados para los yogures del **Capítulo 1**, indicando que la gelificación ocurrió antes en los yogures del **Capítulo 2** que en los del **Capítulo 1**. Zhao et al. (2016b), hallaron un resultado que se contrapone con los nuestros, a través de medidas de reometría oscilatoria de baja deformación. Una formulación de yogur (4 g/100 g de proteína) con relación CN:WP de 4:1 (empleando solamente SMP) tuvo mayor tiempo de gelificación (97 min) y menor pH de gelificación (5,71) que una formulación con igual contenido proteico, pero con relación 2:1, obtenida con SMP y WPC80 (GT=81 min y pH de gelificación=5,82).

Los valores de Ff y GD siguieron un comportamiento bastante similar en ambos grupos de yogures. Para el Grupo 1 el orden para Ff fue: $C \cong Mwp1 > W80-1 > W35-1$, y en el Grupo 2 se tuvo: $C > Mwp2 > W80-2 \cong W35-2$. Para GD, en el Grupo 1 se obtuvo el orden $Mwp-1 > C \cong W35-1 \cong W80-1$, y para el Grupo 2 $Mwp-2 > C \cong W80-2 > W35-2$. Estos resultados guardan una relación con los obtenidos en los yogures del **Capítulo 1**, ya que los yogures que contenían MWP en su formulación también mostraron mayores valores de Ff y GD, independientemente de sus relaciones CN:WP. Como se mencionó en la descripción de la técnica (**TA 16.1**), GD se calcula como la diferencia entre la firmeza al final y al inicio de la fermentación, indicando que los yogures con MWP (Mwp-1 y Mwp-2) experimentaron el cambio más notorio durante la fermentación; esto también se vio en los yogures del **Capítulo 1** (M1 y M2). Por último, la velocidad de agregación (S) para los yogures del Grupo 1 fue mayor en W35-1 que en C y W80-1, y mayor en Mwp-1 que en C ($Mwp-1 \cong W80-1$, $Mwp-1 \cong W35-1$ y $W80-1 \cong C$). Para el Grupo 2, se tuvo el siguiente orden: $W35-2 > W80-2 > C$ ($Mwp-2 \cong W80-2 \cong C$, $W35-2 > Mwp-2$). Nuevamente se observó un comportamiento similar en los yogures del Capítulo 1, en términos de los ingredientes de WP empleados, donde el yogur W2 mostró mayores valores que los yogures con microparticulado (M1 y M2).

Como se mencionó previamente, algunos autores emplearon el Optigraph® y sondas de NIR para el seguimiento de la formación del gel durante fermentaciones de yogur (4 g/100 g de proteína) (Serra et al., 2007; Arango et al., 2020, respectivamente). Cabe destacar que en ambos casos la relación CN:WP fue de 4:1. Siendo que el Optigraph® es un equipamiento diseñado para estudiar la coagulación de la leche para quesería y, por ende, la longitud de onda o rango de longitudes de onda emitidas (datos no informados por el fabricante) apuntan a detectar cambios en la estructura de las caseínas, podría resultar que la aplicación en yogur no pueda interpretarse exactamente igual que para la coagulación de quesos. El tratamiento térmico aplicado en la tecnología de elaboración de yogur, y la consecuente desnaturalización y precipitación de la β -lactoglobulina sobre las caseínas podría distorsionar la medición (absorción/transmisión de la radiación), lo que podría acentuarse por el alto contenido proteico. Esto podría explicar la falta de diferenciación entre los tiempos de gelificación en las formulaciones con diferentes relaciones CN:WP, o la falta de correlación entre los valores de Ff y GD respecto a las medidas instrumentales de TPA y comportamiento reológico de los yogures, además de las causas previamente mencionadas (análisis realizados en distintos momentos, a diferentes temperaturas, sin enfriamiento ni agitación del gel, etc.). Además, basándonos en el estudio de Arango et al. (2020), la absorción del NIR también podría verse afectada por la variación en el índice de refracción del sistema, por ejemplo, por diferentes concentraciones de proteínas suero, lactosa u otros componentes que se encuentran en solución.

2.3. Parámetros fisicoquímicos

En la **Fig. 2.4** se muestran los valores de pH y AT en las muestras de LB y en los yogures a 1 d y 21 d.

En cuanto al pH y la AT de las LB, no se encontraron diferencias significativas entre las formulaciones en ambos grupos. Al día 1, los valores de pH fueron 4,75-4,80 para el Grupo 1, y 4,72-4,80 para el Grupo 2, sin detectarse diferencias significativas entre los productos de cada grupo. A los 21 d, los valores de pH descendieron significativamente hasta 4,53-4,58 (Grupo 1) y 4,55-4,58 (Grupo 2). No se encontraron diferencias significativas entre los productos a los 21 d en ambos grupos.

Por su parte, para la AT no se observaron diferencias significativas entre los yogures de cada grupo al día 1 (102,6-108,8 °D y 100,8-108,6 °D). A los 21 d, no se detectaron diferencias significativas en el Grupo 1 (121,4-126,7 °D) pero sí entre los yogures del Grupo 2 (C≅W35-2>W80-2). Los valores de AT aumentaron significativamente en todos los casos, pero a pesar de ello la AT de todos los productos fue menor a 150 °D a lo largo del almacenamiento, cumpliendo la normativa (CAA, 2006).

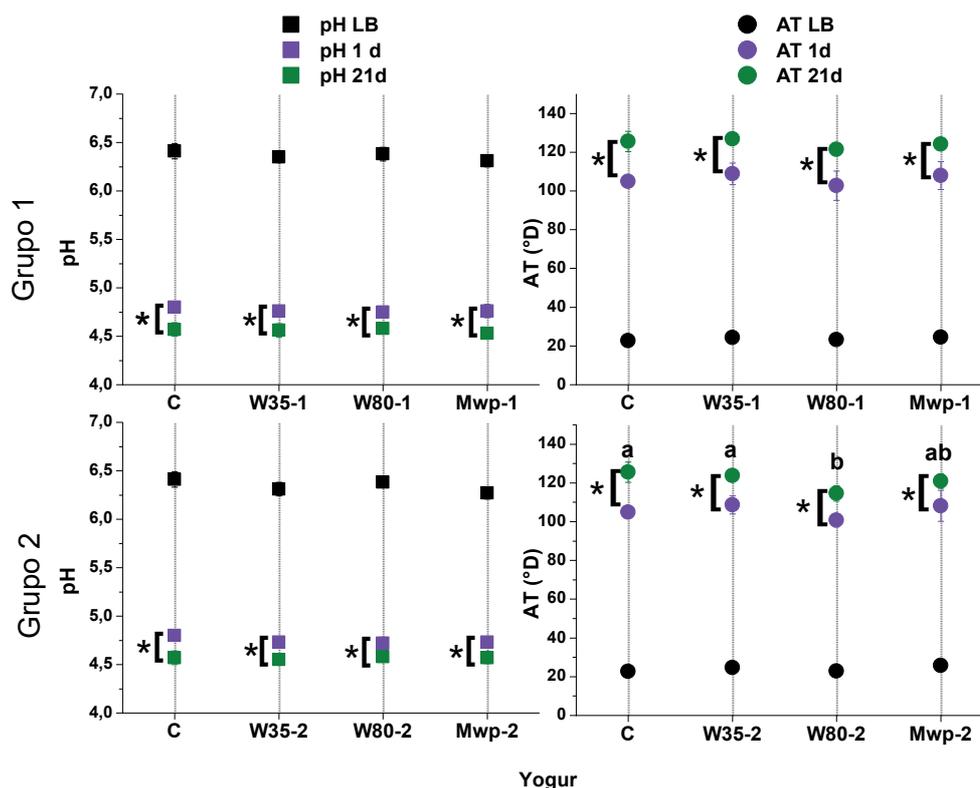


Fig. 2.4. Valores de pH (izq.) y AT (der.) de leches base (LB) y yogures a 1 d y 21 d de almacenamiento.

Los resultados se expresan como el valor medio ± desviación estándar de 3 réplicas de elaboración. Letras distintas para un mismo punto de muestreo indican diferencias significativas entre yogures ($p < 0,05$). * indica diferencias significativas entre puntos de muestreo para una misma formulación ($p < 0,05$).

Los niveles de pH obtenidos para los yogures coinciden con los de Körzendörfer y Hinrichs (2019), que emplearon MPC80 para formular yogures con 10 g/100 g de proteína; sin embargo,

estos autores observaron un decaimiento más drástico del pH, en un menor tiempo de almacenamiento respecto al aplicado en nuestro trabajo, atribuido al uso de un fermento con alta actividad post acidificante ($\Delta\text{pH}\sim 0,45$ al día 9 de almacenamiento). El fermento empleado en nuestro trabajo (YF-L811) tiene baja actividad post acidificante, según lo informado por el fabricante (Chr. Hansen, <https://www.chr-hansen.com/es/food-cultures-and-enzymes/fresh-dairy/cards/collection-cards/yoflex>). Además, como se verá posteriormente, los bajos niveles de lactosa residual luego de la fermentación resultan una ventaja para evitar que se produzca una excesiva post acidificación. Otros autores hallaron menores valores de pH y mayor AT en yogures con 5 g/100 g de proteína elaborados con MPC80 (3,93 y 133 °D, respectivamente) (Delikanli y Ozcan, 2017).

2.4. Composición global, microbiología y CRA de los yogures

La composición de los yogures se muestra en las **Tablas 2.6** (Grupo 1) y **2.7** (Grupo 2).

Tabla 2.6. Composición global y recuentos microbiológicos de los yogures del Grupo 1 (21 d)

Parámetros	Yogur			
	C	W35-1	W80-1	Mwp-1
Proteína (g/100 g)	7,35±0,17	7,61±0,12	7,67±0,19	7,44±0,38
Grasa (g/100 g)	0,99±0,05	1,15±0,11	1,01±0,03	1,16±0,10
ST (g/100 g)	14,77±0,45 ^c	16,75±0,25 ^a	15,20±0,17 ^{bc}	15,71±0,60 ^b
Cenizas (g/100 g)	1,10±0,02	1,18±0,04	1,09±0,04	1,10±0,04
Calcio (mg/100 g)	209,5±15,2	186,1±6,3	177,6±11,9	176,9±0,4
<i>S. thermophilus</i> (log ufc/g)	9,17±0,09	9,16±0,05	9,15±0,05	9,29±0,19
<i>L. bulgaricus</i> (log ufc/g)	3,50±0,48	3,59±0,25	3,49±0,43	3,70±0,35
MyL (log ufc/g)	<1	<1	<1	<1

Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de 3 réplicas de elaboración.

Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre yogures ($p<0,05$).

ST: sólidos totales; MyL: mohos y levaduras.

Tabla 2.7. Composición global y recuentos microbiológicos de los yogures del Grupo 2 (21 d)

Parámetros	Yogur			
	C	W35-2	W80-2	Mwp-2
Proteína (g/100 g)	7,35±0,17	7,47±0,11	7,50±0,23	7,56±0,10
Grasa (g/100 g)	0,99±0,05	1,07±0,03	1,10±0,04	1,00±0,05
ST (g/100 g)	14,77±0,45 ^c	17,14±0,48 ^a	15,07±0,26 ^c	16,35±0,27 ^b
Cenizas (g/100 g)	1,10±0,02	1,19±0,05	1,02±0,02	1,10±0,04
Calcio (mg/100 g)	209,5±15,2	177,2±7,2	177,6±12,0	173,6±9,3
<i>S. thermophilus</i> (log ufc/g)	9,17±0,09	9,17±0,08	9,18±0,05	9,10±0,15
<i>L. bulgaricus</i> (log ufc/g)	3,50±0,48	3,60±0,14	3,44±0,38	3,63±0,54
MyL (log ufc/g)	<1	<1	<1	<1

Los resultados se expresan como el valor medio ± desviación estándar de 3 réplicas de elaboración.

Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

ST: sólidos totales; MyL: mohos y levaduras.

Los niveles de proteína superaron los 7 g/100 g en todos los casos, pudiendo considerarse productos fermentados concentrados (FAO/OMS, 2011a). No se hallaron diferencias significativas en los contenidos proteicos de los yogures para cada grupo. Tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles de grasa entre los productos, siendo en todos los casos menor a 1,5 g/100 g; los productos se incluyen en la categoría de yogures parcialmente descremados (CAA, 2006). Se encontraron diferencias significativas en los ST de los yogures en ambos grupos. Para el Grupo 1, la formulación W35-1 tuvo el mayor contenido de ST, y en Mwp-1 fue mayor a C. Dentro del Grupo 2, el orden fue W35-2>Mwp-2>W80-2≅C. La principal diferencia composicional entre las muestras W35-1 y W35-2 en relación al resto de los yogures de cada grupo, fue el contenido de ST, y esto se asocia a la concentración de lactosa, como se verá en el apartado 2.4. En efecto, la composición de los ingredientes (Tabla 2.1) muestra que el contenido de lactosa es superior en WPC35 que en el resto de los ingredientes por lo que es esperable encontrar mayor contenido de este carbohidrato en los yogures W35-1 y W35-2 que en el resto de los productos. Esta fue la única diferencia composicional encontrada, ya que las cenizas y el calcio fueron similares entre los yogures en ambos grupos. Teniendo en cuenta que la mayor parte del calcio se encuentra asociado a las micelas de caseína podría esperarse que el yogur C presentara mayores niveles que el resto de los yogures, pero también hay un aporte que proviene de los ingredientes de proteínas de suero correspondiente al calcio soluble de la leche que, aparentemente, equipararía la concentración de este mineral en todos los yogures (Tabla 2.1).

El contenido de calcio obtenido para los yogures (174-209 mg/100 g) estuvo en línea con lo reportado por Jørgensen et al. (2015), quienes hallaron valores entre 180 y 260 mg/100 g para yogures altos en proteína (8 g/100 g) elaborados con concentrado de caseína y proteínas de suero nativas (ambos obtenidos por microfiltración).

El recuento de *S. thermophilus* fue similar entre los yogures en ambos grupos, y en todos los casos fue >9 log ufc/g. El recuento de *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* tampoco mostró diferencias significativas entre los productos de ninguno de los grupos, y sus valores fueron >3 log ufc/g. Estos niveles fueron reportados previamente en otras formulaciones de yogur para el mismo fermento comercial (Vénica et al., 2023a). No se detectaron mohos y levaduras en los yogures (<1 log ufc/g) (Tablas 2.6 y 2.7). Estos resultados responden satisfactoriamente a la normativa alimentaria y a la definición de yogur (CAA, 2006).

En la Fig. 2.5 se presenta la evolución de la CRA durante el almacenamiento en los yogures de ambos Grupos.

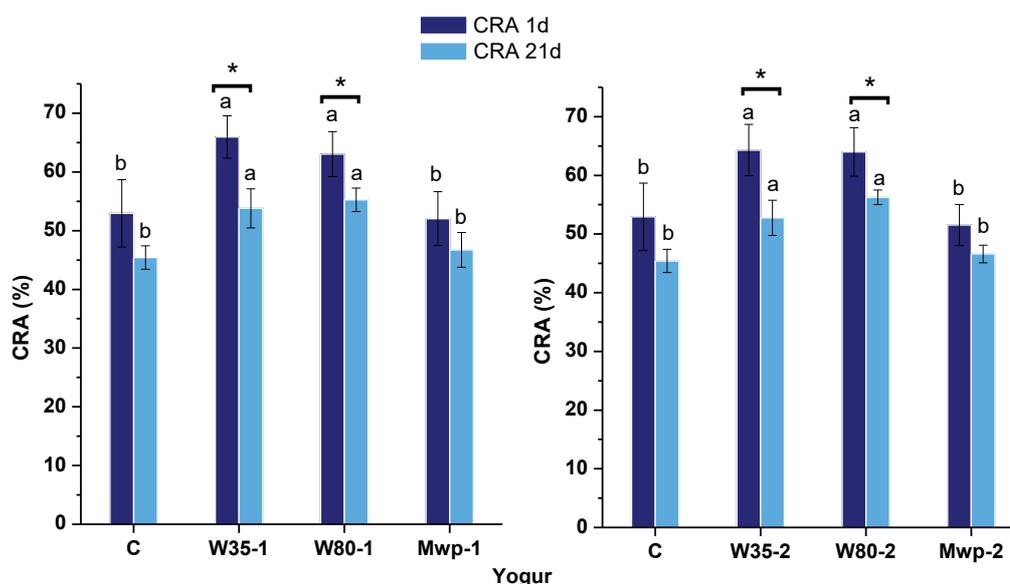


Fig. 2.5. Niveles de CRA (%) en los yogures del Grupo 1 (izq.) y del Grupo 2 (der.) a 1 d y 21 d de almacenamiento.

Los resultados se expresan como el valor medio ± desviación estándar de 3 réplicas de elaboración. Letras distintas para un mismo punto de muestreo indican diferencias significativas entre yogures (p<0,05). * indica diferencias significativas entre puntos de muestreo para una misma formulación (p<0,05).

Se observó una tendencia similar en ambos casos. Para el Grupo 1, los valores (días 1 y 21) fueron mayores en W35-1 (65,9±3,6 y 53,8±3,3 %) y W80-1 (63,01±3,8 y 55,3±2,0 %) que en C (52,9±5,7 y 45,4±2,0 %) y Mwp-1 (52,0±4,6 y 46,7±3,0 %); para el Grupo 2, se encontraron mayores valores en W35-2 (64,3±4,4 y 52,7±3,0 %) y W80-2 (64,0±4,1 y 56,3±1,2 %) que en C y Mwp-2 (51,5±3,5 y 46,6±1,5 %). Los yogures W35-1, W80-1, W35-2 y W80-2 mostraron una reducción significativa de la CRA entre el día 1 y el 21, lo cual no fue observado para C, Mwp-1

ni Mwp-2. Los valores de CRA de estos yogures fueron similares a los obtenidos para los productos presentados en el **Capítulo 1**. Como ya fue mencionado previamente, la CRA se ve afectada por distintos parámetros de la elaboración de yogur, entre ellos, los ingredientes empleados. En general, se ha observado que el agregado de concentrados de proteínas de suero genera microestructuras más densas, con agregados proteicos de distintos tamaños, bien interconectados y poros pequeños, que colaboraría positivamente en la CRA, aunque esto presenta una fuerte dependencia con las características tecnofuncionales de cada ingrediente (proceso de obtención, historial térmico, tamaño de partículas, etc.) (Guzmán-González et al., 1999). Es por esto que algunos autores presentan resultados contradictorios al emplear WPC en yogures (~4 g/100 g de proteína) en reemplazo, parcial o total, de SMP (Remeuf et al., 2003; Sodini et al., 2005). Relacionado con lo anterior y en concordancia con nuestros resultados, el agregado de MWP como mejorador de textura en yogures con bajo contenido graso produjo una disminución de la CRA en yogures con ~8 g/100 g de proteína respecto a un control formulado con SMP y MPC (Silva y O'Mahony, 2018). Esto se ha atribuido a la desnaturalización que sufre la proteína de suero al ser sometida al tratamiento de microparticulación, lo que hace que se comporte como material inerte durante el tratamiento térmico e interaccione menos con las micelas de caseína, dando como resultado una estructura más abierta, menos densa y más propensa a liberar suero, como se mencionó anteriormente.

Además de los ingredientes, pero en estrecho vínculo con estos, la relación CN:WP también es un factor de importancia en la CRA. En general, la reducción de la relación CN:WP (es decir, al aumentar la fracción de proteínas de suero) aumenta la interconexión entre las proteínas de la matriz del yogur logrando una estructura más compacta y con mayor cantidad de agua inmovilizada, aumentando la CRA (Arab et al., 2023). Esto puede ser una explicación para los mayores valores de CRA obtenidos en los yogures con WPC, respecto al yogur C. Sin embargo, este efecto no se corresponde al comparar los yogures C con MWP (que tienen mayor proporción de proteínas de suero que el yogur C), ya que los valores de CRA fueron similares. Como ya se mencionó previamente, las características tecnofuncionales del ingrediente MWP (mayor grado de desnaturalización de las proteínas de suero en la manufactura del ingrediente, y consecuente menor interacción con las caseínas en el tratamiento térmico y formación del gel) pueden ser las causas de este resultado, respaldando la hipótesis mencionada y profundizando el efecto ya observado en el **Capítulo 1**.

Por otro lado, la variación de la CRA en el tiempo de almacenamiento para los yogures con WPC35 y WPC80 indica que ocurren modificaciones en la microestructura de los mismos. Estos cambios se han vinculado a variables reológicas implicadas en la formación del gel, como el módulo elástico (G'), los umbrales de deformación y esfuerzo y la tangente de δ . Estos guardan estrecha relación con la evolución de la estructura del yogur en el tiempo de almacenamiento (número y fuerza de los enlaces y contracción del gel) (Lucey, 2002). Resultados similares fueron

observados por Guénard-Lampron et al. (2020) durante el almacenamiento de yogures con ~4 g/100 g de proteína y por Bierzuńska et al. (2019) para yogures con ~8 g/100 g de proteína, ambos formulados con WPC34 y WPC80, respectivamente.

2.5. Ácidos orgánicos y carbohidratos de las leches base y de los yogures

Los perfiles de ácidos orgánicos y carbohidratos obtenidos en los 3 puntos de muestreo (LB, 1 d y 21 d) en los Grupos 1 y 2, se muestran en las **Fig. 2.6** y **2.7**, respectivamente.

Para el Grupo 1 (**Fig. 2.6**), se encontraron mayores niveles de ácido cítrico en LB_W35-1 (296,3±5,8 mg/100 g) que en LB_C (237,0±0,7 mg/100 g) y LB_W80-1 (214,4±15,8 mg/100 g), y similares en LB_Mwp-1 (267,2±17,2 mg/100 g), el cual fue mayor a LB_W80-1. Al día 1, el contenido de ácido cítrico en los yogures W35-1 (280,7±27,7 mg/100 g) y Mwp-1 (266,4±12,7 mg/100 g) fue mayor que en W80-1 (223,1±4,7 mg/100 g); C (240,8±9,3 mg/100 g) no mostró diferencias significativas con ninguno de los yogures. A los 21 d, se tuvieron mayores valores en W35-1 (287,8±15,0 mg/100 g) que en C (221,8±20,2 mg/100 g) y en W80-1 (234,5±6,4 mg/100 g), mientras que Mwp-1 (259,6±25,2 mg/100 g) no se diferenció de ningún yogur. No se produjeron cambios con el tiempo para cada uno de los productos.

El contenido de ácido orótico fue mayor en LB_W35-1 (8,8±0,2 mg/100 g) que en el resto de las muestras de LB (6,9±0,2, 6,4±0,5 y 6,9±0,7 mg/100 g, para LB_C, LB_W80-1 y LB_Mwp-1, respectivamente). A los días 1 y 21 la tendencia observada fue la misma que en las LB. Al igual que para el ácido cítrico, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de ácido orótico entre los distintos puntos de muestreo en cada yogur.

El ácido hipúrico alcanzó valores entre 2,0 y 2,6 mg/100 g en las LB, siendo mayor en LB_W35-1 que LB_W80-1. Al día 1, no se encontraron diferencias significativas entre los yogures, pero sí una disminución del 40-50% respecto al nivel observado en la LB de cada formulación. A los 21 d, los niveles fueron mayores en W35-1 (1,4±0,1 mg/100 g) que en C (0,9±0,1 mg/100 g) y Mwp-1 (1,1±0,0 mg/100 g), similares a W80-1 (1,1±0,1 mg/100 g), mientras que W80-1 superó los niveles de C. La concentración de ácido hipúrico descendió significativamente del día 1 al 21 solo en C, y en el resto de los productos la disminución significativa se produjo entre las LB y los yogures a 1 d y entre las LB y los yogures a 21 d.

El ácido láctico no se detectó en las LB. Los niveles producidos en la fermentación, analizados en los yogures a 1 d de almacenamiento, fueron de 1164,4±48,7, 1268,5±48,3, 1105,6±31,9 y 1170,1±23,1 mg/100 g en C, W35-1, W80-1 y Mwp-1, respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los yogures a los 21 d: 1332,6±165,5, 1390,4±55,7, 1400,5±68,6 y 1367,5±144,4 mg/100 g en C, W35-1, W80-1 y Mwp-1, respectivamente. Solo se encontró un incremento significativo de ácido láctico entre el día 1 y 21 en W80-1.

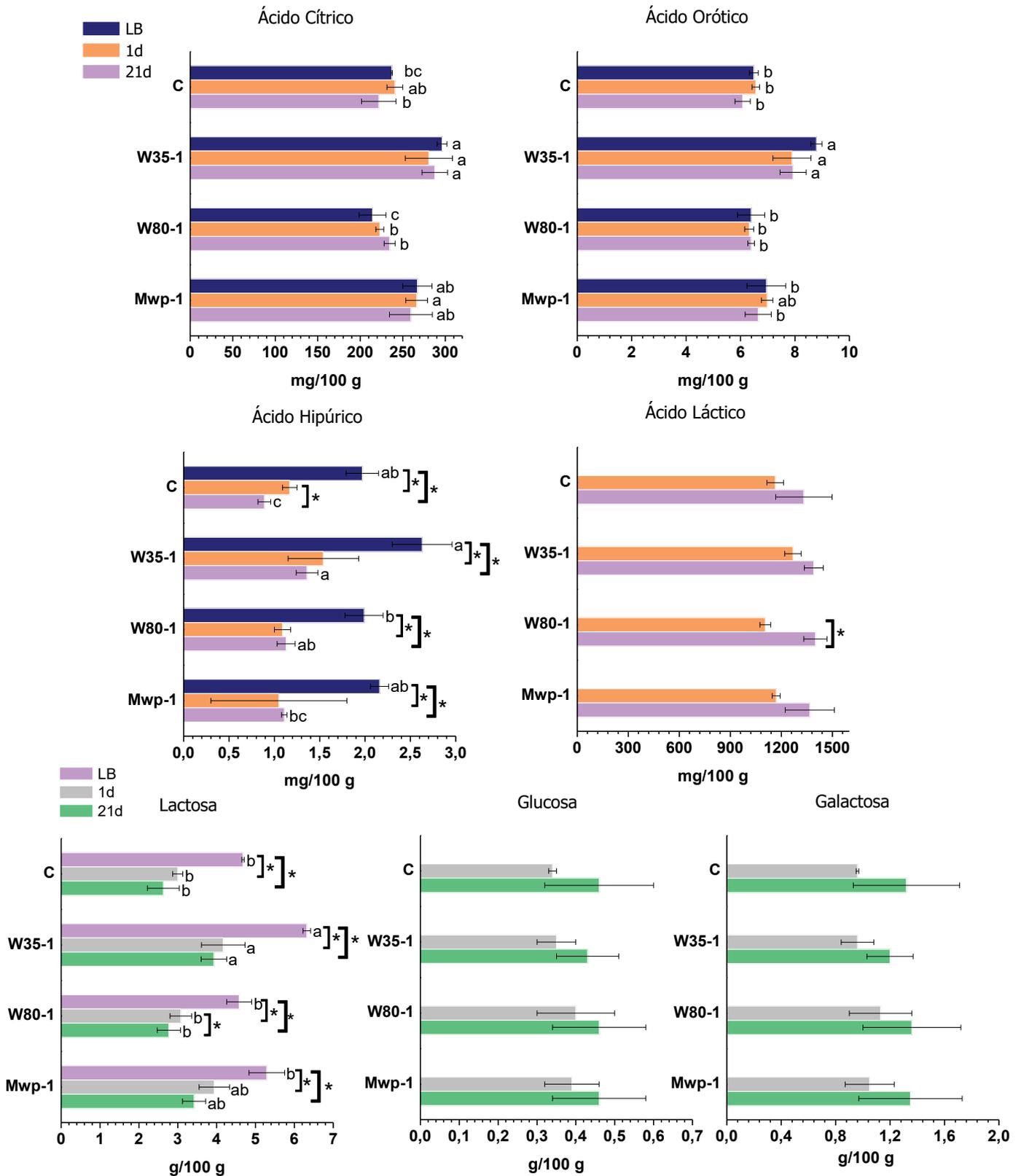


Fig. 2.6. Concentración de ácidos orgánicos (mg/100 g) y carbohidratos (g/100 g) de las leches base (LB) y de los yogures del Grupo 1 (1 d y 21 d, según corresponda).

Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de 3 réplicas de elaboración. Letras distintas para un mismo punto de muestreo indican diferencias significativas entre yogures ($p < 0,05$). * indica diferencias significativas entre puntos de muestreo para una misma formulación ($p < 0,05$).

El único carbohidrato detectado en las LB fue lactosa, que alcanzó valores de $6,3\pm 0,1$, $5,3\pm 0,5$, $4,9\pm 0,1$ y $4,6\pm 0,3$ g/100 g en LB_W35-1, LB_Mwp-1, LB_C y LB_W80-1, respectivamente; LB_W35-1 tuvo mayores valores que el resto de las LB. Al día 1 la concentración de lactosa siguió la tendencia $W35-1 (4,2\pm 0,6 \text{ g/100 g}) > W80-1 (3,1\pm 0,3 \text{ g/100 g}) \cong C (3,0\pm 0,1 \text{ g/100 g})$, y Mwp-1 ($3,9\pm 0,4$ g/100 g) similar a los demás yogures. Similar comportamiento se tuvo a los 21 d. Como era esperable, los niveles de lactosa de los yogures a 1 d fueron menores que los encontrados en sus respectivas LB. A los 21 d, no cambió la tendencia del día 1, solo se observó una disminución significativa entre 1 d y 21 d en el yogur W80-1. Los valores finales de lactosa, a los 21 d, fueron $2,6\pm 0,4$, $3,9\pm 0,3$, $2,8\pm 0,3$ y $3,4\pm 0,6$ g/100 g en C, W35-1, W80-1 y Mwp-1, respectivamente.

Se encontraron bajos niveles de glucosa ($0,3-0,4$ g/100 g) y galactosa ($1,0-1,1$ g/100 g) en los yogures a 1 d, sin diferencias significativas entre los productos. A los 21 d, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los yogures para ambos compuestos ($0,4-0,5$ g/100 g de glucosa y $1,2-1,4$ g/100 g de galactosa). El tiempo de almacenamiento no afectó los niveles de glucosa y galactosa detectados en los yogures.

Para el Grupo 2 (**Fig. 2.7**), LB_W35-2 ($300,8\pm 26,3$ mg/100 g) tuvo mayor contenido de ácido cítrico que LB_C ($237,0\pm 0,7$ mg/100 g) y LB_W80-2 ($210,6\pm 10,8$ mg/100 g), y similar que en LB_Mwp-2 ($269,6\pm 19,4$ mg/100 g). A los días 1 y 21, la tendencia fue la misma. No se detectaron diferencias significativas entre los valores en los distintos puntos de muestreo para cada yogur.

El ácido orótico en LB mostró valores de $6,1\pm 0,3$, $8,7\pm 0,3$, $5,6\pm 0,8$ y $6,9\pm 0,2$ mg/100 g en C, LB_W35-2, LB_W80-2 y LB_Mwp-2, respectivamente; el valor en LB_W35-2 fue mayor al resto de las muestras. Al día 1 la tendencia fue similar a la observada en las LB, mientras que, a los 21 d, el contenido de ácido orótico fue menor en W80-2 ($5,6\pm 0,8$ mg/100 g) que en W35-2 ($8,7\pm 0,3$ mg/100 g) y Mwp-2 ($6,9\pm 0,2$ mg/100 g); Mwp-2 fue similar a C ($6,1\pm 0,3$ mg/100 g). No se encontraron diferencias significativas entre los distintos puntos de muestreo para cada yogur.

El ácido hipúrico en LB_W35-2 fue mayor que en el resto de las LB ($2,9\pm 0,3$ mg/100 g vs. $2,0\pm 0,2$ mg/100 g en C, $2,0\pm 0,2$ mg/100 g en W80-2 y $2,1\pm 0,3$ mg/100 g en Mwp-2). Al día 1, los niveles se igualaron en W35-2 ($1,9\pm 0,1$ mg/100 g) y en Mwp-2 ($1,6\pm 0,1$ mg/100 g), y ambos fueron mayores que en C ($1,2\pm 0,1$ mg/100 g). La concentración en W80-2 ($1,3\pm 0,2$ mg/100 g) fue menor que en W35-2 y similar a los otros productos. Finalmente, a los 21 d, el nivel en W35-2 fue mayor que en el resto de los yogures. Al igual que en el Grupo 1, la concentración de ácido hipúrico fue menor en los yogures a los días 1 y 21 que en las respectivas LB; también se observó un descenso entre el día 1 y 21 en el yogur Mwp-2.

El ácido láctico al día 1 alcanzó valores de $1164,4\pm 48,7$, $1148,7\pm 99,1$, $1063,7\pm 54,9$ y $1112,4\pm 56,4$ mg/100 g en los yogures C, W35-2, W80-2 y Mwp-2, respectivamente, sin diferencias significativas entre los mismos.

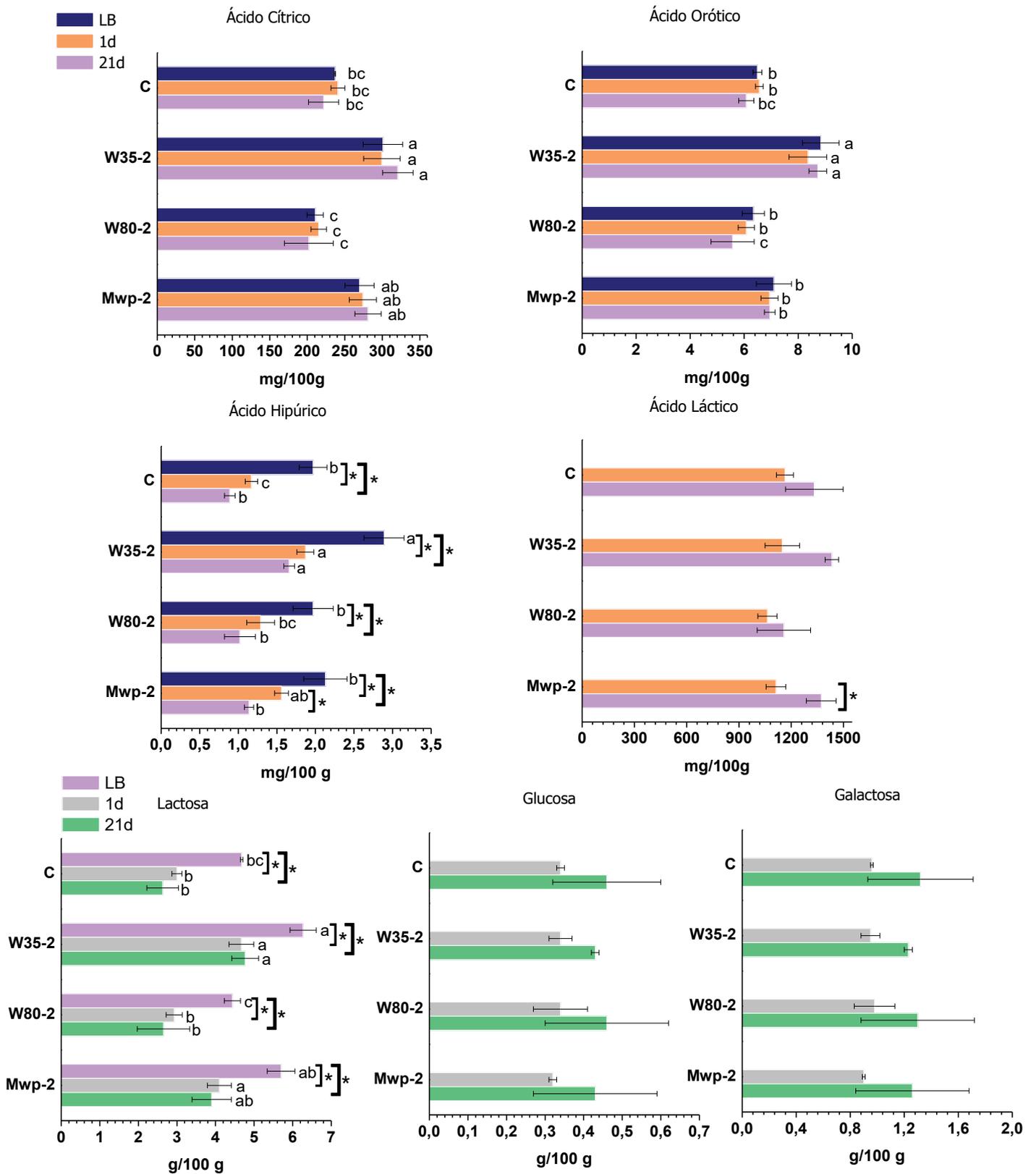


Fig. 2.7. Concentración de ácidos orgánicos (mg/100 g) y carbohidratos (g/100 g) de las leches base (LB) y de los yogures del Grupo 2 (1 d y 21 d, según corresponda).

Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de 3 réplicas de elaboración. Letras distintas para un mismo punto de muestreo indican diferencias significativas entre yogures ($p < 0,05$). * indica diferencias significativas entre puntos de muestreo para una misma formulación ($p < 0,05$).

Tampoco se encontraron diferencias significativas en los niveles de ácido láctico entre los distintos yogures a los 21 d ($1332,6 \pm 165,5$, $1433,4 \pm 38,6$, $1158,1 \pm 153,3$ y $1372,5 \pm 85,7$ mg/100 g, para C, W35-2, W80-2 y Mwp-2, respectivamente). Solo se observaron diferencias significativas entre el día 1 y 21 en el yogur Mwp-2.

Los niveles de lactosa en LB fueron $6,5 \pm 0,4$, $5,7 \pm 0,4$, $4,9 \pm 0,1$ y $4,4 \pm 0,2$ g/100 g en W35-2, Mwp-2, C y W80-2, respectivamente; la lactosa fue mayor en W35-2 que en W80-2 y C, y similar a Mwp-2. Al día 1, la tendencia fue $W35-2 \cong Mwp-2 > C \cong W80-2$ ($4,7 \pm 0,3$, $4,1 \pm 0,3$, $3,0 \pm 0,1$ y $2,9 \pm 0,2$ g/100 g, respectivamente). A los 21 d, los niveles de lactosa en W35-2 fueron mayores que en C y W80-2, y similares a Mwp-2 (Mwp-2 tampoco se diferenció de C y W80-2); los valores encontrados en C, W35-2, W80-2 y Mwp-2, fueron $2,6 \pm 0,4$, $4,8 \pm 0,3$, $2,6 \pm 0,7$ y $3,9 \pm 0,5$ g/100 g, respectivamente. Se halló una reducción significativa entre las LB y los respectivos yogures a los días 1 y 21, como era esperable, pero no se observaron diferencias significativas entre los días 1 y 21 para cada producto.

Al igual que lo mencionado para las muestras del Grupo 1, no se encontró glucosa y galactosa en las LB. Las concentraciones de glucosa y galactosa no mostraron diferencias significativas entre los yogures al día 1 ni al día 21. Al día 1, los niveles fueron de $\sim 0,3$ g/100 g para glucosa y $\sim 1,0$ g/100 g para galactosa. Al día 21, la concentración de glucosa fue de $\sim 0,4$ g/100 g y la de galactosa $\sim 1,3$ g/100 g. Tampoco se encontraron diferencias significativas de glucosa y galactosa con el tiempo de almacenamiento para cada yogur.

El comportamiento observado en las LB y en los yogures (1 d y 21 d) para los ácidos orgánicos y los carbohidratos fue similar entre los Grupos 1 y 2, denotando la influencia de los ingredientes empleados en cada formulación, más que de la relación CN:WP que presentaban.

Los ácidos cítrico, orótico e hipúrico se encuentran naturalmente en la leche bovina y, en consecuencia, en los ingredientes lácteos (Tormo e Izco, 2004). Tanto en el Grupo 1 como en el Grupo 2, el ácido cítrico prevaleció en las LB que contenían WPC35 y MWP, y los ácidos orótico e hipúrico, en las LB con WPC35. Esto puede atribuirse al empleo de una mayor cantidad de estos ingredientes para alcanzar los niveles de proteína propuestos, ya que los mismos son los de menor contenido proteico (35 y 45 g/100 g de proteína en WPC35 y MWP, respectivamente). La disminución del ácido hipúrico luego de la fermentación y durante el almacenamiento también fue reportada por Vénica et al. (2014), y se ha demostrado que las BAL del fermento de yogur presentan la capacidad de convertir el ácido hipúrico en ácido benzoico (Sieber et al., 1995).

A pesar de que los niveles de lactosa mostraron diferencias significativas entre las distintas LB, la producción de ácido láctico fue similar para todos los yogures a 1 d y 21 d. Tampoco se encontraron diferencias en los niveles de glucosa y galactosa entre los yogures, a cada uno de los tiempos estudiados. En general, las BAL del fermento hidrolizan un 30-40% de la lactosa inicial y requieren un mínimo de ~ 2 g/100 g de lactosa para disminuir el pH de la leche desde 6,5 hasta 4,6, que equivale a la producción de un nivel típico de ácido láctico de 1,3-1,5 g/100 g (Chandan,

2006). Resulta de interés destacar las diferencias en la concentración de lactosa final entre los distintos yogures. Como se observó en el **Capítulo 1**, yogures altos en proteína elaborados con leche UHT, SMP, WPC35 y MWP arrojaron concentraciones de lactosa en LB de 8,7-9,4 g/100 g, que luego de la fermentación y almacenamiento por 21 d disminuyeron a 5,1-6,6 g/100 g. En los yogures presentados en este Capítulo esos valores fueron ampliamente reducidos gracias al uso de MPC70 en las formulaciones. Como fue mencionado previamente, la incorporación de mayor cantidad de polvos lácteos con menor contenido proteico provoca un aumento significativo de la concentración de lactosa en LB y consecuentemente en yogur, como fue observado en W35-1, Mwp-1, W35-2 y Mwp-2. La utilización de WPC80 en los yogures W80-1 y W80-2 permitió aumentar la proteína hasta el nivel deseado y obtener yogures con menor contenido de lactosa residual, al igual que en el caso del yogur C que solo contenía MPC70. El uso de estos ingredientes con altos niveles proteicos resulta ventajoso ya que el aporte de lactosa es mucho menor que al emplear SMP o WPC35, permitiendo obtener yogures altos en proteína con 2,5-3 g/100 g de lactosa (Patel, 2011). Como se mencionó en relación a la evolución de la AT durante el almacenamiento, la combinación de bajos niveles de lactosa residual (al final de la fermentación) y el uso de un fermento con baja post acidificación contribuyen a una baja producción de ácido durante el almacenamiento, con respecto a lo observado en los yogures del **Capítulo 1**. Los datos reportados sobre ácidos orgánicos y carbohidratos en yogures altos en proteína son muy escasos.

2.6. Perfil de compuestos volátiles de los yogures

Un total de 22 compuestos volátiles se identificaron en los distintos yogures (21 d), pertenecientes a los grupos químicos de las cetonas (9), ácidos (8) y aldehídos (5). Los mismos compuestos fueron identificados en todas las muestras analizadas y se encuentran reportados como característicos del perfil aromático de yogur (Cheng, 2010; Routray y Mishra, 2011).

Independientemente de la relación CN:WP en los yogures de ambos grupos, las cetonas fueron el grupo mayoritario (entre el 48 y el 59% del total de compuestos identificados), seguido por los ácidos (33-39%), y en menor proporción se encontraron los aldehídos (8-13%) (**Fig. 2.8**).

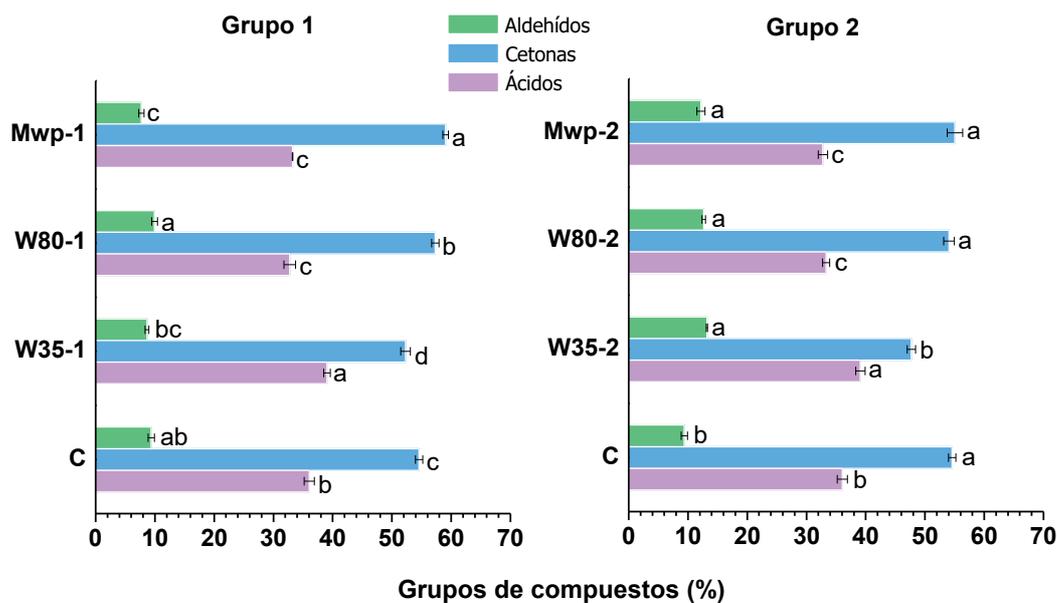


Fig. 2.8. Porcentaje de grupos químicos de compuestos volátiles respecto al al área total en los yogures del Grupo 1 (**izq.**) y del Grupo 2 (**der.**) (21 d).

Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de 3 réplicas de elaboración. Letras distintas indican diferencias significativas entre yogures ($p < 0,05$).

En el yogur C las cetonas representaron el 55%, los ácidos el 36% y los aldehídos el 9% del total de compuestos.

Dentro del grupo de las cetonas, se identificaron 4 metilcetonas de número impar de átomos de carbono (C3 a C11), la 2-butanona, las dicetonas: diacetilo y 2,3-pentanodiona, y la hidroxicetona: acetoína. Desde el punto de vista cuantitativo las cetonas mayoritarias fueron el diacetilo, la acetoína y la 2-heptanona.

La fracción ácida contuvo 6 ácidos de número par de átomos de carbono (desde C2:0 a C12:0) y 2 ácidos de número impar de átomos de carbono (C7:0 y C9:0). Los ácidos mayoritarios fueron el hexanoico (C6:0) y el octanoico (C8:0).

Los aldehídos identificados fueron diversos: aldehídos saturados de cadena lineal de átomos de carbono tales como acetaldehído, hexanal, heptanal y nonanal, y un aldehído aromático (benzaldehído). El acetaldehído y el hexanal presentaron mayores valores de área que el resto de los aldehídos.

Para el Grupo 1, la fracción aromática de los yogures Mwp-1 tuvo la siguiente composición: cetonas (60%), ácidos (32%) y aldehídos (8%); los yogures W80-1 se caracterizaron por: cetonas (57%), ácidos (33%) y aldehídos (10%), mientras que las muestras W35-1 contuvieron: cetonas (52%), ácidos (39%) y aldehídos (9%). Se observaron algunas diferencias en los grupos químicos de compuestos volátiles entre los yogures, como puede verse en la **Fig. 2.8**: la fracción de cetonas siguió el siguiente orden: Mwp-1 > W80-1 > C > W35-1; la proporción de ácidos presentó el orden: W35-1 > C > W80-1 \cong Mwp-1, en tanto que el valor porcentual de los aldehídos fue mayor en W80-1 y menor en la formulación Mwp-1.

El análisis de los compuestos volátiles individuales (**Tabla 2.8**), reveló algunas particularidades para las distintas formulaciones.

Tabla 2.8. Compuestos volátiles (valores de áreas en unidades arbitrarias x 1000) de los yogures del Grupo 1 (21 d).

Compuestos	Yogur			
	C	W35-1	W80-1	Mwp-1
<i>Aldehídos</i>				
Acetaldehído	68±5 ^b	103±10 ^a	101±9 ^a	93±11 ^a
Benzaldehído	39±2 ^a	38±3 ^a	42±4 ^a	28±2 ^b
Hexanal	61±9 ^a	27±3 ^c	54±2 ^{ab}	47±4 ^b
Heptanal	18±1 ^b	53±3 ^a	50±3 ^a	16±3 ^b
Nonanal	30±1 ^a	30±1 ^a	16±0 ^b	19±3 ^b
<i>Cetonas</i>				
2-propanona	99±8 ^{bc}	118±9 ^{ab}	128±7 ^a	86±11 ^c
2-butanona	52±10	57±7	62±4	57±9
2-pentanona	61±5 ^b	97±6 ^a	84±6 ^a	98±8 ^a
2,3-pentanodiona	115±12 ^a	106±3 ^{ab}	89±4 ^b	97±12 ^{ab}
2-heptanona	196±12 ^b	238±7 ^a	171±6 ^b	252±13 ^a
2-nonanona	60±4	53±5	50±3	57±4
2-undecanona	19±2 ^a	17±1 ^{ab}	14±1 ^b	17±1 ^{ab}
Acetoína	241±13 ^c	299±2 ^{ab}	326±21 ^a	277±4 ^b
Diacetilo	421±21 ^c	523±20 ^b	591±29 ^{ab}	613±31 ^a
<i>Ácidos</i>				
Acético	50±4 ^b	81±5 ^a	91±16 ^a	81±1 ^a
Butanoico	98±10 ^b	158±6 ^a	107±14 ^b	107±8 ^b
Hexanoico	297±12 ^b	393±18 ^a	311±16 ^b	321±12 ^b
Heptanoico	7±1	8±1	10±2	8±1
Octanoico	268±7 ^b	318±16 ^a	214±6 ^c	228±4 ^c
Nonanoico	6±1	8±1	8±1	7±0
Decanoico	97±5 ^b	142±6 ^a	107±11 ^b	108±6 ^b
Dodecanoico	11±2 ^b	19±1 ^a	17±1 ^a	16±2 ^a

Los resultados se expresan como el valor medio ±desviación estándar de 3 réplicas de elaboración. Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre yogures ($p < 0,05$).

En el caso de los aldehídos, el acetaldehído, uno de los componentes más relevantes en el aroma del yogur, tuvo un mayor contenido en las distintas formulaciones que en el yogur C.

Respecto al benzaldehído, el nivel fue menor en los yogures Mwp1 que en el resto de los productos. Los aldehídos provenientes de oxidación lipídica presentaron niveles variados en los distintos yogures. En general, hexanal y nonanal presentaron altos valores en el yogur C. El heptanal alcanzó los mayores niveles en las formulaciones W35-1 y W80-1.

Dentro de las cetonas, dos componentes claves del aroma, tales como acetoína y diacetilo, y otros compuestos cuantitativamente importantes en la fracción volátil, tales como 2-pentanona y 2-heptanona, tuvieron menores niveles en el yogur C en comparación con los restantes yogures.

En el caso de los compuestos del grupo de los ácidos se observaron mayores niveles de ácido butanoico, hexanoico, octanoico y decanoico en el yogur W35-1 en comparación con los restantes yogures, sugiriendo una mayor actividad lipolítica en este producto. Por su parte, el ácido acético, producto resultante mayoritariamente del metabolismo de los carbohidratos, presentó los menores valores en el yogur C.

El análisis por componentes principales (PCA) aplicado a los compuestos individuales, obtenidos para los distintos yogures del Grupo 1 (tres réplicas de cada uno de ellos) se presenta en la **Fig. 2.9**.

PC1 y PC2 explicaron el 65% de la varianza total y permitieron establecer tres agrupamientos bien definidos de las muestras. De izquierda a derecha de PC1, las muestras del yogur C se localizaron en el extremo más negativo de PC1 (cuadrante izquierdo), siendo la 2-nonanona, 2,3-pentanodiona, nonanal, 2-undecanona y hexanal los componentes que más contribuyeron a esta separación. En el extremo positivo de PC1 y de PC2 (cuadrante superior derecho) se ubicaron las muestras de W35-1, las cuales parecen agruparse por la incidencia de los ácidos (butanoico, hexanoico, octanoico y decanoico) y 2-heptanona. En el extremo positivo de PC1 y negativo de PC2 (cuadrante derecho inferior) se agruparon las muestras de W80-1, las cuales se caracterizaron por benzaldehído, diacetilo, acetoína, 2-propanona, y algunos ácidos (heptanoico y acético). Finalmente, en el centro del eje de coordenadas, se agruparon las muestras de Mwp-1.

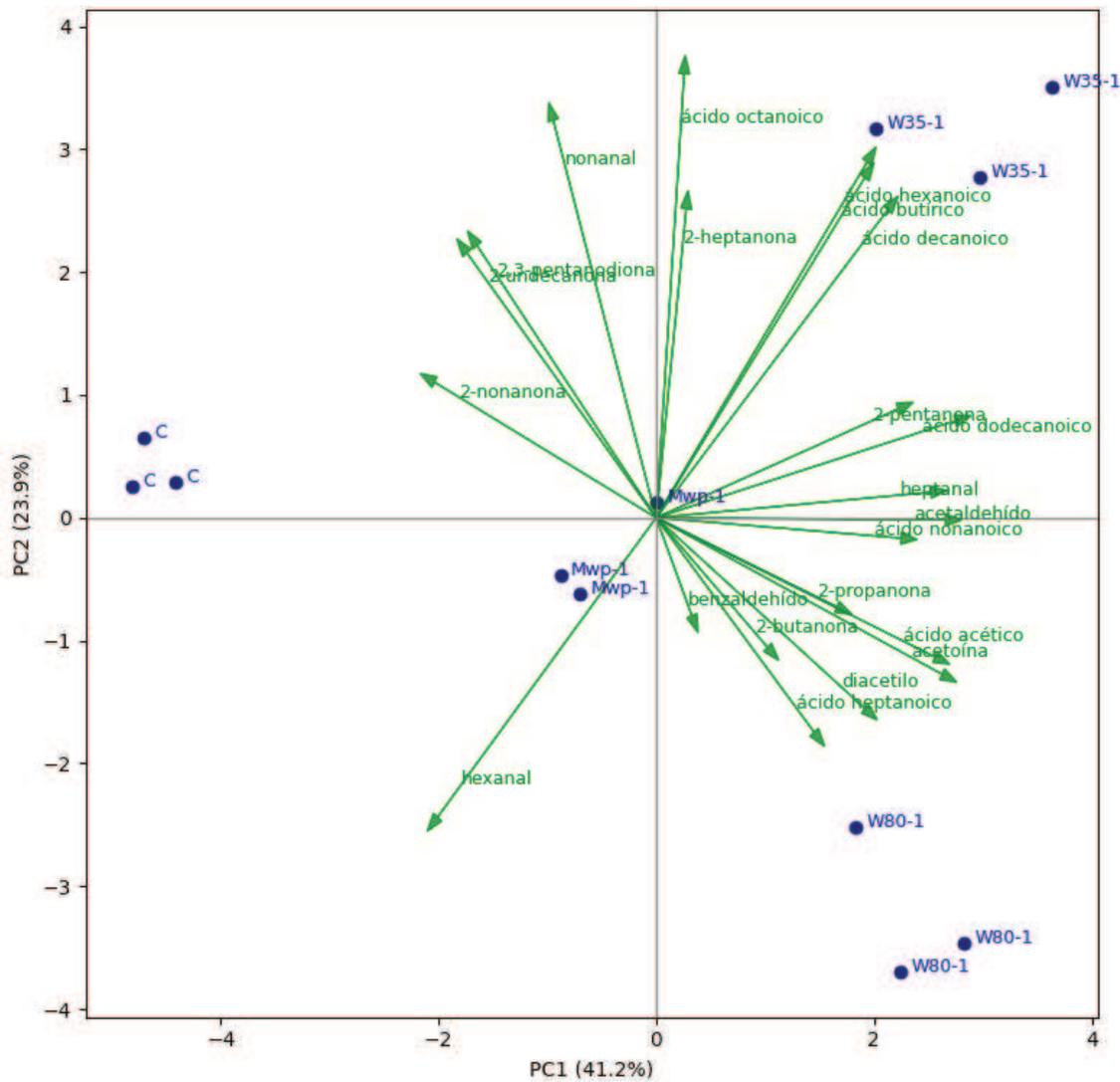


Fig. 2.9. Biplot de los Componentes Principales de compuestos volátiles para los yogures del Grupo 1 (21 d).

Análisis realizado para los resultados de los compuestos individuales (valores de área en unidades arbitrarias) de 3 réplicas de elaboración.

En los yogures del Grupo 2, la fracción aromática de Mwp-2 y W80-2 presentó la siguiente composición: cetonas (55%), ácidos (33%) y aldehídos (12%), mientras que W35-1 contuvo: cetonas (48%), ácidos (39%) y aldehídos (13%) (**Fig. 2.8**). Algunas diferencias fueron detectadas: la fracción de cetonas fue más baja para W35-2 que para el resto de los yogures; la proporción de ácidos siguió el orden: W35-2>C>Mwp-2≅W80-2, en tanto que el porcentaje de aldehídos resultó mayor en Mwp-2, W80-2, W35-2, que en el yogur C.

Se encontraron algunas diferencias entre los yogures del Grupo 2 en el análisis del perfil de compuestos individuales (**Tabla 2.9**).

Tabla 2.9. Compuestos volátiles (valores de áreas en unidades arbitrarias x 1000) de los yogures del Grupo 2 (21 d).

Compuestos	Yogur			
	C	W35-2	W80-2	Mwp-2
<i>Aldehídos</i>				
Acetaldehído	68±5 ^b	120±8 ^a	112±2 ^a	108±11 ^a
Benzaldehído	39±2 ^b	41±3 ^b	54±6 ^a	45±2 ^{ab}
Hexanal	61±9 ^{bc}	160±4 ^a	54±2 ^c	75±5 ^b
Heptanal	18±1 ^c	42±1 ^b	83±7 ^a	89±4 ^a
Nonanal	30±1	34±3	30±3	28±3
<i>Cetonas</i>				
2-propanona	99±8	94±11	120±12	96±8
2-butanona	52±10	46±3	53±5	58±6
2-pentanona	61±5 ^c	83±7 ^b	79±4 ^b	104±7 ^a
2,3-pentanediona	115±12	112±7	117±8	102±10
2-heptanona	196±12 ^b	204±11 ^b	250±4 ^a	207±14 ^b
2-nonanona	60±4 ^{ab}	50±5 ^b	65±4 ^a	54±5 ^{ab}
2-undecanona	19±2	18±2	18±2	22±1
Acetoína	241±13 ^{ab}	241±10 ^{ab}	214±5 ^c	251±16 ^a
Diacetilo	421±21 ^d	581±11 ^b	507±17 ^c	661±45 ^a
<i>Ácidos</i>				
Acético	50±4 ^c	119±9 ^a	87±8 ^b	92±6 ^b
Butanoico	98±10 ^b	173±11 ^a	102±10 ^b	93±7 ^b
Hexanoico	297±12 ^c	422±17 ^a	311±7 ^c	352±9 ^b
Heptanoico	7±1	9±1	7±1	9±1
Octanoico	268±7 ^{ab}	296±19 ^a	226±8 ^c	250±3 ^{bc}
Nonanoico	6±1 ^d	8±0 ^{bcd}	10±0 ^a	9±1 ^{ab}
Decanoico	97±5 ^c	129±5 ^{ab}	114±5 ^{bc}	105±7 ^c
Dodecanoico	11±2 ^c	15±2 ^b	20±1 ^a	16±1 ^{ab}

Los resultados se expresan como el valor medio ±desviación estándar de 3 réplicas de elaboración. Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre yogures ($p < 0,05$).

El acetaldehído presentó menor valor en el yogur C respecto a los restantes yogures; el benzaldehído tuvo un mayor contenido en la formulación W80-2 y menores valores en C y W35-2; el hexanal fue mayor en W35-2 y menor en W80-2 y el contenido de heptanal siguió el orden W80-2 \cong Mwp-2 > W35-2 > C. Respecto a la fracción de las cetonas, los contenidos de 2-pentanona y diacetilo fueron superiores en los yogures Mwp-2, mientras que la 2-heptanona alcanzó el mayor

valor en W80-2. En lo que respecta a los ácidos, se observaron mayores niveles de butanoico, hexanoico y octanoico en W35-2.

Los contenidos de los compuestos volátiles individuales detectados en los yogures del Grupo 2 (tres réplicas de elaboración) se analizó por PCA. En la **Fig. 2.10** se presenta el biplot: variables (compuestos) y muestras. PC1 y PC2 explicaron el 63% de la varianza total y permitieron establecer cuatro agrupamientos de las muestras.

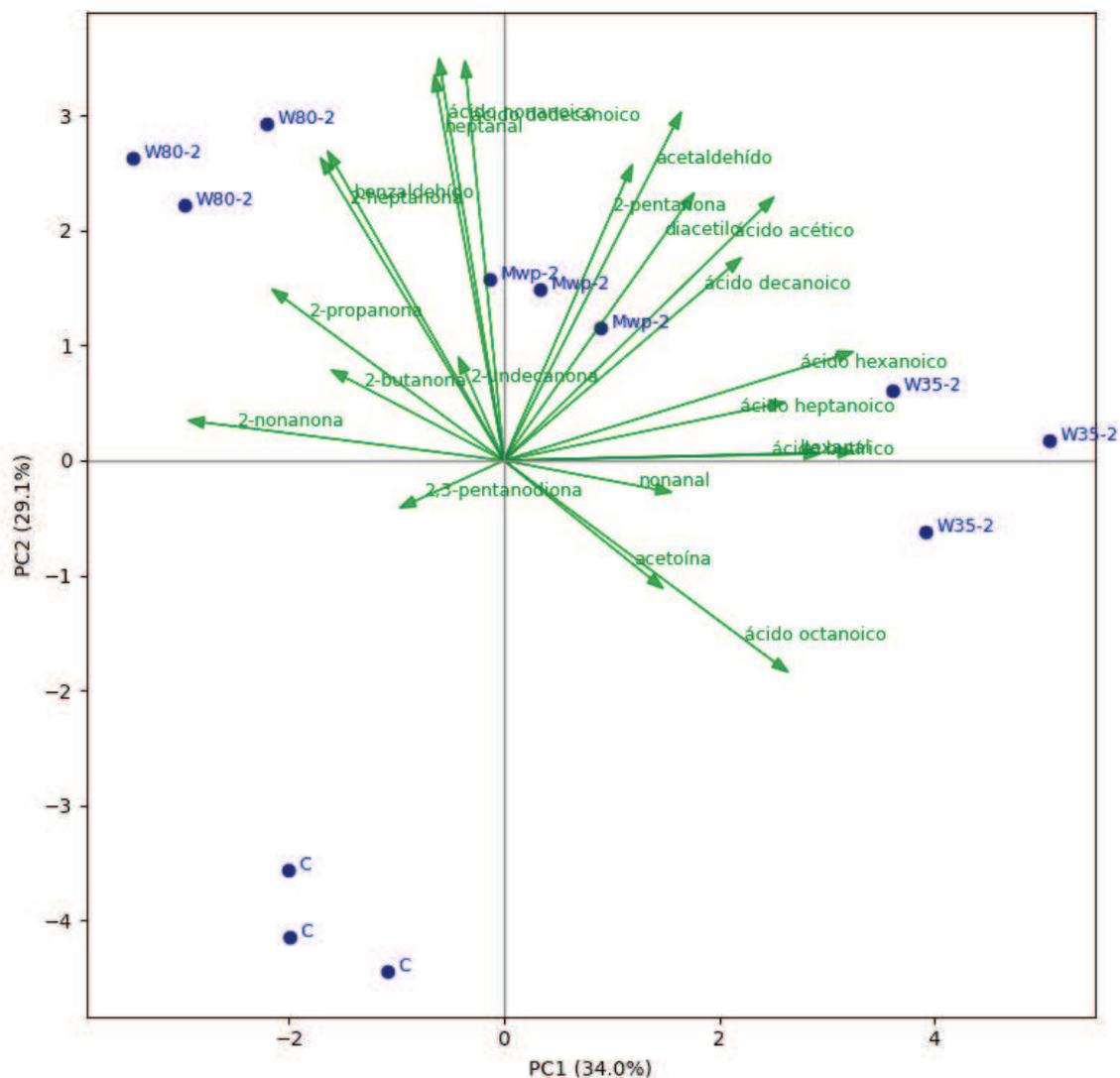


Fig. 2.10. Biplot de los Componentes Principales de compuestos volátiles para los yogures del Grupo 2 (21 d).

Análisis realizado para los resultados de los compuestos individuales (valores de área en unidades arbitrarias) de 3 réplicas de elaboración.

En este caso se observa una notoria separación de las muestras por tipo de ingrediente. De izquierda a derecha de PC1, las muestras del yogur C se localizaron en el extremo más negativo de PC1 y de PC2 (cuadrante izquierdo inferior), siendo algunas cetonas, tales como la 2,3-pentanodiona, los compuestos que contribuyeron al agrupamiento de estas muestras. En el cuadrante izquierdo superior, con valores negativos de PC1 y positivos de PC2, se agruparon las

muestras W80-2, caracterizadas por la prevalencia de metilcetonas (2-nonanona, 2-propanona, etc.) y algunos aldehídos como heptanal y benzaldehído. En el eje positivo de PC1 se ubicaron las muestras W35-2, las cuales parecen agruparse por la incidencia de los compuestos ácidos y algunos aldehídos como el hexanal. Finalmente, cercano al origen de coordenadas, se agruparon las muestras Mwp-2 caracterizados por diacetilo, acetaldehído, 2-pentanona y los ácidos acético y heptanoico.

En comparación con los yogures del **Capítulo 1**, puede observarse que se detectaron los mismos compuestos, aunque en estas nuevas formulaciones estudiadas se identificaron algunos aldehídos de cadena lineal (hexanal, heptanal y nonanal) que se encuentran asociados a procesos de oxidación de la grasa. Si bien todos los yogures hasta ahora analizados presentaron un perfil similar respecto a los grupos mayoritarios de compuestos, en el presente capítulo se observó una mayor proporción de compuestos del grupo de los aldehídos. Por otra parte, fue interesante observar que el uso del ingrediente WPC35 en las formulaciones favoreció la producción de ácidos provenientes de la lipólisis, mientras que con la adición del ingrediente MWP se detectaron mayores niveles de diacetilo, acetoína y en algunos casos de acetaldehído tal como se vio en el **Capítulo 1**.

2.7. Reología en condiciones orales de los yogures

Las gráficas de Viscosidad Aparente (Pa.s) vs. Temperatura (°C), evaluadas en condiciones orales simuladas (velocidad de corte constante de 60 s^{-1} , temperatura de 10 a 25 °C), para los yogures de los Grupos 1 y 2 a los 21 d, se muestran en la **Fig. 2.11**. También se muestra la pendiente de la región lineal calculada para cada una de las curvas.

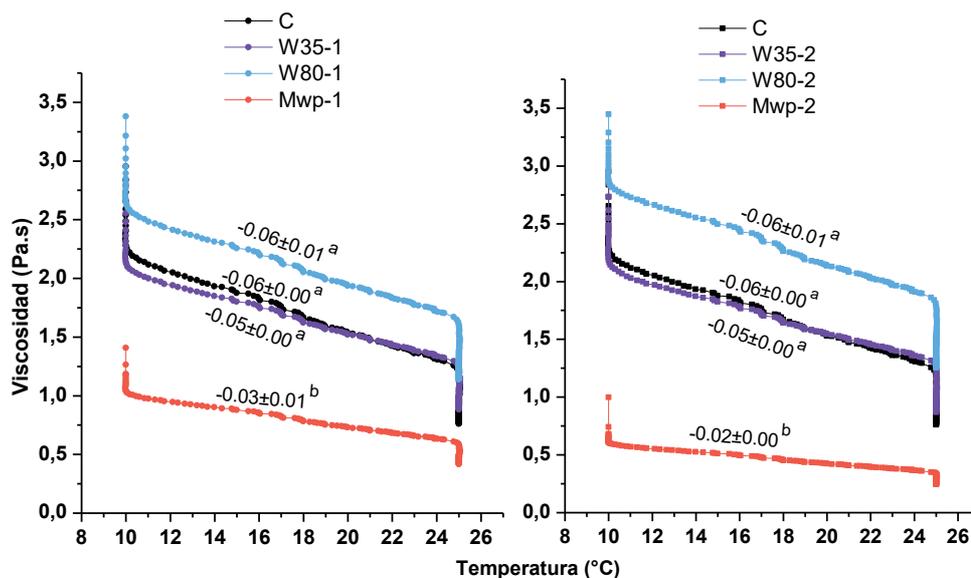


Fig. 2.11. Curvas de Viscosidad Aparente (Pa.s) vs. Temperatura (°C) de los yogures del Grupo 1 (izq.) y del Grupo 2 (der.).

Los resultados se expresan como el valor medio de 3 réplicas de elaboración.

Letras distintas en las pendientes de la región lineal de las curvas indican diferencias significativas entre yogures ($p < 0,05$).

Para el Grupo 1, los valores de viscosidad aparente al inicio de la deformación (a baja temperatura, 10 °C), fueron similares para C, W35-1 y W80-1 ($2,9 \pm 0,1$, $2,8 \pm 0,2$ y $3,4 \pm 0,5$ Pa.s, respectivamente) y mayores que lo obtenido para Mwp-1 ($1,4 \pm 0,3$ Pa.s). Al final de la deformación (25 °C), W80-1 tuvo mayor viscosidad que el resto de los yogures ($1,1 \pm 0,1$ Pa.s), seguido por C ($0,8 \pm 0,0$ Pa.s), y W35-1 ($0,9 \pm 0,0$ Pa.s) con valores similares entre sí, y menor viscosidad se tuvo en Mwp-1 ($0,4 \pm 0,1$ Pa.s). Las pendientes obtenidas en la región lineal de las curvas fueron más pronunciadas en C, W35-1 y W80-1 que en Mwp-1, indicando que la variación de viscosidad entre el inicio y el final de la deformación fue más acentuada en los primeros yogures que en el último.

Por su parte, para el Grupo 2, la viscosidad al inicio de la deformación (10 °C) siguió la tendencia $W80-2 (3,5 \pm 0,3 \text{ Pa.s}) > C (2,9 \pm 0,1 \text{ Pa.s}) \cong W35-1 (2,9 \pm 0,1 \text{ Pa.s}) > Mwp-2 (1,0 \pm 0,1 \text{ Pa.s})$. Este comportamiento se mantuvo al final de la deformación (25 °C), con valores de viscosidad de $1,3 \pm 0,1$, $0,9 \pm 0,0$, $0,8 \pm 0,0$ y $0,2 \pm 0,0$ Pa.s para W80-2, W35-2, C y Mwp-2, respectivamente. En este caso las pendientes de la región lineal de las curvas también fueron más pronunciadas en C, W35-2 y W80-2 que en Mwp-2.

Como fue observado en el **Capítulo 1**, la menor viscosidad aparente de Mwp-1 y Mwp-2 (evaluada a velocidades de corte de 50 s^{-1}) era esperable dadas las características del ingrediente MWP. Su menor tamaño de partícula respecto a los otros ingredientes de proteínas de suero y su escasa interacción con la superficie de las micelas de caseína (por la desnaturalización de las proteínas de suero que ocurre durante su manufactura) provoca que los agregados proteicos tengan

menor tamaño y una menor resistencia a fluir. La menor pendiente hallada en la región lineal de la curva Viscosidad vs. Temperatura durante la fase oral simulada, para estos yogures respecto al resto de las muestras indica que la masticación no afectaría en gran medida la estructura del alimento. Esto podría traducirse en un menor esfuerzo para procesar el mismo, que en consecuencia produciría una menor capacidad saciante respecto a los otros productos (Stribițaia et al., 2020). Esta tendencia se observó en ambos Grupos de yogures, indicando que el comportamiento se atribuye a la naturaleza del ingrediente más que al nivel de agregado y su relación con las caseínas (relación CN:WP). De hecho, las pendientes obtenidas para el resto de los yogures del Grupo 1 (C, W35-1 y W80-1) y del Grupo 2 (C, W35-2 y W80-2) no mostraron diferencias significativas entre sí, aunque se pudo observar que la viscosidad al final del tratamiento fue mayor en W80-1 y en W80-2, mientras que C tuvo una viscosidad final similar a la de W35-1 y W35-2.

El tamaño de los agregados proteicos del yogur tiene un impacto directo en la viscosidad de los productos (Krzeminski et al., 2011). La viscosidad también podría verse afectada por la rigidez de dichos agregados: agregados menos rígidos podrían deformarse con más facilidad y presentar menor resistencia a fluir, disminuyendo la viscosidad (Puvanenthiran et al., 2002). Esta podría ser una hipótesis para comprender el comportamiento similar de W35-1 y W35-2 respecto a C, ya que se esperaría que la incorporación de WPC35 y el tratamiento térmico incrementen el tamaño de los agregados proteicos respecto a los que se forman utilizando solamente MPC, previendo mayores viscosidades en los yogures con WPC35 (Gilbert y Turgeon, 2021), y un comportamiento similar al de los yogures con WPC80. Otra cuestión a considerar es el grado de desnaturalización de los ingredientes. Si el grado de desnaturalización del ingrediente WPC35 es alto, la interacción con las caseínas podría ser baja y esto conduciría a la formación de agregados proteicos más pequeños que lo esperado.

La relación entre viscosidad de los alimentos y su capacidad saciante ha sido reportada por varios autores en estudios in vivo. Marciani et al. (2001) evaluaron la saciedad provocada por cuatro formulaciones alimentarias basadas en goma de algarrobo con alta y baja viscosidad (modulada según el contenido de goma), con distinto contenido calórico, y hallaron que la sensación de plenitud gástrica fue mayor en las formulaciones con mayor viscosidad, independientemente de su contenido calórico. Además, se analizó el volumen de fluido gástrico que los participantes liberaron tras la ingesta por resonancia magnética nuclear, encontrándose mayor volumen de fluido cuando éstos consumieron las formulaciones más viscosas, y en consecuencia el vaciamiento gástrico fue más lento. Zijlstra et al. (2008) realizaron un estudio de saciedad empleando precargas, es decir, administrando una porción medida de un prototipo alimentario para evaluar el consumo de otros alimentos en un episodio alimentario posterior. Para ello, utilizaron formulaciones de base láctea (leche entera, agua, crema, azúcar y cacao) con diferente viscosidad, modulada utilizando carbohidratos como almidón modificado y carragenina.

Se registró una menor ingesta de alimentos luego de consumir las preparaciones con mayor viscosidad. De manera similar, pero considerando el efecto de las proteínas lácteas en la saciedad, Bertenshaw et al. (2013) estudiaron la saciedad provocada por cuatro precargas isocalóricas formuladas con alto y bajo nivel de proteínas lácteas (yogur bebible y aislado de proteínas de suero) y alto y bajo nivel de carbohidratos (maltodextrina y sacarosa), con distintas características texturales (mayor o menor cremosidad y viscosidad). Los autores encontraron que las formulaciones con mayor contenido proteico y con mayor contenido de carbohidratos tuvieron cremosidad y viscosidad similares, pero mayores que aquellas con menor contenido proteico y de carbohidratos. Las fórmulas con mayor viscosidad y cremosidad provocaron mayor saciedad a corto plazo y menor ingesta en el episodio alimentario posterior.

Como puede observarse, los estudios anteriores fueron llevados a cabo in vivo y se priorizó el estudio a nivel gástrico y conductual de los participantes. El efecto de la viscosidad en la saciedad a corto plazo también fue estudiado a nivel oro-sensorial (referido a la percepción sensorial de los alimentos en la boca). En una revisión realizada por Hogenkamp y Schiöth (2013) se destaca el efecto del procesamiento oral en la saciedad a corto plazo. Se concluye que, a mayor viscosidad, el tamaño de bocado es menor y se incrementa la masticación, disminuyendo la ingesta de alimentos dentro de un episodio alimentario. Es por esto que resulta de interés estudiar la viscosidad en condiciones que simulan el procesamiento oral de los alimentos mediante configuraciones instrumentales sencillas (reometría rotacional), lo que podría servir como una aproximación in vitro para estudiar la capacidad saciante de distintas formulaciones de alimentos.

2.8. Comportamiento reológico y perfil de textura de los yogures

Los parámetros derivados del ajuste de las curvas de flujo (obtenidas a temperatura constante de 5 °C) con la Ley de Potencia ($R^2 > 0,9$) y los obtenidos por el análisis de perfil de textura (TPA) de los yogures de los Grupos 1 y 2, medidos a los 21 d, se muestran en las **Tablas 2.10** y **2.11**, respectivamente.

Tabla 2.10. Parámetros obtenidos del ajuste de las curvas de flujo con la Ley de Potencia, y del perfil de textura de los yogures del Grupo 1.

Parámetros	Yogur			
	C	W35-1	W80-1	Mwp-1
<i>k</i> (Pa.s)	15,69±2,20 ^c	22,88±0,63 ^b	32,88±2,41 ^a	6,17±0,31 ^d
<i>n</i> (adim.)	0,25±0,01	0,20±0,00	0,15±0,03	0,34±0,02
Firmeza (N)	0,05±0,02 ^b	0,08±0,01 ^{ab}	0,13±0,03 ^a	0,02±0,01 ^b
Cohesividad	0,71±0,08 ^{ab}	0,58±0,03 ^b	0,57±0,04 ^b	0,88±0,05 ^a
Adhesividad	0,13±0,05 ^{ab}	0,20±0,06 ^{ab}	0,28±0,03 ^a	0,04±0,01 ^b

Los resultados se expresan como el valor medio ± desviación estándar de 3 réplicas de elaboración. Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre yogures ($p < 0,05$).

Tabla 2.11. Parámetros obtenidos del ajuste de las curvas de flujo con la Ley de Potencia, y del perfil de textura de los yogures del Grupo 2.

Parámetros	Yogur			
	C	W35-2	W80-2	Mwp-2
<i>k</i> (Pa.s)	15,69±2,20 ^c	26,57±3,55 ^b	38,22±5,34 ^a	4,10±1,14 ^d
<i>n</i> (adim.)	0,25±0,01	0,16±0,03	0,13±0,02	0,44±0,04
Firmeza (N)	0,05±0,02 ^{bc}	0,11±0,02 ^b	0,22±0,00 ^a	0,01±0,00 ^c
Cohesividad	0,71±0,08 ^a	0,50±0,01 ^b	0,48±0,02 ^b	0,88±0,01 ^a
Adhesividad	0,13±0,05 ^{bc}	0,26±0,04 ^b	0,55±0,03 ^a	0,04±0,01 ^c

Los resultados se expresan como el valor medio ± desviación estándar de 3 réplicas de elaboración. Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre yogures ($p < 0,05$).

Se observaron diferencias en el índice de consistencia (*k*) para todos los productos del Grupo 1, siguiendo el orden W80-1>W35-1>C>Mwp-1. Como se esperaba, el índice de comportamiento de flujo (*n*) fue menor a 1 en todos los casos, revelando el comportamiento pseudoplástico de los yogures.

Mayores valores de firmeza se encontraron en W80-1 respecto a C y Mwp-1, mientras que W35-1 no se diferenció de ningún yogur. La cohesividad fue mayor en Mwp-1 que en W80-1 y W35-1, y en C fue similar a todos los yogures. La adhesividad solo mostró diferencias significativas entre W80-1 y Mwp-1, siendo el primero mayor al segundo (C y W35-1 no se diferenciaron de estos yogures).

Para el Grupo 2, el índice *k* siguió el orden W80-2>W35-2>C>Mwp-2, y el índice *n* también fue menor a 1 en todos los casos. La firmeza siguió el orden W80-2>W35-2>Mwp-2, mientras que C no se diferenció de W35-2 ni de Mwp-2. La cohesividad fue mayor en C y en Mwp-2 que en W35-2 y W80-2, mientras que la adhesividad siguió el orden W80-2>W35-2>Mwp-2, y C no se diferenció de W35-2 ni de Mwp-2, aunque fue menor que en W80-2.

Los mayores valores de índice k y de firmeza encontrados en los yogures W80-1 y W80-2 en relación al resto de los yogures de cada grupo, indicaría que el WPC80 tiene un efecto diferente que los demás ingredientes en la estructuración de la matriz independientemente de la relación CN:WP, tal como se observó en el análisis de viscosidad en condiciones orales (apartado 2.5). Esto también fue reportado por otros autores, donde observaron que yogures (5,2-5,5 g/100 g de proteína) formulados con el agregado de WPC80 mostraron mayor firmeza y adhesividad que un control con SMP, atribuyendo este efecto a la interacción entre las proteínas de suero y la superficie de las caseínas durante el tratamiento térmico aplicado durante la elaboración de yogur (Akalin et al., 2012; Delikanli y Ozcan, 2014). Los yogures con WPC35 (W35-1 y W35-2) mostraron menor índice k que aquellos con W80-1 y W80-2, respectivamente, pero mayor que el resto de los yogures de sus grupos. Aunque no fue motivo de análisis en este trabajo, la diferente composición de los ingredientes, principalmente el contenido de lactosa, y el grado de desnaturalización de las proteínas de suero en los mismos, podrían ser las causas de sus distintos comportamientos en la formación de la estructura del yogur. En relación a esto, Anema et al. (2006) reportaron que la mayor concentración de lactosa en sistemas formulados con SMP provocó un retardo en la desnaturalización de las principales proteínas de suero (α -lactalbúmina y β -lactoglobulina) durante el tratamiento térmico (80 o 95 °C) y que este efecto fue más marcado a temperaturas < 90 °C para la β -lactoglobulina. Esto podría ser una explicación para el comportamiento de los yogures W35-1 y W35-2, que presentaron mayor concentración de lactosa en las leches base y dieron lugar a la formación de geles con menor firmeza y consistencia que los yogures con W80-1 y W80-2, respectivamente. Sin embargo, el efecto de la concentración de lactosa en la estructura de yogur alto en proteínas no está completamente dilucidado (Jørgensen et al., 2019). Además, la firmeza de W35-1 y W35-2 no mostró diferencias con la obtenida para C, lo que refuerza que, por algún motivo tecnológico, la proteína de suero del WPC35 no tendría tanta interacción con la superficie de las micelas de caseína presentes en la leche UHT y en el MPC70.

Como se mencionó previamente, los menores valores de índice k y firmeza obtenidos para Mwp-1 y Mwp-2 eran esperables dadas las características reportadas para el ingrediente MWP, al igual que la mayor cohesividad respecto a los yogures con WPC35 y WPC80 dentro de cada grupo. Como la cohesividad representa el nivel hasta el cual un material puede ser deformado antes de su ruptura, el pequeño tamaño de partícula del MWP y la baja interacción que presenta para formar agregados proteicos podría provocar una mejor adaptación y tolerancia a dicho esfuerzo (Mudgil et al., 2017).

Los valores de cohesividad y adhesividad obtenidos en los yogures de ambos grupos son comparables con los de los yogures estudiados en el **Capítulo 1**. Distinto fue el caso para el índice k y la firmeza de los yogures de este Capítulo, que fueron considerablemente menores que los obtenidos en los yogures del **Capítulo 1**. Se puede hipotetizar que el alto esfuerzo de corte

aplicado en la agitación al finalizar la fermentación en los yogures de este Capítulo provocó la formación de agregados más pequeños que produjo una disminución de la firmeza y viscosidad, características que se asocian a un gel más débil (Mokoonlall et al., 2016). Sin embargo, esta etapa tecnológica no afectó la adhesividad y cohesividad de los mismos, sugiriendo que estos parámetros están relacionados con las características intrínsecas de los ingredientes, como se discutió previamente.

2.9. Microestructura y aspecto visual de los yogures

Las micrografías de CLSM correspondientes a los yogures con 21 d de almacenamiento se muestran en la **Fig. 2.12**.

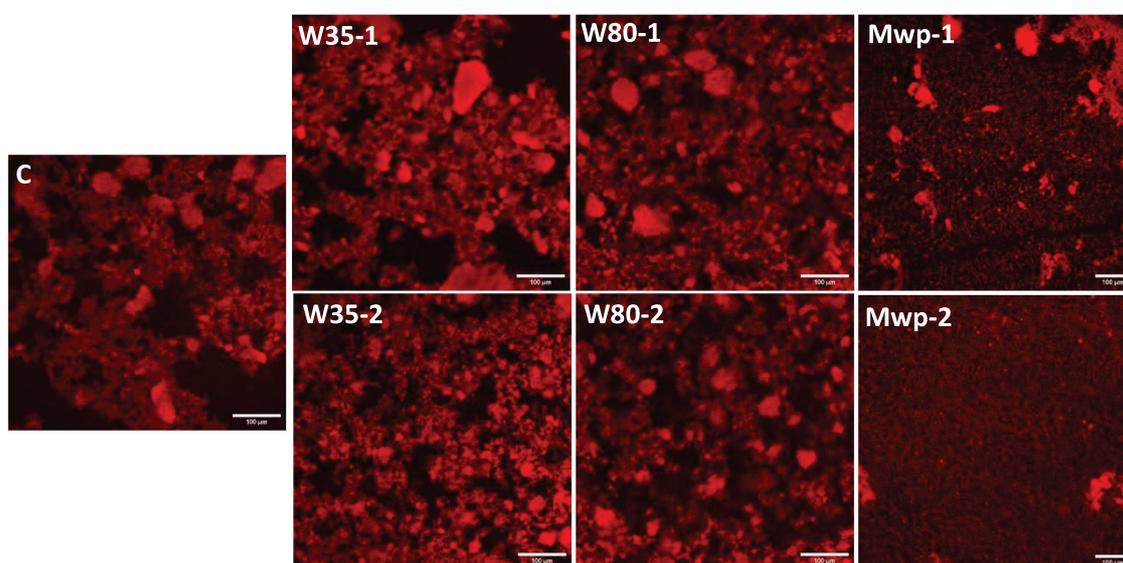


Fig. 2.12. Micrografías obtenidas por CLSM de los yogures (21 d).

En rojo se observan los agregados proteicos y en negro las regiones correspondientes a los poros de la estructura.

La observación visual de las muestras del Grupo 1 revela patrones similares entre W35-1 y W80-1 con C, caracterizados por la presencia de agregados de mayor tamaño dispersos en la red proteica, lo que podría relacionarse con las similitudes halladas en las variables reológicas y texturales de estos yogures, en particular, entre W35-1 y C. El tamaño y distribución de poros de W35-1 es muy similar a lo observado en C, mientras que W80-1 presenta poros más pequeños. La microestructura de Mwp-1 difiere notablemente a la del resto de los yogures del Grupo 1, teniendo solo en común con éstos la presencia de algunos agregados proteicos más grandes y dispersos, sin poder visualizarse un patrón definido o interconexión entre partículas. Esto confirmaría lo que se mencionó anteriormente respecto al comportamiento particular del ingrediente MWP. La microestructura del yogur Mwp-1 también difirió de las observadas para

los yogures con MWP presentados en el **Capítulo 1**, posiblemente por el uso de otros ingredientes en la formulación de las leches base para los yogures de este Capítulo.

Por su parte, los yogures W35-2 y W80-2 presentaron aglomerados proteicos de menores tamaños y más regulares que los observados en C, lo que podría ser consecuencia de la menor fracción de caseína en estos yogures respecto a C y a los del Grupo 1. De manera similar a lo observado en Mwp-1, el yogur Mwp-2 no tiene una microestructura comparable a los demás yogures de su Grupo.

Un resultado que no guarda relación con la microestructura fue la CRA de los yogures. Si bien la microestructura de C, W35-1 y W80-1, y de C, W35-2 y W80-2 son similares en cuanto a la organización de la red proteica y la distribución de poros, la CRA fue mayor en todos los yogures con WPC35 y WPC80 que en C. Más aún, los valores de CRA de los yogures C y Mwp-1 y de C y Mwp-2 no mostraron diferencias significativas, aunque sus microestructuras son completamente diferentes. Resulta evidente que el yogur C, el cual presentó la mayor proporción de fracción caseínica (4:1), formó un gel más débil justamente por la menor proporción de proteína de suero disponible para la formación de agregados caseína-proteína de suero y de proteínas de suero entre sí. Esta idea también se corrobora por los menores valores de índice k en el yogur C respecto a aquellos con WPC35 y WPC80.

En un trabajo publicado por Modler y Kalab (1983) se compara la microestructura de yogures firmes (5 g/100 g de proteína y 1,5 g/100 g de grasa) obtenidos con diferentes ingredientes empleados individualmente: SMP, MPC, caseinato de sodio y tres tipos de WPC. A través de micrografías de microscopías electrónica de barrido y electrónica de transmisión se pueden observar marcadas diferencias, principalmente entre los geles con agregado de SMP, MPC y caseinato, respecto a los que contenían WPC. Los autores destacan que en los geles con mayor proporción de caseínas se encontraron cadenas de caseínas unidas mediante enlaces finos y cortos, mientras que en los geles con agregado de proteínas de suero las partículas de caseína se encontraban rodeadas por estructuras filamentosas (proteínas de suero desnaturalizadas enlazadas a la superficie de las caseínas) y poca o nula interconexión entre las caseínas.

Se puede sugerir que la similitud entre las microestructuras de C, W35-1 y W80-1 y de C, W35-2 y W80-2 podría deberse al tratamiento de agitación de alto cizallamiento que se aplicó en todos los productos al finalizar la fermentación, pero que la desnaturalización de las proteínas de suero (tanto la inherente a la manufactura de los ingredientes, como la que se produce durante el tratamiento térmico en la elaboración de yogur) y la reorganización de la estructura durante el almacenamiento produjo geles más fuertes en los yogures con agregado de WPC35 y WPC80. Según nuestro conocimiento, no hay datos reportados que estudian el efecto de los ingredientes, nivel de agregado, combinación de los mismos y post procesamiento (etapa de agitación) en la microestructura de yogures altos en proteínas.

Por último, en la **Fig. 2.13** se muestra el aspecto macroscópico de los yogures. Se puede observar que los yogures con WPC80, en particular W80-1, presentan una superficie más rugosa y mayor opacidad que el resto, lo que puede atribuirse a cierta grumosidad. A pesar de sus diferentes microestructuras, C, Mwp-1 y Mwp-2 tienen un aspecto similar, brillante y homogéneo, y se visualizan como menos viscosos que el resto. W35-1 y W35-2 mostraron aspecto brillante y algunas irregularidades en sus superficies.

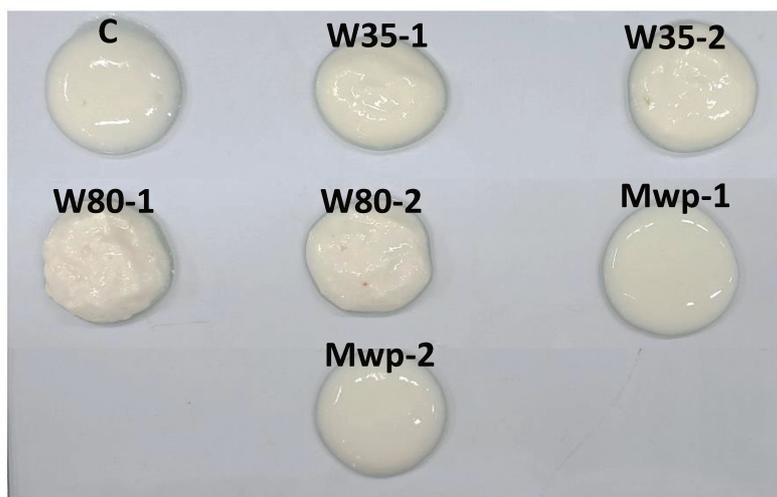


Fig. 2.13. Observación visual de los yogures (21 d).

3. Conclusiones

El uso de MPC70, solo o en combinación con WPC35, WPC80 y MWP, permitió obtener yogures con alto contenido proteico (7,4-7,7 g/100 g de proteína), parcialmente descremados (<1,5 g/100 de grasa), con características fisicoquímicas y microbiológicas que responden a la normativa vigente para este tipo de productos. El MPC70 y el WPC80 aportaron bajos niveles de lactosa a las respectivas leches base, lo que condujo a obtener yogures con contenidos de lactosa entre 2,6-2,8 g/100 g para C, W80-1 y W80-2. Los yogures W35-1, Mwp-1, W35-2 y Mwp-2 presentaron menor contenido de lactosa final (3,4-3,9 g/100 g) que los yogures obtenidos en el **Capítulo 1** de este trabajo, recalando la ventaja de emplear MPC70 como fuente de proteínas de leche en lugar de SMP. Los ácidos orgánicos no mostraron diferencias sustanciales entre los distintos productos, y el ácido láctico alcanzó niveles de 1200-1400 mg/100 g. Estos niveles fueron menores a los encontrados en los yogures del **Capítulo 1**, lo que se vincula a las menores concentraciones de lactosa, como se mencionó.

El perfil aromático de los yogures reveló la presencia de los compuestos característicos del aroma (acetaldehído, diacetilo, acetoína, etc.), los cuales, salvo el caso particular de algunos aldehídos, fueron similares a los identificados en el **Capítulo 1**. El análisis de componentes principales permitió hallar diferencias entre las distintas formulaciones, sugiriendo que la

composición química de los ingredientes puede afectar la actividad metabólica del fermento, y de este modo, la producción de estos compuestos.

El análisis estructural de los productos también puso de manifiesto la importancia de las características de los ingredientes y la tecnología empleada para elaborar los yogures, y el efecto de los mismos sobre la viscosidad evaluada en condiciones orales simuladas. En la búsqueda de aumentar la capacidad saciante de yogures altos en proteína, basándonos en su viscosidad, sería conveniente optar por ingredientes que demuestren la capacidad de formar geles fuertes (tal como el WPC80), como también conservar la estructura evitando en la medida de lo posible las altas deformaciones en el gel (por ejemplo, obteniendo yogures tipo firme). La desventaja principal del uso de ingredientes como MPC70 o WPC80 es su alto costo comercial (US\$ 10-12/kg) y la dificultad para adquirirlos en nuestra región, ya que por ejemplo el MPC no se produce en nuestro país.

En el próximo Capítulo se estudiará el uso de leche concentrada por ultrafiltración y aislado de proteína de suero en la formulación de yogures altos en proteína, contemplando la diferencia de niveles proteicos, y distinto post procesamiento, en la estructura de los yogures.

Capítulo 3

Uso de retentado de ultrafiltración y aislado de proteínas de suero de leche para la formulación de yogures incrementados en proteína

Resumen

El objetivo de este capítulo fue estudiar la formación del gel, los aspectos fisicoquímicos y estructurales de yogures con distintos niveles proteicos y fermentos comerciales. Para ello, se elaboraron yogures parcialmente descremados (<1,5 g/100 g de grasa), a escala laboratorio, con alto nivel proteico (E, ~7,5 g/100 g) y con contenido tradicional (o regular) de proteína (T, ~3,5 g/100 g) empleando retentado de leche ultrafiltrada (UF) o leche pasteurizada descremada, respectivamente, y aislado de proteína de suero de leche, conocido como aislado de proteína de suero nativa (mWPI). Se utilizaron tres fermentos comerciales, dos de ellos compuestos por las cepas clásicas de yogur (Y8 e Y9) y el tercero conteniendo además cepas con potencial probiótico (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactocaseibacillus paracasei*, -SG-). Además, se aplicaron distintos procesamientos luego de la fermentación (sin agitación o con agitación) para aproximar las tecnologías de elaboración para yogur firme y batido. El seguimiento de la fermentación mediante medidas reológicas, la viscosidad aparente a bajas y altas velocidades de deformación, la permeabilidad luego de la fermentación, los parámetros estructurales, CRA, ácidos orgánicos y pH de los yogures con 1 d de almacenamiento se analizaron según los dos factores estudiados: contenido proteico (F1) y fermento (F2). Los parámetros composicionales (fracciones proteicas, grasa, sólidos totales, ácidos orgánicos) se evaluaron en las LB y se analizaron según el contenido proteico. En particular, el estudio de las fracciones proteicas (proteína cruda, verdadera y caseína) realizado antes y después del tratamiento térmico (80 °C/10 min) de las LB permitió calcular el grado de desnaturalización de las proteínas de suero. También se evaluó el comportamiento reológico de los yogures en condiciones orales simuladas.

Se encontraron diferencias en las curvas de G' vs. pH por el efecto de ambos factores estudiados, al igual que para la viscosidad aparente al inicio y al final de la agitación. Se halló una correlación entre la permeabilidad y la CRA, que también pudieron relacionarse con la microestructura. Los ácidos cítrico y láctico solo mostraron diferencias por el contenido proteico, y la lactosa no se vio afectada por ningún factor. La desnaturalización proteica luego del tratamiento térmico fue similar a lo reportado para yogur. También se hallaron diferencias, dadas por el efecto de ambos factores, en la viscosidad evaluada en condiciones orales simuladas, pudiendo relacionarse con la potencial capacidad saciante de los yogures.

1. Materiales y métodos

Como esta actividad fue llevada a cabo en el marco de una estancia en el exterior (Center for Dairy Research - University of Wisconsin-Madison, Estados Unidos) los materiales, equipamiento, procedimientos, y técnicas analíticas presentarán algunas diferencias respecto al resto de las actividades detalladas a lo largo de esta Tesis.

1.1. Materiales

Se empleó leche pasteurizada estandarizada (1 g /100 mL de grasa, 3 g/100 mL de proteína) para elaborar los yogures tradicionales (T). El retentado de leche utilizado para elaborar los yogures experimentales (E), se obtuvo por ultrafiltración de leche pasteurizada estandarizada (0,4 g/100 mL de grasa, 3 g/100 mL de proteína) con una membrana Synder ST-3BD-3838 (Synder Filtration, Estados Unidos) a una presión de sistema de 40 psi. La leche se concentró a un factor de ~2,3x obteniéndose un retentado con 7,0 g/100 g de proteína y 0,9 g/100 g de grasa.

Además, se utilizó un aislado de proteína de suero de leche comercial (mWPI, Pronativ®, Lactalis Ingredients, Estados Unidos). Según especificaciones del fabricante, el ingrediente contenía, como mínimo, 90 g de proteína/100 g de polvo (base húmeda).

Se emplearon tres fermentos comerciales DVS congelados para yogur: YF-L811 (Y8), YF-L902 (Y9) y SoGreek S3 (SG) (Chr. Hansen, Estados Unidos). De acuerdo a las especificaciones, los fermentos Y8 e Y9 estaban compuestos por cepas de *S. thermophilus* y *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus*, y el fermento SG contenía la cepa *S. thermophilus* ACA-DC 0029 aislada de yogur griego artesanal, *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* y cepas potencialmente probióticas: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lacticaseibacillus paracasei*.

1.2. Diseño experimental

Se diseñaron dos formulaciones de yogures: una con alto contenido proteico -E- (7,5 g/100 g de proteína) y la otra con contenido tradicional de proteína -T- (3,5 g/100 g de proteína), ambos parcialmente descremados (1 g/100 g de grasa), con una relación CN:WP similar entre ellos (~3:1). Cada formulación se inoculó, individualmente, con los 3 fermentos mencionados en el apartado 1.1, dando lugar a 6 yogures distintos, como se muestra en la **Tabla 3.1**. Los factores estudiados fueron el nivel proteico (*F1*: T y E) y los fermentos empleados (*F2*: Y8, Y9, SG). Las elaboraciones se realizaron por triplicado en diferentes días. El protocolo de elaboración y los análisis realizados se indican a continuación.

Tabla 3.1. Diseño experimental de los yogures.

Parámetros	Yogur					
	T_Y8	T_Y9	T_SG	E_Y8	E_Y9	E_SG
Contenido de proteína (g/100 g)	3,5	3,5	3,5	7,5	7,5	7,5
Relación CN:WP	3:1	3:1	3:1	3:1	3:1	3:1
Contenido de grasa (g/100 g)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Fermento	Y8	Y9	SG	Y8	Y9	SG

1.3. Preparación del fermento

Los fermentos comerciales se prepararon según el protocolo propuesto por Wilbanks et al. (2022). A partir del fermento descongelado (~20 °C) y homogeneizado manualmente, se tomó un peso representativo teniendo en cuenta la concentración de microorganismos informada por el fabricante. Se realizaron las diluciones correspondientes para alcanzar una concentración de 0,25 U en 200 mL de leche estéril, que se incubó a 42 °C hasta pH 5,5-5,0 (fase log de crecimiento microbiano). Luego, la leche fermentada se fraccionó en crioviales de 5 mL y se congeló en ultrafreezer a -80° C, donde fueron conservados hasta el momento de la utilización. Todo el proceso se llevó a cabo en condiciones de esterilidad.

Cada día de elaboración se tomó un criovial, se descongeló a temperatura ambiente y se inoculó en leche estéril a 42 °C, se fermentó hasta pH 5,5-5,0 (leche fermento) y luego se inoculó en las leches base.

1.4. Elaboración de los yogures, seguimiento de la formación del gel y post procesamiento

Se prepararon ~2 L de leche base (LB) de cada formulación (T y E), según se muestra en la **Tabla 3.2.**

Tabla 3.2. Composición de las formulaciones de yogur (g/100 g).

Ingredientes	Yogur					
	T_Y8	T_Y9	T_SG	E_Y8	E_Y9	E_SG
mWPI	0,26	0,26	0,26	0,60	0,60	0,60
Retentado de UF	---	---	---	99,40	99,40	99,40
Leche pasteurizada	99,74	99,74	99,74	---	---	---

Las mezclas se agitaron con agitador magnético por ~2 h, hasta disolución del polvo, y luego se dejaron en refrigeración (5 °C/20 h) para asegurar la correcta hidratación e integración del ingrediente en polvo. Al finalizar esta etapa, se tomaron muestras para el análisis de fracciones proteicas pre tratamiento térmico para evaluar el grado de desnaturalización de las proteínas de suero (apartado 1.5).

Se realizó un tratamiento térmico de 80 °C/10 min en baño termostatzado (Isotemp 4100, Fisher, Estados Unidos) bajo agitación magnética. Las LB fueron enfriadas rápidamente en baño de agua y hielo hasta 42 °C. Se tomaron muestras para los análisis de fracciones proteicas post tratamiento térmico, composición global y ácidos orgánicos (apartado 1.5). Luego, el resto se fraccionó en 3 porciones de ~600 mL, y se inocularon individualmente con los fermentos estudiados (4 mL de leche fermento en 100 mL de leche base), según corresponda (Tabla 3.1). Luego, la LB inoculada fue fraccionada en distintos contenedores para llevar a cabo la fermentación y análisis, según corresponda. El esquema de fraccionamiento se muestra en la Fig. 3.1.

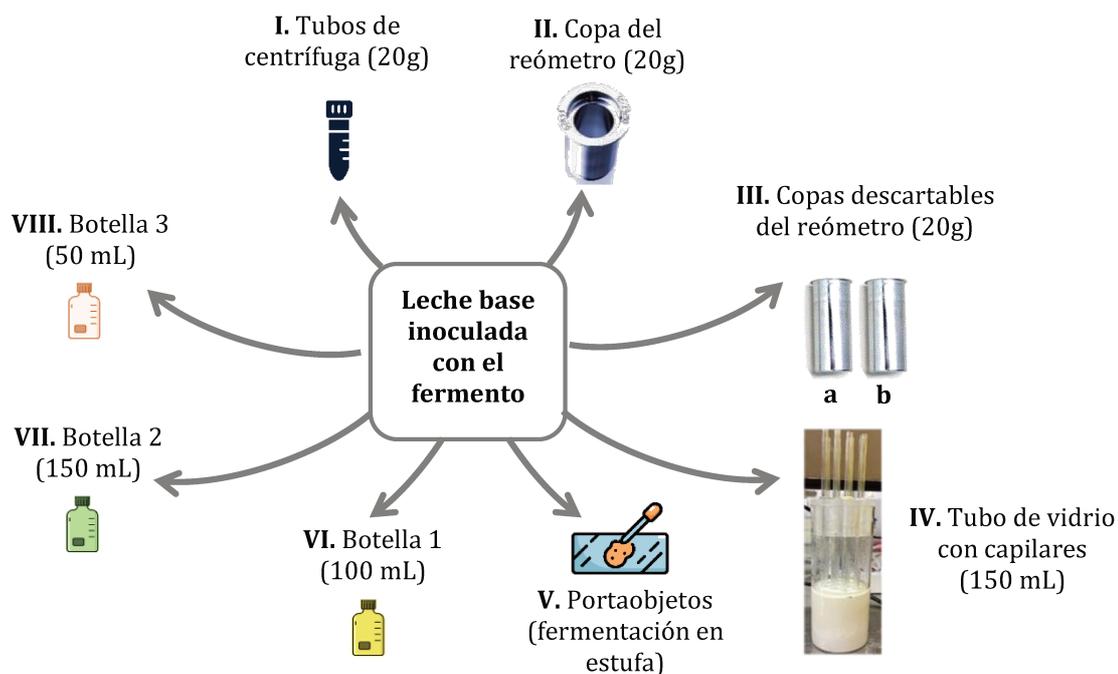


Fig. 3.1. Esquema de fraccionamiento de la LB inoculada para su posterior fermentación y análisis.

Seis contenedores (I, III, IV, VI, VII y VIII) se colocaron en un baño termostatzado a 42 °C hasta alcanzar pH=4,7-4,6. La muestra V, depositada sobre un portaobjetos, se incubó a 42 °C en estufa hasta finalizar la fermentación para la medición de microestructura. El contenedor II se colocó en el reómetro para seguir la formación del gel por reometría oscilatoria de baja deformación (SAOR) (según TA 16.2).

Alcanzado el valor de pH target, la fermentación se detuvo por enfriamiento (excepto para el ensayo de permeabilidad, contenedor **IV**), sin y con aplicación de agitación (para simular yogures tipo firme y batido, respectivamente). En particular el contenedor **II** (fermentación ocurrida en el reómetro) fue sometido a una curva de agitación simulando el procesamiento de un yogur tipo batido. Para ello, se aplicó una rampa logarítmica de esfuerzo de corte desde 0,01 hasta 100 s⁻¹ (6,25 min de duración/22 °C). De la curva de Viscosidad Aparente (mPa.s) vs. Velocidad de Corte (s⁻¹) se extrajeron los valores de viscosidad aparente a baja velocidad de deformación al inicio (η_{sa}) y al final de la deformación (η_{ca}), de manera que los mismos representen la viscosidad de un yogur sin agitación y de uno con agitación, respectivamente.

Para el resto de los contenedores, la descripción del procedimiento realizado se describe a continuación:

Yogures sin agitación (T_Y8_{sa}, T_Y9_{sa}, T_SG_{sa}, E_Y8_{sa}, E_Y9_{sa}, E_SG_{sa}): los contenedores **I**, **IIIa**, **V**, **VII** y **VIII** fueron enfriados en baño de hielo y agua y almacenados a 5 °C por 1 día. Al cabo de este tiempo se analizó el pH, la CRA, el contenido de lactosa y ácidos orgánicos, viscosidad en condiciones orales y CLSM (apartado **1.5**). El contenedor **IV** se destinó al ensayo de permeabilidad que se realizó a 42 °C (apartado **1.5**).

Yogures con agitación (T_Y8_{ca}, T_Y9_{ca}, T_SG_{ca}, E_Y8_{ca}, E_Y9_{ca}, E_SG_{ca}): el contenedor **IIIb** se destinó a la medición de viscosidad en condiciones orales (apartado **1.5**), aplicando previamente la misma curva de agitación que la empleada en el contenedor **II**. El contenedor **VI**, se agitó manualmente y se empleó para la medición de pH y la visualización de la microestructura mediante CLSM (apartado **1.5**).

En la **Tabla 3.3** se presenta un resumen del procedimiento llevado a cabo durante la elaboración y análisis de los yogures, en relación al fraccionamiento mostrado en la **Fig. 3.1**.

Tabla 3.3. Resumen del procedimiento llevado a cabo durante la elaboración y análisis de los yogures, en relación al fraccionamiento mostrado en la **Fig. 3.1**.

Contenedor		ca	sa	Análisis
	I	---	✓	CRA (1d)
	II	✓	---	SAOR (durante la fermentación) y curva de agitación (al final de la fermentación)
	IIIa IIIb	✓	✓	Viscosidad en condiciones orales (1d)
	IV	---	✓	Permeabilidad (al final de la fermentación)
	V	---	✓	CLSM (1d)
	VI	✓	---	pH y CLSM (1d)
	VII	---	✓	Control de pH (durante la fermentación)
	VIII	---	✓	Ácidos orgánicos (1d)

ca: con agitación; **sa:** sin agitación; **CRA:** capacidad de retención de agua; **SAOR:** reometría oscilatoria de baja deformación; **CLSM:** microscopía confocal laser de barrido.

El esquema temporal de análisis se muestra en la **Fig 3.2** y las metodologías se describen en el apartado **1.5**.

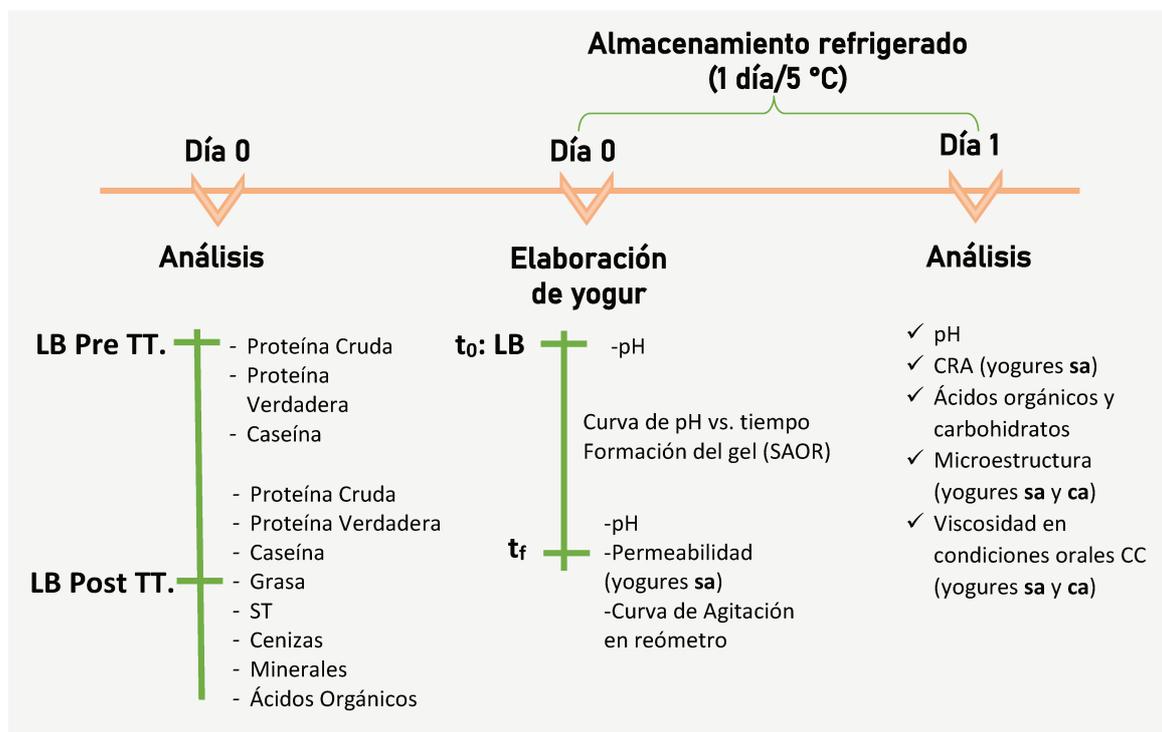


Fig. 3.2. Esquema de muestreo y controles analíticos realizados durante la elaboración y almacenamiento de los yogures.

TT: tratamiento térmico; SAOR: reometría oscilatoria de baja deformación; CRA: capacidad de retención de agua; CC: cilindros concéntricos; **sa**: sin agitación; **ca**: con agitación.

1.5. Metodologías analíticas

- ✓ **pH:** se determinó con un pHmetro digital con un electrodo de pH combinado (Accumet XL600, Estados Unidos).
- ✓ **Grasa y Sólidos Totales:** se analizaron con métodos estandarizados (AOAC International, 2012a, 2012b), respectivamente.
- ✓ **Fracciones proteicas:** la proteína cruda (nitrógeno total x 6,38), la proteína verdadera [(nitrógeno total - nitrógeno no proteico) x 6,38] y la caseína (nitrógeno caseínico x 6,38), se analizaron en las LB antes y después del tratamiento térmico con el objetivo de estimar el porcentaje de desnaturalización proteica (Sodini et al., 2005). Las determinaciones se realizaron mediante técnicas estandarizadas basadas en la metodología Kjeldahl (AOAC International, 2012c).

- ✓ **Minerales:** se determinaron por espectroscopía de emisión óptica mediante plasma acoplado inductivamente (ICPOES, ICP-OES 5100 system, Agilent, Estados Unidos).
- ✓ **Lactosa:** en las LB, se calculó por diferencia a partir de los datos composicionales mencionados. En los yogures (1 d), fue determinada por HPLC según la técnica **TA 9**.
- ✓ **Ácidos orgánicos:** los ácidos láctico, cítrico, propiónico y butírico se identificaron y cuantificaron mediante HPLC, según la técnica propuesta por Zeppa et al. (2001).
- ✓ **Permeabilidad:** Este análisis se realizó en el yogur recién obtenido (pH=4,7-4,6/42 °C) (contenedor **IV** de la **Fig. 3.1**), según lo descrito por van Dijk y Walstra (1986) y Roefs et al. (1990). La técnica consiste en evaluar cuánto suero permea a través del yogur (en medidas de altura sobre el mismo) utilizando una cuba diseñada para tal fin conteniendo suero de leche a pH=4,6 (obtenido por acidificación con glucono-delta-lactona, y posterior ruptura y filtración del gel formado con un filtro de tela). La LB inoculada (~150 mL) se colocó en un tubo de vidrio (diámetro=6 cm, altura=20 cm), en el cual se insertaron verticalmente 10 capilares de vidrio abiertos en ambos extremos (diámetro~0,5 cm). Dada la geometría del sistema, la leche inoculada ascendió por los capilares hasta igualar el nivel de la leche en el exterior. Se produjo la fermentación como se detalló en el apartado **1.4**, y una vez alcanzado el pH target los capilares se extrajeron del tubo y se colocaron verticalmente en la cuba con suero (tiempo 0), introducida en un baño termostatzado a 42 °C. Se tomó la altura del suero en la cuba (h_{∞} , [m]) y se registró la altura del suero sobre la superficie del yogur en cada capilar a intervalos regulares de 10 min (h_{t_x} , [m], x=tiempo de registro [min]). El análisis se extendió durante 40 min totales (es decir, se tomaron 5 mediciones de altura de suero, a tiempos 0, 10, 20, 30 y 40 min). El coeficiente de permeabilidad (B) fue calculado de acuerdo a la ecuación propuesta por (Lucey et al., 1998):

$$B = - \left[\ln \frac{(h_{\infty} - h_{t_2})}{(h_{\infty} - h_{t_1})} \right] \eta H / [\rho g (t_2 - t_1)]$$

donde B es el coeficiente de permeabilidad (m^2), h_{∞} es la altura del suero en la cuba de suero (m), h_{t_1} es la altura del suero en el capilar de yogur (m) a t_1 , h_{t_2} es la altura del suero en el capilar de yogur (m) a t_2 , η es la viscosidad del suero a 42 °C (Pa·s), H es la altura del yogur en el capilar (m), ρ es la densidad del suero a 42 °C (kg/m^3), y g es la aceleración de la gravedad (m/s^2). Se obtuvieron como mínimo 4 mediciones para cada yogur (es decir, se promediaron los resultados de 4 capilares por yogur). Los yogures que presentaron grietas dentro del capilar no fueron considerados para este análisis.

- ✓ **Capacidad de retención de agua (CRA):** se determinó por centrifugación de los yogures sin agitación (T_Y8_{sa}, T_Y9_{sa}, T_SG_{sa}, E_Y8_{sa}, E_Y9_{sa}, E_SG_{sa}) según la técnica **TA 15** en una centrífuga refrigerada Avanti J-E (Beckman Coulter, Estados Unidos).

- ✓ **Análisis reológico en condiciones orales simuladas:** se realizó por reometría rotacional CC según se describió en la técnica **TA 18.1**. Se utilizaron los yogures fermentados y almacenados dentro de las copas descartables de reometría, sin y con agitación (contenedores **IIIa** y **IIIb** de la **Fig. 3.1**, respectivamente). Se extrajeron 3 valores de las curvas Viscosidad Aparente (mPa.s) vs. Temperatura (°C): la viscosidad inicial a 15 °C (η_1), luego de la fase oral simulada a 25 °C (η_2) y luego de 1 min que simula el proceso de deglución/pasaje por el esófago, a 25 °C (η_3). La pendiente de la región lineal de las curvas fue calculada mediante regresión lineal.

- ✓ **Microestructura:** se visualizó en los yogures con 1 d de almacenamiento, mediante CLSM (A1R Ti2, Nikon, Estados Unidos). Para los yogures sin agitación, una gota de LB inoculada, teñida con el fluoróforo Fast Green FCF (2% m/v en etanol, 30 μ L en 5 g de LB), se depositó sobre un portaobjetos de vidrio, que se cubrió con un cubreobjetos, y se incubó en estufa a 42 °C (contenedor **V** de la **Fig. 3.1**). Para los yogures con agitación, una vez finalizada la fermentación en botella (contenedor **VI** de la **Fig. 3.1**), se pesaron 5 g de yogur, se batieron manualmente, se agregó el fluoróforo en condiciones similares a las descriptas. Se depositó una gota en un portaobjetos, que se cubrió con un cubreobjetos. La observación se realizó con una lente de 60x con aceite de inmersión, a 633 nm (Lee y Lucey, 2003). Numerosos campos fueron observados y se obtuvieron micrografías típicas.

1.6. Análisis estadístico

Se empleó ANOVA de dos vías y test de Tukey (nivel de significancia $p < 0,05$) para analizar el efecto de los factores estudiados ($F1$ y $F2$) y su interacción en los parámetros medidos en yogur. Para los datos derivados del análisis de leche base (LB_T y LB_E) se empleó test t de Student (nivel de significancia $p < 0,05$). Los softwares utilizados fueron Rstudio (R core team, 2014) y Statgraphics Centurion XIV (Royal Technology S.A., Estados Unidos).

2. Resultados y discusión

2.1. Análisis de la evolución de la fermentación a través de medidas de pH y formación del gel

Como se indicó anteriormente, el estudio de la evolución del gel se realizó por reometría oscilatoria de baja deformación (SAOR). Las curvas de G' vs. pH y los parámetros obtenidos durante la fermentación, se muestran en la **Fig. 3.3** y en la **Tabla 3.4**, respectivamente.

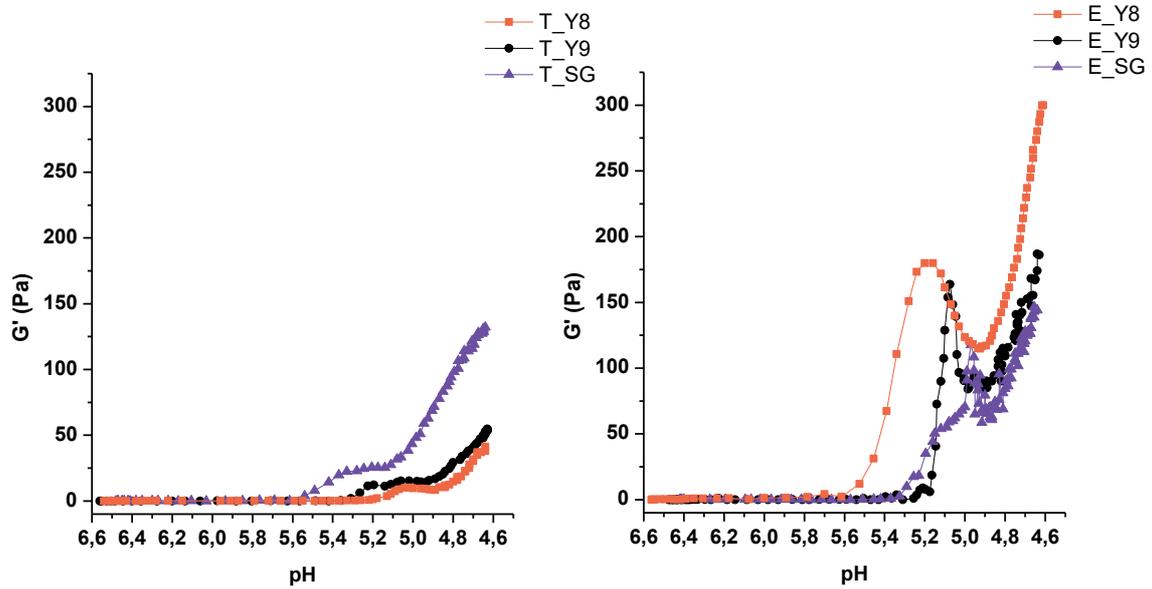


Fig. 3.3. Curvas de G' vs. pH durante la fermentación de las formulaciones T (izq.) y E (der.), con los fermentos comerciales Y8, Y9 y SG.

Los resultados se expresan como el valor medio de 3 réplicas de elaboración.

Tabla 3.4. Parámetros medidos durante la fermentación de las formulaciones T y E, con diferentes fermentos comerciales (Y8, Y9 y SG).

Parámetro	Yogur						Factores		
	T_Y8	T_Y9	T_SG	E_Y8	E_Y9	E_SG	F1	F2	F1xF2
pH _{gel}	5,15±0,10	5,28±0,29	5,59±0,01	5,47±0,16	5,42±0,01	5,18±0,04	NS	NS	NS
t _{ferm} (min)	350±7 ^C	310±7 ^D	325±14 ^{CD}	485±7 ^B	540±14 ^A	517±4 ^{AB}	*	NS	*
G' _{pH=4,6} (Pa)	41,3±10,5 ^B	54,7±19,9 ^B	132,1±40,3 ^B	301,3±74,1 ^A	188,1±18,3 ^{AB}	145,2±44,9 ^{AB}	*	NS	*
LT _{pH=4,6}	0,29±0,01	0,26±0,01	0,24±0,01	0,27±0,01	0,20±0,05	0,24±0,01	NS	NS	NS
η _{sa} (mPas)	7,7·10 ⁵ ±6,6·10 ^{4C}	5,1·10 ⁵ ±7,6·10 ^{4C}	1,0·10 ⁶ ±3,8·10 ^{4C}	8,8·10 ⁶ ±1,2·10 ^{6A}	5,1·10 ⁶ ±8,4·10 ^{5B}	8,6·10 ⁶ ±9,4·10 ^{5A}	*	*	*
η _{ca} (mPas)	132,7±2,0 ^C	223,4±5,0 ^C	207,4±8,5 ^C	1108,8±62,6 ^B	1466,3±49,7 ^A	1072,0±10,5 ^B	*	*	*

Los resultados se expresan como el valor medio ± desviación estándar de 3 réplicas de elaboración.

pH_{gel}: pH al inicio de la formación del gel; t_{ferm}: tiempo total de fermentación hasta alcanzar el pH target; G' _{pH=4,6}: módulo de almacenamiento en el pH target; LT_{pH=4,6}: tangente de pérdida (G''/G') en el pH target; η_{sa}: viscosidad al inicio de la agitación (a 22° C); η_{ca}: viscosidad al final de agitación (a 22° C).

F1: nivel proteico; **F2**: fermento; **F1xF2**: interacción entre los factores.

Las diferencias significativas se indican con * en la columna del factor que corresponda (p<0,05).

Las diferencias estadísticas se indican con letras minúsculas (**F1**), letras griegas (**F2**) y letras mayúsculas (**F1xF2**).

NS: no significativo (p>0,05).

El pH de gelificación (pH_{gel} , obtenido de la curva en el punto donde $G' \geq 1$ Pa) no mostró diferencias significativas entre los yogures y sus valores estuvieron entre 5,15-5,59. Estos valores son típicos para una fermentación de yogur y corresponden al punto isoeléctrico de la β -lactoglobulina (Lucey et al., 2022).

El tiempo de fermentación (t_{ferm}) fue afectado significativamente por la interacción de los factores, siendo mayor en E_Y9 que en E_Y8, T_Y8, T_Y9 y T_SG, y similar a E_SG. Además, en todos los yogures E se registraron tiempos de fermentación más prolongados que en los yogures T, relacionado probablemente a la mayor capacidad buffer que presentan los yogures altos en proteína en el rango de pH que corresponde a una fermentación de yogur, dada por la mayor concentración de caseína y, en consecuencia, de fosfato de calcio coloidal, como ya se explicó en **Capítulo 2** (Jørgensen et al., 2019). En cuanto al tipo de fermento (compuestos por *S. thermophilus* y *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus*), otros autores encontraron tiempos de fermentación variables. Körzendörfer et al. (2017) emplearon dos fermentos comerciales con diferente capacidad de producción de exopolisacáridos (EPS) para analizar el efecto en los aspectos estructurales de yogures con contenido tradicional de proteína (3,4 g/100 g), y encontraron diferentes tiempos de fermentación. Vénica et al. (2023a) utilizaron tres fermentos comerciales en tres formulaciones de leches base incrementadas en proteína (5,0-5,5 g/100 g de proteína), y reportaron diferencias en los tiempos de fermentación, adjudicado a la composición de los fermentos, en particular por las diferentes proporciones de *S. thermophilus* y *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus*. Es importante destacar que en dicho trabajo no se analizó el efecto conjunto de ambos factores (contenido proteico y fermento) y no se varió sustancialmente el contenido proteico de las formulaciones.

El G' en el pH target ($G'_{pH=4,6}$) tuvo diferencias significativas entre los yogures y se encontró interacción significativa entre ambos factores. E_Y8 mostró mayores valores que todos los yogures T, pero no tuvo diferencias con E_Y9 y E_SG, y tampoco se encontraron diferencias significativas entre E_Y9/E_SG con los yogures T_Y9, T_SG, T_Y8. Como ya fue mencionado, G' es una medida de la energía almacenada en un material e indica sus propiedades elásticas (vinculadas al comportamiento de un sólido). Mayores valores de G' son correlacionados con un incremento de las interacciones caseína-proteínas de suero debido al tratamiento térmico como fue descrito previamente (Lee y Lucey, 2003). El efecto de distintos fermentos sobre G' se ha estudiado en yogures con contenido tradicional de proteína (3,3 g/100 g) y en especial para evaluar el impacto de los EPS producidos (Haque et al., 2001; Hassan et al., 2002). Es importante destacar que en nuestro trabajo se pudo comprobar la importancia del efecto combinado del fermento y del contenido proteico en $G'_{pH=4,6}$, y no solo el efecto individual de los factores. Resultados de este tipo para yogures altos en proteína no se encuentran reportados en bibliografía.

La tangente de pérdida a pH=4,6 ($LT_{pH=4,6}$), que representa la relación entre G'' y G' ($LT=G''/G'$), fue menor a 1 en todos los casos, sin diferencias significativas entre los yogures.

Este resultado era esperado, ya que para productos viscoelásticos como el yogur se cumple que $G' > G''$, lo que significa que presentan una componente elástica mayor que la viscosa (Lee y Lucey, 2003).

La viscosidad al inicio de la agitación -a bajos niveles de deformación y 22 °C (η_{sa}) fue afectada significativamente por la interacción de los factores: $E_{Y8} \cong E_{SG} > E_{Y9} > T_{Y8} \cong T_{Y9} \cong T_{SG}$. En el punto final de la curva de agitación (η_{ca}) también se encontró que la interacción de los factores fue significativa, mostrando el siguiente orden: $E_{Y9} > E_{Y8} \cong E_{SG} > T_{Y8} \cong T_{Y9} \cong T_{SG}$.

A pesar de que G' y viscosidad son conceptos distintos (la viscosidad se define como la resistencia de un material a fluir), ambos guardan una relación entre sí, y los yogures con alto contenido proteico muestran mayor viscosidad y G' que los tradicionales (Jørgensen et al., 2019). La mayor viscosidad en sistemas con mayor concentración de caseína y proteínas de suero que fueron sometidos a un tratamiento térmico intenso antes de la fermentación o acidificación está relacionada con una mayor interconexión entre las proteínas que contribuyen a formar una matriz más densa. Con la agitación, la matriz se convierte en una dispersión de agregados proteicos y partículas de 10 a 100 μm originada por la ruptura que ocurre cuando se aplican altas deformaciones; sin embargo, algunos enlaces se vuelven a formar en un corto tiempo, lo que permite recuperar parcialmente la red proteica que originalmente formaba el gel (Lucey, 2004a). Respecto a la reología de yogures batidos, se ha observado que las propiedades de los mismos guardan relación con las características de la matriz original (Lee y Lucey, 2006). Sin embargo, es importante considerar las condiciones a las cuales se produce la agitación, principalmente, el esfuerzo y la velocidad de corte que se aplica. Esto podría ser una explicación para la tendencia similar hallada en la viscosidad de los yogures al inicio y al final de la agitación, ya que, a pesar de que los valores no son comparables entre ambos estadios, los yogures E tuvieron mayor viscosidad respecto a los T en ambos puntos de muestreo.

Como ya se mencionó previamente, es importante considerar el efecto de los EPS en las características reológicas del yogur tales como consistencia, G' y viscosidad. Este efecto fue estudiado por Hassan et al. (2003), donde determinaron cómo varía la localización y organización de los EPS en un yogur (3,3 g/100 g de proteína) antes y después de la agitación. Mediante CLSM observaron que los EPS mostraron incompatibilidad con las proteínas que forman la matriz del yogur y se ubicaron en los espacios intersticiales (es decir, en los poros). Luego de la agitación, los EPS se agruparon entre sí formando filamentos de mayor tamaño que se intercalaron en la red proteica. Estas variaciones microestructurales visualizadas en los yogures con EPS tuvieron efecto sobre la viscosidad, la consistencia, G' y G'' , en comparación a yogures sin EPS, observándose menores valores luego de la agitación.

Según la información técnica del fabricante de los fermentos empleados en nuestro trabajo, Y8 e Y9 poseen una alta y similar capacidad para producir EPS, por lo que se esperaba que

modifiquen la viscosidad de los yogures de manera similar (**Fig. 3.4**). No se dispone de información sobre la formación de EPS por las cepas del fermento SG.

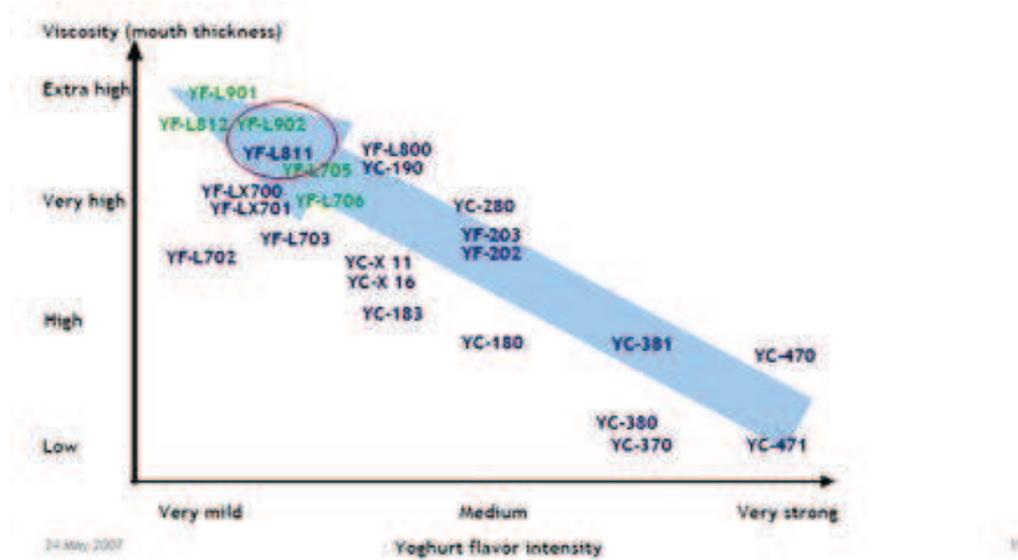


Fig. 3.4. Características (viscosidad en boca e intensidad de sabor a yogur) de fermentos comerciales para yogur productores de EPS del fabricante Chr. Hansen (Skriver y Karychev, 2007).

2.2. Composición global de las leches base, y pH y ácidos orgánicos de los yogures

La composición de las dos formulaciones de LB, los contenidos de las distintas fracciones proteicas antes y después del tratamiento térmico, el grado de desnaturalización de las proteínas de suero, y la concentración de ácidos orgánicos y lactosa se muestran en la **Tabla 3.5**.

Tabla 3.5. Composición global de las leches base T y E.

Parámetros	LB_T	LB_E	Factor
			FI
ST (g/100 g)	9,85±0,32 ^b	14,54±0,98 ^a	*
Grasa (g/100 g)	1,00±0,07	0,94±0,06	NS
Lactosa (g/100 g) [†]	5,07±0,30	5,11±0,03	NS
Calcio (mg/100 g)	121,49±15,98 ^b	217,63±9,61 ^a	*
Magnesio (mg/100 g)	11,79±1,23 ^b	17,12±1,20 ^a	*
Fósforo (mg/100 g)	97,31±11,44 ^b	173,81±12,32 ^a	*
Azufre (mg/100 g)	34,92±3,38 ^b	70,44±3,65 ^a	*
Sodio (mg/100 g)	30,42±2,19	31,80±4,55	NS
Potasio (mg/100 g)	97,31±11,44	173,81±12,32	NS
Ác. Cítrico (mg/100 g)	141,97±6,30 ^b	168,80±13,55 ^a	*
Ác. Propiónico (mg/100 g)	ND	ND	
Ác. Butírico (mg/100 g)	ND	ND	
Ác. Láctico (mg/100 g)	ND	ND	
Fraciones proteicas			
Proteína cruda pre TT (g/100 g)	3,33±0,02 ^b	7,50±0,41 ^a	*
Proteína verdadera pre TT (g/100 g)	3,17±0,01 ^b	7,32±0,40 ^a	*
Caseína pre TT (g/100 g)	2,61±0,01 ^b	5,58±0,50 ^a	*
Proteína cruda post TT (g/100 g)	3,33±0,04 ^b	7,47±0,39 ^a	*
Proteína verdadera post TT (g/100 g)	3,17±0,03 ^b	7,29±0,38 ^a	*
Caseína post TT (g/100 g)	2,98±0,00 ^b	6,93±0,37 ^a	*
Proteína soluble a pH 4,6 (g/100g)			
Pre TT	0,56±0,00 ^b	1,74±0,12 ^a	*
Post TT	0,19±0,03 ^b	0,36±0,02 ^a	*
% Desnaturalización WP	66,23±5,20 ^b	79,31±2,82 ^a	*

Los resultados se expresan como el valor medio ± desviación estándar de 3 réplicas de elaboración.

[†]Calculado por diferencia.

FI: nivel proteico; pre TT: previo al tratamiento térmico; post TT: luego del tratamiento térmico; WP: proteínas de suero.

* indica diferencias significativas (p<0,05)

NS: no significativo (p>0,05).

ND: no detectado

Como era esperado, los niveles de sólidos totales y de las distintas fracciones proteicas fueron mayores en LB_E que en LB_T, mientras que la lactosa y la grasa fueron similares (~5,1 y ~1,0

g/100 g, respectivamente). La concentración de ácido cítrico fue mayor en LB_E (168,8±13,5 mg/100 g) que en LB_T (142,0±6,3 mg/100 g), y la misma fue considerablemente menor que la hallada en las LB de los yogures presentados en el **Capítulo 1** (~320-365 mg/100 g) y en las LB del **Capítulo 2** (~210-296 mg/100 g). Como el ácido cítrico está presente naturalmente en la leche bovina, las diferencias podrían atribuirse a la distinta calidad y origen de la materia prima utilizada en la experiencia presentada en este Capítulo respecto a lo empleado en las experiencias realizadas en nuestro país y presentadas en los restantes capítulos. Los ácidos propiónico y butírico no se detectaron en ninguna de las muestras de LB.

Las fracciones proteicas de las LB, analizadas antes y después del tratamiento térmico, permitieron calcular el grado de desnaturalización de las proteínas de suero, que fue 66% en T y 79% en E. Estos valores son similares a los reportados para LB de yogures con contenido proteico tradicional (Sodini et al., 2005) y altos en proteína (Jørgensen et al., 2015). La desnaturalización de las proteínas de suero no solo afecta la textura del yogur sino también el aspecto nutricional, considerando que la forma y textura de los alimentos tienen impacto en su capacidad saciante, como ya se mencionó en el **Capítulo 2**. Por otro lado, Rioux y Turgeon (2012) observaron que yogures (3,7 g/100 g de proteína) con relaciones CN:WP de 1,5:1, 2,8:1 y 4,5:1 tuvieron grados de desnaturalización de 87% para las dos primeras relaciones y 75% para la tercera, aplicando un tratamiento térmico de 90 °C/1 min. De manera similar, Gilbert et al. (2020) hallaron un grado de desnaturalización del 80% en una formulación de yogur (4 g/100 g de proteína) con relación CN:WP de 2,8:1, luego de un tratamiento térmico de 95°C/1 min.

La composición mineral mostró mayores niveles de calcio, magnesio, fósforo y azufre en LB_E que en LB_T, pero no se encontraron diferencias significativas para el potasio y el sodio. Estos resultados se explican por la alta proporción de calcio, magnesio y fósforo presente en la fase coloidal de la leche (asociados a las micelas de caseínas), y de azufre en las principales proteínas de suero (residuos de cisteína y metionina en β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina) que se concentraron por el procesamiento de UF en la LB_E. El sodio y el potasio se encuentran mayoritariamente en la fase soluble de la leche, por lo que se reparten en la misma proporción entre el retentado y el permeado (Chandan, 2006).

Los valores de pH y concentraciones de ácidos orgánicos y lactosa al día 1 se muestran en la **Tabla 3.6**.

Tabla 3.6. Valores de pH, ácidos orgánicos y lactosa de los yogures T y E elaborados con los fermentos Y8, Y9 y SG (1 d).

Parámetros	Yogur						Factores		
	T_Y8	T_Y9	T_SG	E_Y8	E_Y9	E_SG	F1	F2	F1xF2
pH	4,36±0,06 ^b	4,45±0,08 ^b	4,44±0,08 ^b	4,55±0,06 ^a	4,56±0,04 ^a	4,58±0,06 ^a	*	NS	NS
Á. Cítrico (mg/100 g)	149,47±8,73 ^b	150,20±11,31 ^b	146,80±6,36 ^b	165,77±9,60 ^a	171,33±14,99 ^a	167,90±13,43 ^a	*	NS	NS
Á. Láctico (mg/100 g)	584,62±51,44 ^b	583,24±14,92 ^b	577,47±10,48 ^b	1017,71±64,38 ^a	962,86±10,19 ^a	975,74±53,48 ^a	*	NS	NS
Á. Propiónico (mg/100 g)	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
Á. Butírico (mg/100 g)	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
Lactosa (g/100 g) [†]	3,21	3,23	3,40	2,68	2,94	2,87			

Los resultados se expresan como el valor medio ± desviación estándar de 3 réplicas de elaboración.

[†]Resultado de una réplica de elaboración.

ND: no detectado.

F1: nivel proteico; **F2**: fermento; **F1xF2**: interacción entre factores.

Las diferencias significativas se indican con * en la columna del factor que corresponda ($p < 0,05$).

Las diferencias estadísticas se indican con letras minúsculas (**F1**), letras griegas (**F2**) y letras mayúsculas (**F1xF2**).

NS: no significativo ($p > 0,05$).

El pH de los yogures al día 1 fue de $4,45 \pm 0,08$, $4,44 \pm 0,08$ y $4,36 \pm 0,06$ en T_Y9, T_SG y T_Y8, respectivamente; y de $4,56 \pm 0,04$, $4,58 \pm 0,06$ y $4,55 \pm 0,06$ en E_Y9, E_SG y E_Y8, respectivamente. Se hallaron diferencias significativas según el nivel proteico, mostrando los yogures E mayor pH que los yogures T (no se observó interacción significativa entre los factores). Los contenidos de los ácidos láctico y cítrico fueron mayores en los yogures E que en los T, independientemente del fermento empleado. Para el láctico, los valores fueron ~ 600 mg/100 g en los yogures T y ~ 1000 mg/100g en los yogures E, y para el cítrico ~ 150 mg/100 g en los yogures T y ~ 170 mg/100 g en los yogures E. Los ácidos propiónico y butírico no fueron detectados. Los niveles de los ácidos láctico y cítrico de los yogures T son comparables a los hallados por Vénica et al. (2014) para yogures con 3,3 g/100 g de proteínas, evaluados al final de la fermentación. Por su parte, las concentraciones de láctico y cítrico de los yogures E fueron menores a las halladas por Vénica et al. (2024) para yogures incrementados en proteína (6,6-7,8 g/100 g) elaborados con leche concentrada por UF y polvos lácteos (SMP, WPC35, WPC80). Esta discrepancia entre nuestros resultados y los informados por Vénica et al (2024) no es sorprendente, ya que, si bien los contenidos de lactosa de partida fueron similares en ambos trabajos, Vénica et al. (2024) adicionó β -galactosidasa para hidrolizar la lactosa, lo que podría haber impactado en la fermentación y por lo tanto en la producción de ácidos orgánicos.

Los contenidos de lactosa fueron ~ 3 g/100 g en todos los yogures al día 1, indicando que el proceso de fermentación fue similar en todos los casos, con una reducción del 30-40% del nivel de lactosa contenida en las LB, tal como se reporta (Chandan, 2006). Los valores hallados en estos yogures son similares a los encontrados para los productos presentados en el **Capítulo 2**, pero menores a lo hallado para los yogures del **Capítulo 1**. Nuevamente, como ya se mencionó en el Capítulo anterior, el empleo de ingredientes con alto contenido proteico (MPC70, WPC80) y con contenido de lactosa menor al de los otros ingredientes empleados (SMP, WPC35, MWP45), permitió obtener yogures altos en proteína con contenidos de lactosa similar al de los yogures con contenido de proteína tradicional, y esto se pudo corroborar en este Capítulo. En particular, la concentración de las proteínas de la leche por UF resulta ventajoso para lograr este propósito; es decir, si bien el nivel de lactosa es similar en el retentado y en el permeado de UF, la relación proteína/lactosa de la leche concentrada (retentado UF) aumenta. En el caso del agregado de ingredientes con alto contenido de lactosa, como los mencionados, se aumentan proporcionalmente tanto las proteínas como la lactosa. Es decir, la relación proteína/lactosa es mayor en leches base preparadas con retentado de UF que en aquellas con adición de polvos lácteos con baja concentración proteica (Biliaderis et al., 1992). Por ejemplo, en las formulaciones con WPC35 del **Capítulo 1** se obtuvo una relación proteína:lactosa de 0,8:1 respecto a una relación 1,4:1 en la formulación E de este Capítulo

2.3. Capacidad de retención de agua y permeabilidad de los yogures

Los valores de CRA y de permeabilidad registrados al día 1, en los yogures T y E elaborados con los fermentos Y8, Y9 y SG, en los que no se aplicó agitación luego de finalizada la fermentación, se presentan en la **Fig. 3.5**.

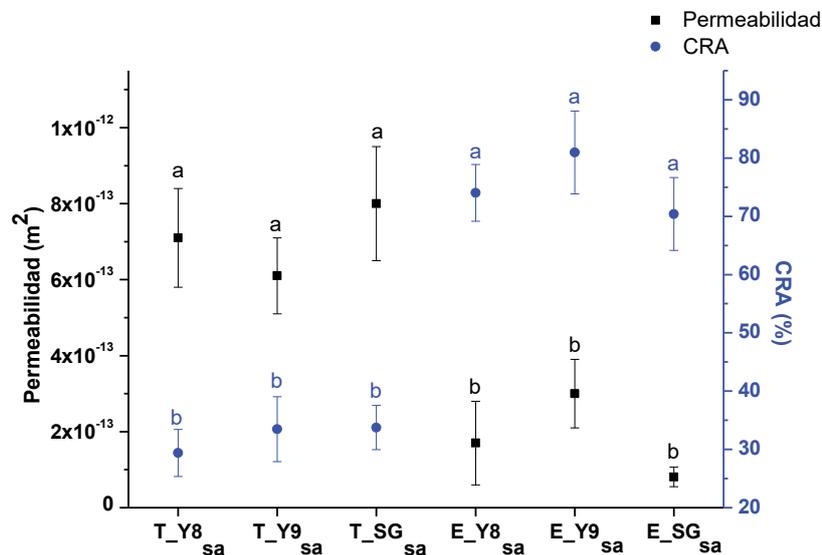


Fig. 3.5. Valores de permeabilidad (m²) de los yogures sin agitación (inmediatamente luego de la fermentación) y CRA (%) de los yogures sin agitación (sa) a 1 d.

Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de 3 réplicas de elaboración. Letras distintas para un mismo parámetro indican diferencias significativas entre yogures ($p < 0,05$).

Tanto la CRA como la permeabilidad evaluada en los yogures sin agitación, solo fueron afectadas significativamente por el nivel proteico (*F1*); el fermento (*F2*) no afectó significativamente estos parámetros. La CRA fue mayor en los yogures E (70-80%) que en los yogures T (29-33%), mientras que la permeabilidad mostró una tendencia contraria; mayores valores de permeabilidad se tuvieron en los yogures T ($6 \cdot 10^{-13}$ - $8 \cdot 10^{-13}$ m²) respecto a los E ($8 \cdot 10^{-14}$ - $2 \cdot 10^{-13}$ m²). La CRA en los yogures E fue similar a la observada por Körzendörfer y Hinrichs (2019) en yogures altos en proteína (~10 g/100 g de proteína). En yogures con 4 g/100 g de proteína, Sodini et al. (2005) hallaron mayores valores de CRA (50-63%) que en los yogures T; esta diferencia podría atribuirse al mayor entrecruzamiento logrado entre las proteínas al aplicar un tratamiento térmico más severo (90 °C/55 min) y los diferentes ingredientes empleados en dicho trabajo.

Los resultados de CRA y permeabilidad guardan una estrecha relación entre sí, con tendencias contrapuestas. Es decir, altos niveles de permeabilidad se vinculan con microestructuras más porosas, y en consecuencia menor CRA (Peng et al., 2009). Los valores de permeabilidad hallados

en los yogures T fueron similares a los reportados por Peng et al. (2009) para yogures con 3,5 g/100 g de proteína. Los únicos datos de permeabilidad en geles lácteos altos en proteína fueron reportados por Wilbanks et al. (2023), donde obtuvieron mayores valores de permeabilidad en geles preparados con aislado de caseína micelar (8 g/100 g de proteína) respecto a los valores de nuestro trabajo, pudiendo atribuírselo a la falta de proteínas de suero en esos sistemas. Por el contrario, en geles elaborados con SMP (8 g/100 g de proteína) mostraron valores en el mismo orden que los que obtuvimos para los yogures E en nuestro trabajo.

2.4. Microestructura y aspecto visual de los yogures

Las micrografías de CLSM de los yogures T y E elaborados con los fermentos Y8, Y9 y SG, en los que se aplicó o no agitación (**ca** y **sa**, respectivamente), se muestran en la **Fig. 3.6**.

La observación de las imágenes revela diferencias entre los yogures T y E, y algún efecto del fermento (para cada formulación proteica), pero la diferencia más notoria se debe a la aplicación o no de agitación.

Se observa una estructura proteica continua o bastante continua en todos los yogures. Los yogures E presentaron estructuras proteicas más densas que los yogures T, para las muestras con y sin agitación. Además, al comparar los productos con igual contenido proteico, una estructura más densa se aprecia en los yogures sin agitación (**sa**) respecto a los productos agitados (**ca**). Es decir, el cambio en la organización de las matrices proteicas post agitación es notable y se pueden discriminar fácilmente los agregados proteicos de los poros, con formas y tamaños diversos. En efecto, los espacios intersticiales entre agregados proteicos son más grandes (microestructura más espaciada), la distribución es más dispersa y la conexión entre grupos es más débil para los yogures **ca** respecto a los **sa**.

En los yogures T, los espacios vacíos (poros) son más grandes que en los yogures E, y esto es más notorio en los yogures **ca** respecto a los **sa**. Los yogures E con agitación muestran mayor interconexión entre sus agregados proteicos que los yogures T con agitación. La microestructura puede correlacionarse bien con la permeabilidad para los yogures sin agitación: los yogures E_{sa} muestran una red proteica más densa, que se puede suponer menos permeable que la de los yogures T_{sa}, que presentaron mayor porosidad.

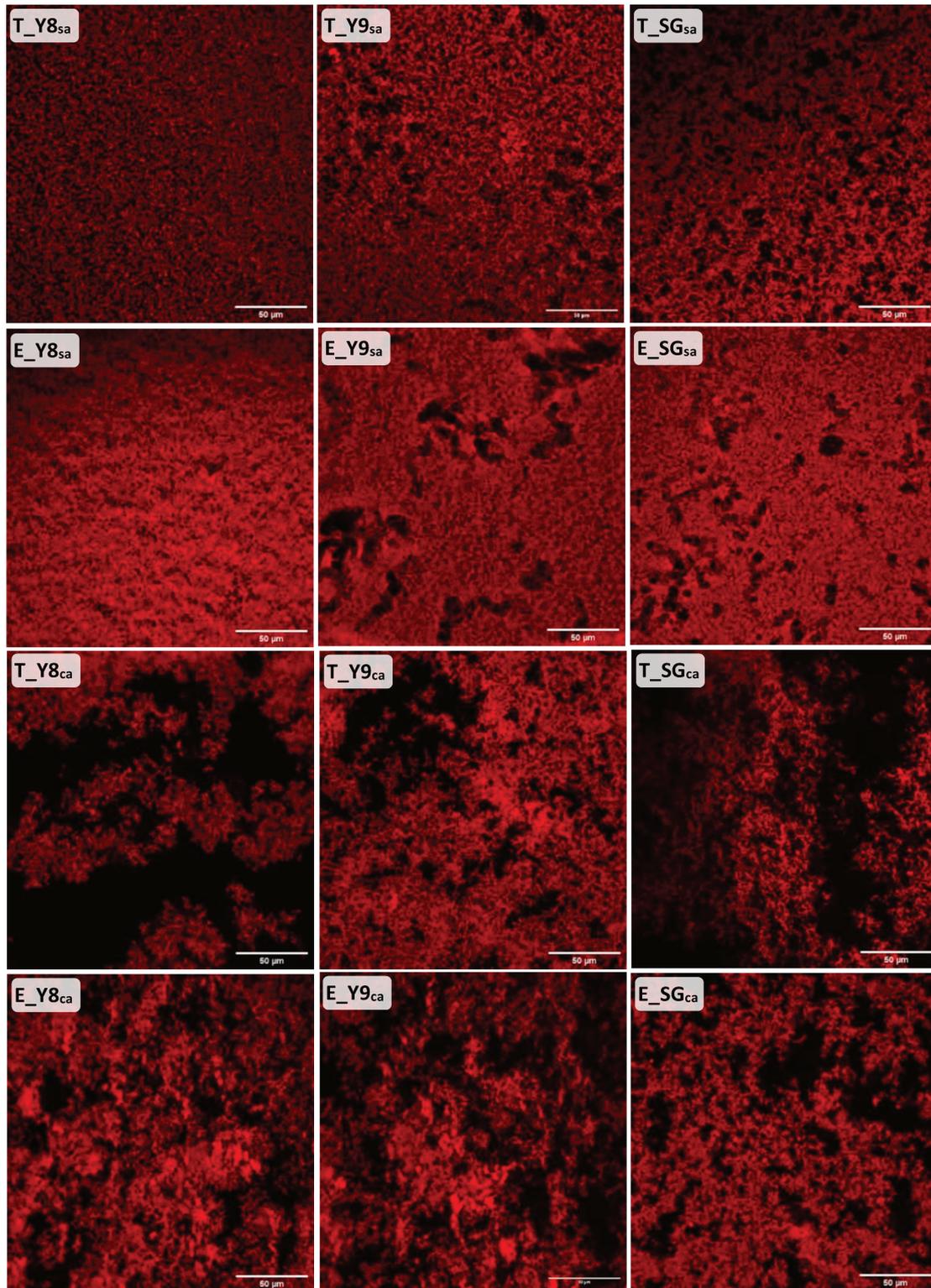


Fig. 3.6. Micrografías de CLSM de yogures sin agitación T_Y8_{sa}, T_Y9_{sa}, T_SG_{sa}, E_Y8_{sa}, E_Y9_{sa}, y E_SG_{sa}; y con agitación T_Y8_{ca}, T_Y9_{ca}, T_SG_{ca}, E_Y8_{ca}, E_Y9_{ca}, y E_SG_{ca}.

En rojo se observan los agregados proteicos y en negro las regiones correspondientes a los poros de la estructura.

En la **Fig. 3.7**, se puede observar las diferencias de los yogures a nivel visual (aunque no se dispone de fotografías de los yogures T sin agitación).

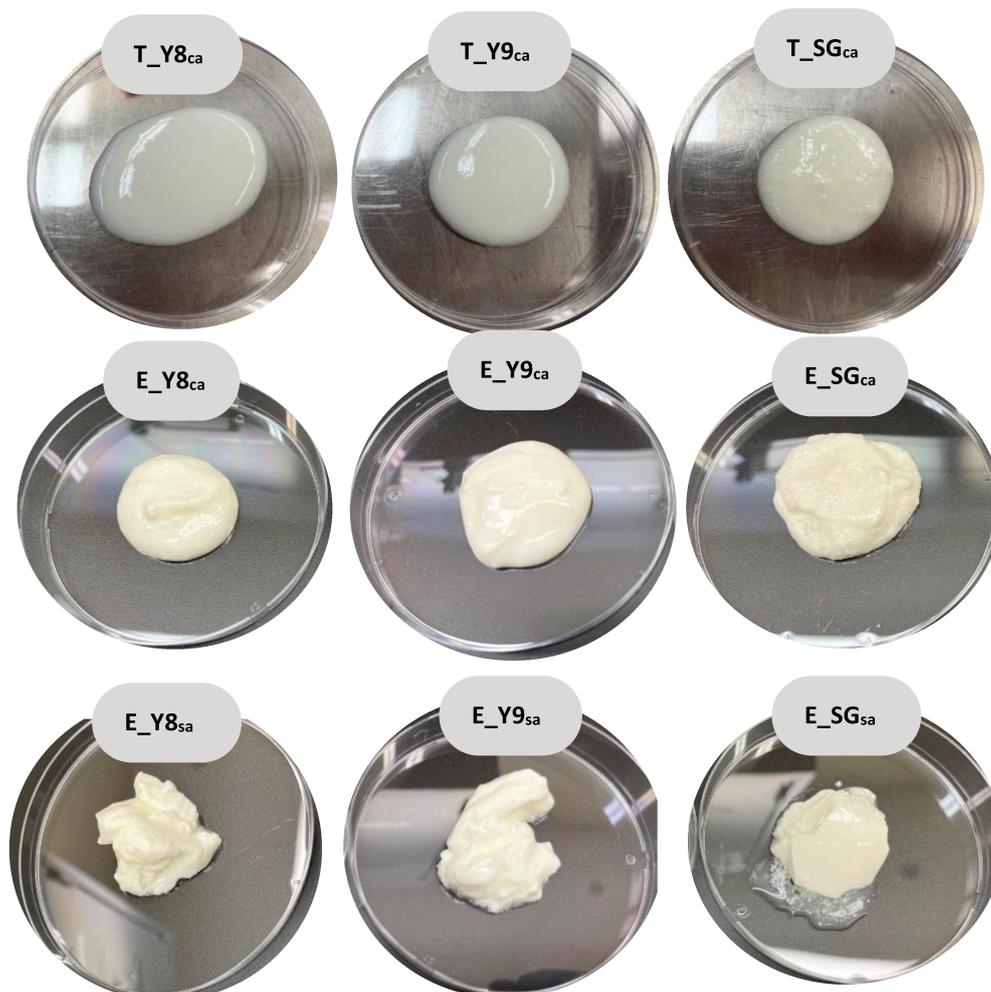


Fig. 3.7. Observación visual de los yogures con agitación (T_Y8_{ca}, T_Y9_{ca}, T_SG_{ca}, E_Y8_{ca}, E_Y9_{ca}, y E_SG_{ca}) y sin agitación (E_Y8_{sa}, E_Y9_{sa}, y E_SG_{sa}).

En las imágenes se aprecian claramente las diferencias en las características macroscópicas (consistencia, brillo, opacidad y grumosidad) entre los yogures T y E con agitación (T_{ca} y E_{ca}), y entre los yogures E sin y con agitación (E_{sa} y E_{ca}). Se puede detectar cierta grumosidad y opacidad en los yogures con el fermento SG con agitación (T_SG_{ca} y E_SG_{ca}), mientras que el resto de los yogures presentan un aspecto más homogéneo y brillante.

2.5. Reología en condiciones orales de los yogures

Las curvas de Viscosidad Aparente (mPa.s) vs. Temperatura (°C) obtenidas por reometría rotacional CC en condiciones orales simuladas (velocidad de corte constante de 60 s⁻¹,

temperatura de 15 a 25 °C y mantenimiento por 1 min a 25-26 °C), y los parámetros calculados a partir de las mismas, para los yogures sin agitación (**sa**) y con agitación (**ca**) (1 d) se muestran en la **Fig. 3.8** y en la **Tabla 3.7**, respectivamente. También se incluye la significancia de los factores estudiados ($F1$ y $F2$) y su interacción.

Los parámetros medidos mostraron diferencias significativas entre los yogures. Para los yogures sin agitación, η_1 fue afectada significativamente por la interacción de los factores. El orden obtenido fue $E_SG_{sa} > E_Y9_{sa} \cong E_Y8_{sa} > T_SG_{sa} \cong T_Y9_{sa} \cong T_Y8_{sa}$. Para η_2 y η_3 ambos factores fueron significativos, pero no su interacción. La tendencia fue similar para ambos parámetros: mayores viscosidades fueron halladas en los yogures E respecto a los T, y en aquellos con Y9 respecto a aquellos con Y8 y SG. La pendiente de la curva fue afectada significativamente por el contenido proteico ($F1$): los yogures E mostraron pendientes más pronunciadas que los productos T.

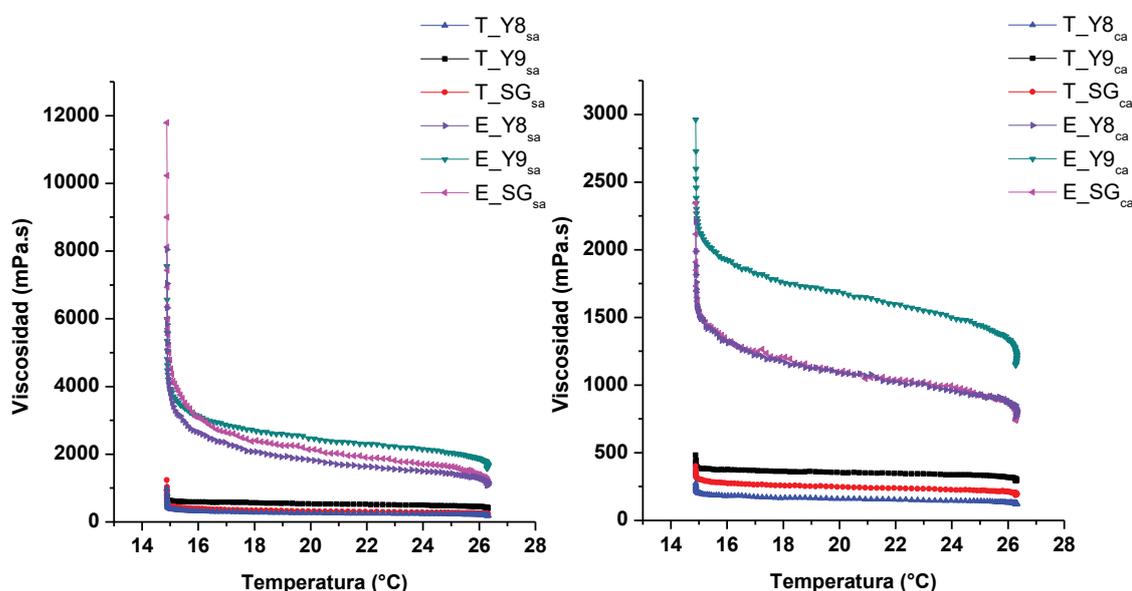


Fig. 3.8. Curvas de Viscosidad Aparente (mPa.s) vs. Temperatura (°C) obtenidas por reometría rotacional en condiciones orales simuladas (velocidad de corte constante de 60 s^{-1} , temperatura de 15 a 25 °C, $\sim 1 \text{ °C/s}$ por 1 min; mantenimiento a 25-26 °C por 1 min), para los yogures T y E elaborados con los fermentos Y8, Y9 y SG, y con aplicación o no de agitación (1 d). **Izq.:** yogures sin agitación (**sa**); **der.:** yogures con agitación (**ca**).

Los resultados se expresan como el valor medio de 3 réplicas de elaboración.

Tabla 3.7. Parámetros obtenidos por reometría rotacional en condiciones orales simuladas, para los yogures T y E elaborados con los fermentos Y8, Y9 y SG, con y sin agitación (**ca** y **sa**, respectivamente) (1 d).

Yogur	Parámetros				
	η_1 (mPa.s)	η_2 (mPa.s)	η_3 (mPa.s)	Pendiente	
Sin agitación	T_Y8 _{sa}	917,0±51,0 ^C	250,9±15,2 ^{bβ}	186,5±10,7 ^{bβ}	-9,6±0,8 ^b
	T_Y9 _{sa}	784,0±69,6 ^C	517,7±67,9 ^{bα}	399,1±56,6 ^{bα}	-12,4±3,6 ^b
	T_SG _{sa}	1035,8±121,1 ^C	299,8±56,6 ^{bβ}	220,2±39,8 ^{bβ}	-12,3±3,1 ^b
	E_Y8 _{sa}	6294,8±771,7 ^B	1644,6±251,2 ^{aβ}	1090,4±217,0 ^{aβ}	-93,4±7,2 ^a
	E_Y9 _{sa}	5717,1±282,1 ^B	2306,6±320,6 ^{aα}	1588,0±154,6 ^{aα}	-100,2±15,0 ^a
	E_SG _{sa}	10230,4±640,9 ^A	1911,4±122,4 ^{aβ}	1110,8±124,2 ^{aβ}	-121,1±20,4 ^a
F1	*	*	*	*	
F2	*	*	*	NS	
F1x F2	*	NS	NS	NS	
Con agitación	T_Y8 _{ca}	258,4±14,8 ^{bβ}	154,9±12,3 ^C	119,8±7,0 ^{bβ}	-5,0±0,6 ^C
	T_Y9 _{ca}	506,4±10,0 ^{bα}	346,4±88,5 ^C	292,4±83,2 ^{bα}	-4,8±1,0 ^C
	T_SG _{ca}	375,2±10,4 ^{bβ}	239,6±27,4 ^C	187,2±24,6 ^{bβ}	-5,9±0,4 ^C
	E_Y8 _{ca}	1989,1±168,0 ^{aβ}	1027,0±24,7 ^B	767,0±3,8 ^{aβ}	-35,8±2,6 ^B
	E_Y9 _{ca}	2729,8±471,3 ^{aα}	1599,5±322,3 ^A	1149,1±257,5 ^{aα}	-49,9±2,1 ^A
	E_SG _{ca}	2117,1±207,8 ^{aβ}	1039,7±73,4 ^B	739,0±30,3 ^{aβ}	-36,0±9,2 ^B
F1	*	*	*	*	
F2	*	*	*	*	
F1x F2	NS	*	NS	*	

Los resultados se expresan como el valor medio ± desviación estándar de 3 réplicas de elaboración. η_1 : viscosidad inicial (15° C); η_2 : viscosidad al final de la fase oral simulada (25° C); η_3 : viscosidad final luego de 1 min de exposición (25 °C).

ND: no detectado.

F1: nivel proteico; **F2**: fermento; **F1x F2**: interacción entre factores.

Las diferencias significativas se indican con * en la columna del factor que corresponda (p<0,05).

Las diferencias estadísticas se indican con letras minúsculas (**F1**), letras griegas (**F2**) y letras mayúsculas (**F1x F2**).

NS: no significativo (p>0,05).

Para los yogures con agitación, los dos factores estudiados fueron significativos, pero no su interacción, ni en η_1 ni en η_3 . Los mayores valores de η_1 se registraron en los yogures E, y en los yogures con Y9 para cada nivel proteico. La tendencia observada en η_3 fue similar a la de η_1 : los yogures E tuvieron mayores valores que los productos T y el fermento Y9 produjo mayor viscosidad para cada nivel proteico. Para η_2 , tanto los factores individuales como su interacción fueron significativos, y los valores siguieron el orden:

$E_{Y9_{ca}} > E_{SG_{ca}} \cong E_{Y8_{ca}} > T_{Y9_{ca}} \cong T_{SG_{ca}} \cong T_{Y8_{ca}}$. La pendiente de la región lineal de las curvas fue afectada significativamente por ambos factores y por la interacción; los valores siguieron el siguiente orden: $E_{Y9_{ca}} > E_{SG_{ca}} \cong E_{Y8_{ca}} > T_{Y9_{ca}} \cong T_{SG_{ca}} \cong T_{Y8_{ca}}$.

En líneas generales, los resultados fueron consistentes en ambos tipos de yogures (con y sin agitación): a mayor nivel proteico, mayor viscosidad a 15 °C (η_1), a 25 °C con la exposición más corta (η_2) y a 25 °C con la exposición más prolongada (η_3) al esfuerzo de corte constante, y también mayor pendiente en la región lineal de las curvas de Viscosidad Aparente vs. Temperatura. Resultados similares fueron observados por Huc et al. (2016) cuando aplicaron esta metodología a yogures batidos comerciales con diferentes contenidos de proteína (3,1 a 9,8 g/100 g) y de grasa (0,1 a 10 g/100 g); en dicho trabajo encontraron que el contenido proteico tuvo mayor influencia que el contenido graso, en la viscosidad evaluada en condiciones orales simuladas.

La evaluación de la viscosidad en tres puntos distintos de la curva se realizó con el objetivo de relacionar las características estructurales del yogur con su potencial capacidad saciante, de manera similar a lo que se planteó en el **Capítulo 2**, aunque para los yogures de este capítulo se aplicó una pequeña variante. En este caso se utilizó mayor masa del alimento (~20 g), lo que simularía la masticación y deglución de una cucharada de yogur, y por lo tanto resulta un análisis más representativo de lo que sucede en la boca. Como se mencionó en el **Capítulo 2**, la percepción oral del alimento, su tiempo de residencia en la boca y su viscosidad al alcanzar el estómago guardan relación con su capacidad saciante. En un artículo de revisión y meta-análisis publicado recientemente, Stribițcaia et al. (2020) reportaron los resultados de numerosos trabajos que analizaron el efecto de la textura de los alimentos (viscosidad, forma, complejidad estructural) en la capacidad saciante a corto y largo plazo. La observación general fue que, al consumir alimentos semisólidos y con mayor viscosidad, se suprimió el apetito y se redujo la ingesta de alimentos del episodio alimentario posterior, en mayor medida en comparación a alimentos menos viscosos. Esto fue particularmente percibido en la sensación de plenitud reportada por los participantes de dichos estudios. En relación a esto, Stribițcaia et al. (2022) estudiaron cómo la viscosidad de bebidas lácteas (preparadas solo con WPI -baja viscosidad- o con WPI+goma xantana -viscosidad intermedia y alta-) impactó en la saciedad/sensación de plenitud en los participantes. Los

participantes evaluaron la viscosidad observando cómo los productos fluían de un recipiente a otro y mediante esta observación consideraron que los más viscosos serían los más saciantes. Esto se explicó por una relación previamente establecida entre la saciedad realmente percibida al ingerir alimentos muy viscosos por parte de los participantes y el recuerdo de estas experiencias. Los alimentos viscosos sufren una mayor exposición oro-sensorial (un bocado de un alimento más viscoso pasa más tiempo en la boca que un bocado de uno menos viscoso), razón por la cual incrementar la viscosidad de un alimento como el yogur es una estrategia alimentaria para personas con sobrepeso/obesidad (de Graaf, 2012).

La manera más común de incrementar la viscosidad del yogur es incorporando gomas o almidón (Stribițcaia et al., 2022; Tarrega et al., 2016), pero en este trabajo empleamos la estrategia de incrementar el contenido proteico, y se comprobó un aumento de la viscosidad de los productos en comparación a yogures con contenido regular de proteína (E vs. T), como se mencionó.

3. Conclusiones

Se obtuvieron yogures con alto contenido proteico (7,5 g/100 g) y con contenido tradicional o regular (3,3 g/100 g) de proteínas y parcialmente descremados (<1,5 g/100 g) utilizando retentado de leche obtenido por UF y leche pasteurizada, respectivamente, y aislado de proteínas de suero nativas en ambos productos, y distintos fermentos comerciales. El efecto combinado del uso de distintos fermentos y distintos niveles proteicos tuvo implicancias en la formación del gel, en el tiempo de fermentación, en los aspectos estructurales de los yogures, y en la evaluación de la viscosidad aparente en condiciones orales simuladas, en la microestructura y en la observación macroestructural.

Las curvas de G' vs pH durante la formación del gel mostraron diferencias por ambos factores, al igual que la viscosidad al inicio y al final de la curva de agitación. El pH y el contenido de ácidos orgánicos (cítrico y láctico) mostró diferencias según el nivel proteico, mostrando los yogures T menores valores que los E. El aspecto visual de los yogures con el fermento SG fue más grumoso que para los yogures con los fermentos Y8 e Y9, independientemente del nivel proteico. El comportamiento reológico en condiciones orales de los yogures sin agitación y con agitación mostró que los yogures E tuvieron mayor viscosidad en los tres puntos analizados durante la deformación a 60 s^{-1} , tendencia que coincidió con la viscosidad medida inmediatamente después de la fermentación (η_{sa}). Además, la variación de la viscosidad durante esta deformación, representada por la pendiente de la región lineal de la curva, fue más pronunciada en los yogures E que en los T, lo que significa que el procesamiento oral es más intenso en los yogures con alto

contenido en proteínas y esto podría correlacionarse con una mayor capacidad saciante. El análisis visual de las micrografías de CLSM pudo correlacionarse con los resultados de permeabilidad, mostrando una red proteica más densa para los yogures E, que tuvieron menor permeabilidad que los yogures T, también correlacionado con una mayor y menor CRA, respectivamente.

La utilización de una muestra de mayor masa para el análisis de viscosidad en condiciones orales respecto a lo presentado en el **Capítulo 2** permitió obtener una aproximación más cercana a la realidad (una cucharada de yogur). Si bien existen otras técnicas para aproximarse aún más a las condiciones orales de procesamiento de los alimentos (por ejemplo, tribología), es importante destacar que el potencial efecto saciante de los yogures ricos en proteínas evaluado en un reómetro convencional en comparación con los de proteína regular y relacionado con otros parámetros estructurales y fisicoquímicos podría considerarse una primera aproximación a un estudio de saciedad en humanos.

A pesar de los buenos resultados obtenidos, sobre todo en el aumento significativo del contenido proteico sin aumentar en gran medida la lactosa final del producto, en los siguientes Capítulos se presentarán formulaciones de yogur con ingredientes en polvo (SMP y WPC35). Si bien estos últimos poseen alto contenido de lactosa, presentan menor costo comercial y mayor disponibilidad, por lo que se empleará otra alternativa para disminuir el contenido de dicho carbohidrato en las formulaciones.

Capítulo 4

Incorporación de fibra de zanahoria y reducción de lactosa en yogures incrementados en proteína

Resumen

En este capítulo, el objetivo fue evaluar el impacto del agregado de un ingrediente de fibra de zanahoria y de una β -galactosidasa comercial con actividad hidrolítica y transgalactosilasa para disminuir el contenido de lactosa y producir galactooligosacáridos (GOS), en los aspectos fisicoquímicos, perfiles de fermentación y de compuestos volátiles, y características estructurales, de yogures incrementados en proteína. Para ello, se elaboraron yogures, a escala laboratorio, con y sin el agregado de la fibra (F, 2 g/100 g) y con y sin el agregado de una β -galactosidasa: deslactosados (D) y con contenido regular de lactosa (R), respectivamente.

En todos los casos se empleó la misma base láctea, formulada con leche UHT, SMP y WPC35, combinados de manera de obtener ~6,5 g/100 g de proteínas y parcialmente descremado (<1,5 g/100 g de grasa). Se analizó la composición global, parámetros fisicoquímicos (pH y acidez titulable), ácido láctico y carbohidratos (lactosa, glucosa, galactosa y GOS), compuestos volátiles, CRA, comportamiento reológico, perfil de textura (firmeza, cohesividad y adhesividad) y microestructura al final del almacenamiento (21 d).

Ninguno de los factores estudiados (fibra y enzima) afectó la evolución de pH durante la fermentación ni la acidez titulable en los yogures. Se observó un incremento en el contenido de sólidos totales y capacidad de retención de agua por el agregado de la fibra. La concentración de lactosa en la formulación fue ~9 g/100 g, y la misma se redujo en un 20% en los yogures R y RF, y en un 80% en los yogures D y DF, debido al empleo de la β -galactosidasa. Además, se detectó la formación de GOS en los yogures D y DF, sustancias reconocidas como prebióticos.

Se detectaron 22 compuestos volátiles característicos de yogur, donde predominaron los ácidos y las cetonas, sin diferencias de tipo cualitativas entre productos, pero sí cuantitativas.

El agregado de la fibra tuvo un impacto significativo en los parámetros reológicos y en el perfil de textura, mientras que la β -galactosidasa no mostró efecto significativo. Se observaron mayores esfuerzos de corte (evaluado a distintas velocidades de corte), y valores de viscosidad (a 50 s⁻¹ de velocidad de corte), firmeza y adhesividad en los productos con fibra. De modo similar, la CRA fue afectada por la presencia de la fibra, alcanzando mayores valores en los yogures RF y DF. La microestructura de los productos reveló diferencias en la red proteica, principalmente dadas por el agregado de fibra, hecho que explicaría los resultados de comportamiento reológico, perfil de textura y capacidad de retención de agua.

La incorporación de este ingrediente de fibra de zanahoria, el incremento proteico y el uso de una β -galactosidasa con capacidad de producir GOS, serían estrategias prometedoras para aumentar las propiedades nutricionales, tecnofuncionales y funcionales del alimento.

1. Materiales y métodos

1.1. Materiales

Los ingredientes lácteos empleados para la elaboración de los yogures fueron leche UHT parcialmente descremada (1,0 g/100 mL de grasa, 3,2 g/100 mL de proteína), SMP (0 g/100 g de grasa, 36 g/100 g de proteína, 50 g/100 g de lactosa) y WPC35 (6 g/100 g de grasa, 35 g/100 g de proteína, 46 g/100 g de lactosa) (Saputo S.A., Argentina). El ingrediente fuente de fibra, fue un polvo de fibra de zanahoria con la siguiente composición y características: 74% de fibra total (20% de fibra soluble y 54% de fibra insoluble), 12% de humedad, y tamaño de partículas < 100 Mesh, producido por el Programa de Valorización, Desarrollo y Escalado de Procesos Agroindustriales (PROVADE, FIQ-UNL). Se emplearon una β -galactosidasa comercial (YNL-2, GODO, Japón), Stevia REB-A 98 (Saporiti S.A., Argentina) y un fermento comercial (YF-L811, Chr. Hansen, Dinamarca).

1.2. Diseño experimental

Los factores estudiados fueron el agregado de fibra (*FI*) en dos niveles (con y sin), y el agregado de β -galactosidasa (*F2*) en dos niveles (con y sin). Se elaboraron, a escala laboratorio, cuatro tipos de yogures empleando la misma formulación láctea: R, RF, D y DF (**Tabla 4.1**). Las elaboraciones se realizaron por triplicado en diferentes días.

Tabla 4.1. Diseño experimental de los yogures.

Parámetros	Yogur			
	R	RF	D	DF
Proteína (g/100 g)	6,5	6,5	6,5	6,5
Relación CN:WP	2:1	2:1	2:1	2:1
Grasa (g/100 g)	1,0	1,0	1,0	1,0
β -galactosidasa	---	---	✓	✓
Fibra de zanahoria	---	✓	---	✓

1.3. Preparación del fermento y dosis del inóculo

La preparación del fermento se realizó de la misma manera que fue detallado en el **Capítulo 1**, apartado **1.4.1**.

1.4. Elaboración de los yogures y análisis

La composición de las formulaciones de yogur se muestra en la **Tabla 4.2**.

Tabla 4.2. Composición de las formulaciones de yogur (g/100 g).

Ingredientes	Yogur			
	R	RF	D	DF
Leche UHT*	✓	✓	✓	✓
SMP (g/100 g)	7,5	7,5	7,5	7,5
WPC35 (g/100 g)	3,5	3,5	3,5	3,5
Fibra de zanahoria (g/100 g)	---	2	---	2
Stevia (g/100 g)	0,01	0,01	0,01	0,01
β -galactosidasa (g/100 g)	---	---	0,03	0,03

*Se agregó el volumen necesario para alcanzar ~500 mL finales.

Se elaboraron yogures a escala laboratorio (~500 mL) siguiendo el protocolo propuesto por Vénica et al. (2020b), con modificaciones. Los ingredientes en polvo (SMP, WPC35 y fibra de zanahoria, según corresponda) fueron incorporados a la leche UHT. En el caso del ingrediente edulcorante Stevia se preparó una solución del endulzante en polvo en agua destilada (0,1 g/mL), y se adicionó a la mezcla un volumen adecuado para alcanzar la concentración propuesta (**Tabla 4.2**). Las mezclas de leche base (LB), preparadas en botellas individuales de 500 mL, fueron almacenadas a 5 °C durante 20 h para asegurar la correcta hidratación de los ingredientes. Luego fueron calentadas en un baño termostático (85 °C/20 min), y enfriadas a 42 °C. Se agregó el fermento (preparado según lo propuesto en el **apartado 1.3**) y la β -galactosidasa (en los yogures D). La fermentación se llevó a cabo a 42 ± 1 °C en baño termostático hasta alcanzar el pH target de $4,75\pm 0,05$. Los yogures se enfriaron rápidamente en baño de hielo y agua hasta ~20 °C, se agitaron manualmente (mediante movimientos envolventes del frasco) y se almacenaron por 21 d a 5 °C.

Se determinó el pH y la acidez titulable (AT) (**TA 1**), y la concentración lactosa en las LB (**TA 9**). Se realizó el seguimiento de pH durante la fermentación. A los 21 d, se determinaron el pH, la AT, la capacidad de retención de agua (CRA, **TA 15**), la concentración de ácido láctico y carbohidratos (**TA 9**), composición global (proteína, grasa, sólidos totales -ST-, cenizas y calcio, -**TA 3, 4, 5, 6 y 7**, respectivamente), perfil de compuestos volátiles (**TA 10**), recuentos microbianos (**TA 11 y 13**) y los análisis estructurales: perfil de textura (TPA, **TA 19**), reometría rotacional CC (**TA 17.1**) y microestructura (**TA 20**). Las muestras para los análisis reológicos y TPA se fraccionaron en contenedores individuales (~40 g para cada análisis) luego de agitar los

yogures, al final de la fermentación. El resto de las muestras se tomaron de la masa total del yogur directamente de la botella de vidrio a los 21 d.

El esquema de muestreo y análisis se muestra en la **Fig. 4.1**.

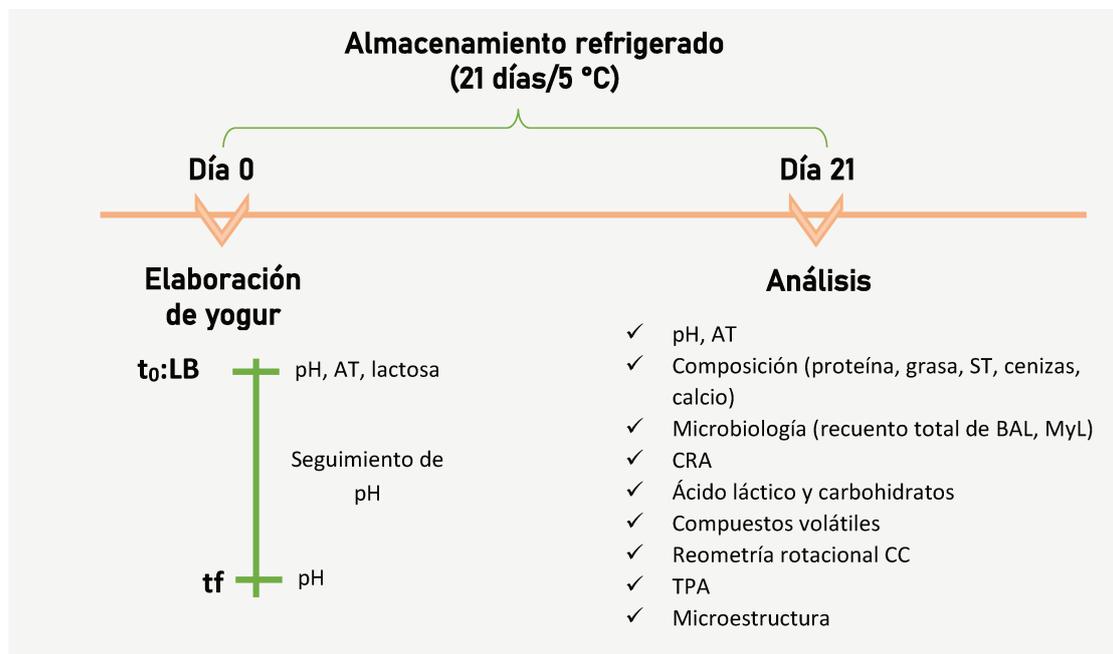


Fig. 4.1. Esquema de muestreo y controles analíticos realizados durante la elaboración y almacenamiento de los yogures.

AT: acidez titulable; ST: sólidos totales; BAL: bacterias lácticas; MyL: mohos y levaduras; CRA: capacidad de retención de agua; CC: cilindros concéntricos; TPA: análisis de perfil de textura.

1.5. Análisis estadístico

Se aplicó ANOVA de dos vías y test de Tukey (nivel de significancia $p < 0,05$) para analizar el efecto de los factores estudiados y su interacción en los parámetros medidos. Se empleó el software Rstudio (R Core Team, 2014).

2. Resultados

2.1. Evolución de la fermentación, composición global, análisis fisicoquímicos y microbiológicos

Las curvas de pH vs. Tiempo de Fermentación (min) se muestran en la **Fig. 4.2**.

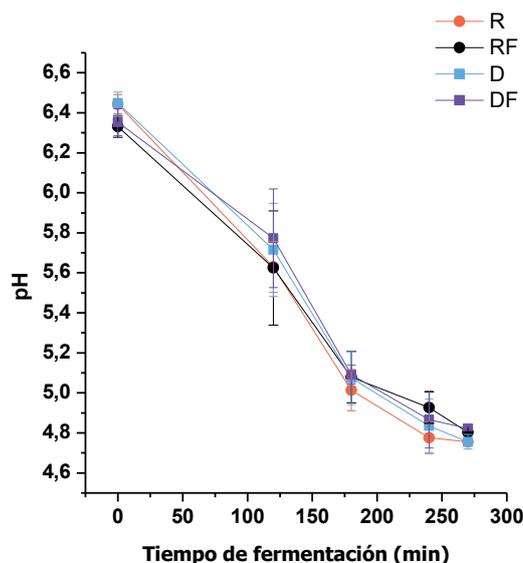


Fig. 4.2. Evolución de pH durante la fermentación de los yogures.

Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de 3 réplicas de elaboración.

Las fermentaciones demoraron ~ 270 min; no se registraron diferencias significativas de pH a lo largo de la fermentación entre los yogures. El tiempo de fermentación fue más prolongado que el observado por Vénica et al. (2020b), en yogures con 4 g/100 g de proteínas (formulados con leche UHT, SMP y WPC35) y 2 g/100 g de fibra de zanahoria. Esto podría deberse al mayor contenido proteico ($\sim 6,3$ g/100 g de proteínas) que, como ya se mencionó previamente, contribuye con una mayor capacidad buffer.

Contrariamente, en un trabajo reciente donde se estudió el uso de fibra soluble de maíz o povidexosa (2,5 g/100 g) en yogures altos en proteína (6,3-7,0 g/100 g de proteínas) formulados con SMP, MPC80 y pectina, los tiempos de fermentación fueron notablemente mayores que los de nuestro trabajo (7 h=420 min), aunque tampoco detectaron diferencias con un control sin fibra, con igual nivel proteico (Gomes et al., 2023).

Por otro lado, Vénica et al. (2014) tampoco reportaron diferencias en los tiempos de fermentación en yogures con 3,3-4,5 g/100 g de proteína, con y sin el agregado de la enzima YNL-2 adicionada junto al fermento y en una dosis similar a la empleada en nuestro trabajo.

Los parámetros fisicoquímicos pH, AT y composición global (proteína, grasa, ST, cenizas y calcio), evaluados a los 21 d de almacenamiento se muestran en la **Tabla 4.3**.

Tabla 4.3. Composición global, pH y AT de los yogures a los 21 d.

Parámetros	Yogur				Factores		
	R	RF	D	DF	F1	F2	F1x F2
pH	4,57±0,06	4,61±0,09	4,57±0,12	4,67±0,07	NS	NS	NS
AT (°D)	139,94±9,50	137,02±8,75	128,57±9,02	131,95±6,54	NS	NS	NS
Proteína (g/100g)	6,35±0,14	6,35±0,22	6,25±0,29	6,21±0,12	NS	NS	NS
Grasa (g/100g)	1,05±0,12	1,21±0,09	1,13±0,18	1,21±0,10	NS	NS	NS
Cenizas (g/100g)	1,51±0,05	1,54±0,04	1,49±0,04	1,52±0,02	NS	NS	NS
ST (g/100g)	19,06±0,14 ^b	19,81±0,26 ^a	18,84±0,25 ^b	19,83±0,54 ^a	*	NS	NS
Calcio (mg/100g)	192,29±4,28	190,55±7,79	185,28±7,74	182,76±15,02	NS	NS	NS

Los resultados se expresan como el valor medio ± desviación estándar de 3 réplicas de elaboración.

AT: acidez titulable; ST: sólidos totales.

F1: fibra; **F2**: enzima; **F1x F2**: interacción entre factores.

Las diferencias significativas se indican con * en la columna del factor que corresponda (p<0,05).

Las diferencias estadísticas se indican con letras minúsculas (**F1**), letras griegas (**F2**) y letras mayúsculas (**F1x F2**).

NS: no significativo (p>0,05).

No se hallaron diferencias significativas para el pH, que tuvo valores de 4,6-4,7, ni para la AT que presentó valores menores a 150 °D en todos los yogures, cumpliendo con los requerimientos del CAA (CAA, 2006). A nivel composicional, solo se encontraron diferencias significativas en los ST, que fueron mayores en los yogures con fibra de zanahoria RF y DF, con valores de ~19,8 g/100 g, mientras que en R y D fueron de ~19,0 g/100 g. El nivel proteico fue elevado (~6,3 g/100 g) y el nivel de grasa fue bajo (~1,15 g/100 g), encuadrándose como leches fermentadas concentradas (FAO/OMS, 2011a) y parcialmente descremadas (CAA, 2006). Las cenizas tuvieron niveles de 1,5 g/100 g y el calcio fue de ~180-190 mg/100 g.

En la **Fig. 4.3** se muestra la CRA en los yogures a los 21 d.

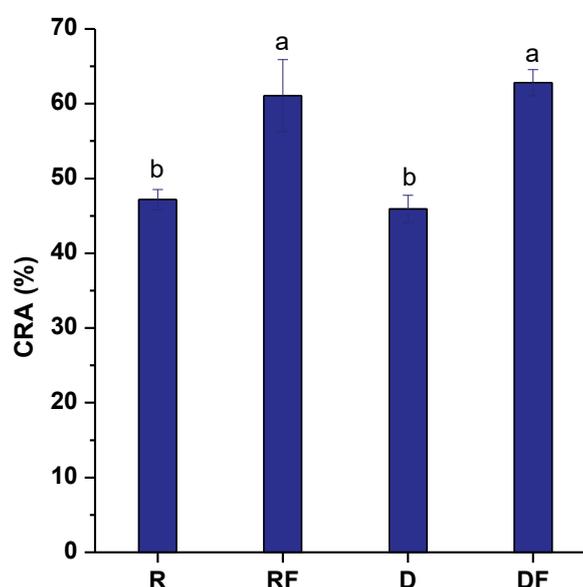


Fig. 4.3. Niveles de CRA (%) de los yogures (21 d).

Los resultados se expresan como valores medios \pm desviación estándar de 3 réplicas de elaboración. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas por *F1* ($p < 0,05$).

Como era esperable, la CRA fue afectada por *F1*, teniendo mayores valores en los yogures con fibra de zanahoria (RF y DF), mientras que *F2* no tuvo un efecto significativo en este parámetro. En los yogures RF y DF se alcanzaron valores de ~60% mientras que en R y D fue de ~45%. Se ha reportado que las fibras de vegetales poseen una capacidad de retención de agua del 7,1-18,9% (He et al., 2022). Esta propiedad de las fibras explica su efecto beneficioso para la salud intestinal: al absorber agua, generan un efecto lubricante en el intestino grueso, promoviendo el peristaltismo y facilitando la motilidad (Chao et al., 2008). Otro efecto importante de la fibra en relación a la absorción de agua es su aumento de volumen en el tracto digestivo, lo que contribuye a la saciedad por los mecanismos mencionados previamente (Lambert et al., 2017).

Un comportamiento similar fue observado por Vénica et al. (2020b). La CRA en un yogur con menor contenido proteico (4 g/100 g) y con fibra de zanahoria (2 g/100 g) presentó valores similares a los observados en nuestro trabajo (58%) y un yogur sin fibra también mostró un menor nivel de CRA (49%). Bakirci et al. (2017) también reportaron un efecto similar en yogures con 4,9 g/100 g de proteína y 1,5 g/100 g de fibra de zapallo, donde el nivel de CRA a los 14 d fue 59% y 43% en un control sin la fibra.

El recuento de BAL totales a los 21 d arrojó valores de $9,17 \pm 0,09$, $8,17 \pm 0,05$, $8,24 \pm 0,06$ y $8,14 \pm 0,09$ log ufc/g para R, RF, D y DF, respectivamente. No se detectaron mohos y levaduras en los yogures (<1 log ufc/g).

2.2. Ácido láctico y carbohidratos de las leches base y de los yogures

Las concentraciones de lactosa en las LB, y de ácido láctico, lactosa, glucosa, galactosa y galactooligosacáridos (GOS) en los yogures (21 d), se muestran en la **Tabla 4.4**.

La concentración de lactosa no tuvo diferencias significativas entre las LB. Las mismas alcanzaron valores de ~ 9 g/100 g. Estos valores son similares a los de las LB presentadas en el **Capítulo 1**, ya que la formulación láctea fue similar al yogur W2 de dicho capítulo.

Similares concentraciones de ácido láctico fueron registradas en los yogures a los 21 d, alcanzándose niveles de 1200-1400 mg/100 g. Todos los carbohidratos detectados presentaron diferencias significativas entre los yogures, y en todos los casos las diferencias se debieron al uso de la β -galactosidasa (*F2*). Como era esperable, los niveles de lactosa en los yogures D y DF fueron significativamente menores a los de los yogures R y RF. En los yogures D y DF, se alcanzó una reducción mayor al 80% (nivel final de $\sim 1,5$ g/100 g), mientras que en los R y RF la disminución de lactosa fue del 28% (nivel final de $\sim 6,7$ g/100 g). Los niveles de glucosa y de galactosa fueron superiores en los yogures D y DF, que en R y RF, como consecuencia de la reacción hidrolítica de la enzima que al hidrolizar la lactosa libera sus monómeros constituyentes (glucosa y galactosa) al medio.

El uso de la enzima YNL-2 ha sido previamente reportado en la elaboración de yogures con contenido tradicional de proteínas (~ 4 g/100 g) y en yogures altos en proteína (6,6-7,9 g/100 g), alcanzándose, en ambos casos, reducciones del 80% en el contenido de lactosa respecto a la concentración inicial en las respectivas leches base (Vénica et al., 2014; 2024). Como ya se mencionó en capítulos anteriores, el incremento proteico con ingredientes con alta concentración de lactosa (como SMP y WPC35) conduce a altos niveles de lactosa en la leche base, y, por ende, en el yogur, como se observa en este caso en los yogures R y RF. Esto puede resultar perjudicial para personas con trastornos de malabsorción de este carbohidrato. En la actualidad, el uso de β -galactosidasas es una estrategia ampliamente difundida a nivel industrial, en respuesta a la alta demanda de productos reducidos en lactosa por los consumidores (Gallo et al., 2023).

Tabla 4.4. Concentración de lactosa en LB, ácido láctico y carbohidratos en yogur (21 d).

Parámetros	R	RF	D	DF	Factor		
	Leche base				F1	F2	F1xF2
Lactosa (g/100g)	8,98±0,15	9,33±0,13	8,78±0,48	8,97±0,58	NS	NS	NS
Yogur							
Láctico (mg/100g)	1409,12±358,24	1473,88±333,05	1189,26±96,29	1420,49±205,09	NS	NS	NS
Lactosa (g/100g)	6,48±0,27 ^a	6,82±0,40 ^a	1,50±0,17 ^β	1,47±0,16 ^β	NS	*	NS
Glucosa (g/100g)	0,53±0,08 ^β	0,55±0,02 ^β	2,78±0,08 ^a	3,15±0,23 ^a	NS	*	NS
Galactosa (g/100g)	1,29±0,16 ^β	1,32±0,08 ^β	2,80±0,19 ^a	3,16±0,11 ^a	NS	*	NS
GOS (g/100g)	ND	ND	0,97±0,16 ^a	1,05±0,12 ^a	NS	*	NS

Los resultados se expresan como el valor medio ± desviación estándar de 3 réplicas de elaboración.

ND: no detectado.

F1: fibra; **F2**: enzima; **F1xF2**: interacción entre factores.

Las diferencias significativas se indican con * en la columna del factor que corresponda (p<0,05),

Las diferencias estadísticas se indican con letras minúsculas (**F1**), letras griegas (**F2**) y letras mayúsculas (**F1xF2**).

NS: no significativo (p>0,05)

Un aspecto a destacar es la producción de GOS en los yogures D y DF, dada por la actividad de transgalactosilación que presenta la enzima empleada, que ocurre en simultáneo con la hidrólisis de la lactosa durante la fermentación (Deshmukh et al., 2024; Gosling et al., 2010; Vénica et al., 2016). Los GOS son oligosacáridos no digeribles con distintos grados de polimerización, a los que se les ha atribuido un rol prebiótico (promoción de bacterias beneficiosas, en particular bifidobacterias y lactobacilos, inhibición de la adhesión de patógenos y mejoramiento de las funciones de la barrera intestinal) (Ambrogi et al., 2023; Gibson et al., 2017).

2.3. Perfil de compuestos volátiles de los yogures

Se identificaron 21 compuestos pertenecientes a las familias químicas de los aldehídos (3), cetonas (10) y ácidos (8). El perfil de volátiles fue similar desde el punto de vista cualitativo (tipo de compuestos), pero se detectaron diferencias significativas de tipo cuantitativas entre los productos.

Se observó un predominio de los ácidos y las cetonas, representado entre ambos grupos más del 90% del total de compuestos identificados. Se destaca el hecho que RF fue el único yogur donde las cetonas fueron mayoritarias. Los aldehídos constituyeron una fracción minoritaria (entre 4 y 8%). Ninguno de los factores ni su interacción resultaron significativos para los valores porcentuales de los distintos grupos de compuestos (**Fig. 4.4**). Es importante resaltar la variabilidad entre las réplicas de los yogures R, D y DF para el grupo de los ácidos y cetonas, no ocurriendo lo mismo para yogures RF, donde la desviación estándar fue baja. Otro aspecto a destacar es que los yogures R, D y DF presentaron proporciones similares o mayores de los ácidos respecto a las cetonas, lo cual difiere con lo observado para los yogures analizados en el **Capítulo 1 y 2**.

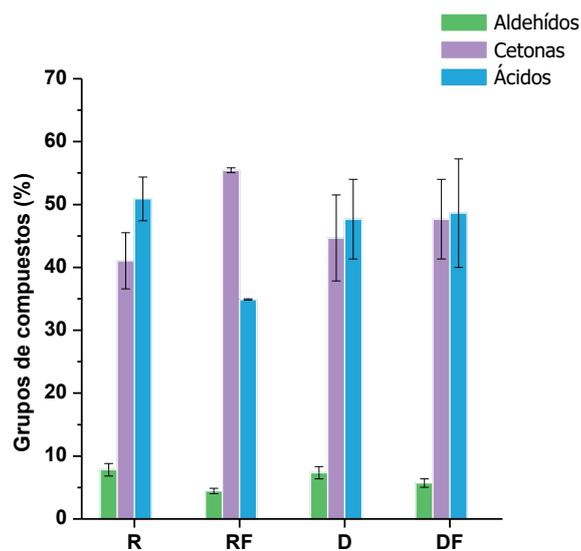


Fig. 4.4. Porcentaje de grupos químicos de compuestos volátiles respecto al área total en los yogures (21 d).

Los resultados se expresan como valores medios \pm desviación estándar de 3 réplicas de elaboración.

Los compuestos volátiles identificados en los yogures se muestran en la **Tabla 4.5**.

Tabla 4.5. Compuestos volátiles (valores de áreas en unidades arbitrarias x 1000) de los yogures (21 d).

Compuestos	Yogur				Factores		
	R	RF	D	DF	F1	F2	F1xF2
<i>Aldehídos</i>							
Acetaldehído	176±37 ^a	109±28 ^b	177±17 ^a	132±16 ^b	*	NS	NS
Benzaldehído	30±10	27±2	32±9	36±10	NS	NS	NS
Nonanal	8±1 ^{bβ}	13±2 ^{aβ}	12±1 ^{bα}	14±2 ^{aα}	*	*	NS
<i>Cetonas</i>							
2-propanona	193±41	159±39	179±20	138±5	NS	NS	NS
2-butanona	88±12 ^a	55±9 ^b	87±13 ^a	62±9 ^b	*	NS	NS
2-pentanona	33±6 ^a	21±8 ^b	37±5 ^a	26±7 ^b	*	NS	NS
2,3-pentanodiona	86±15 ^{bβ}	177±8 ^{aβ}	137±14 ^{bα}	239±19 ^{aα}	*	*	NS
2-hexanona	17±4 ^β	22±5 ^β	39±14 ^a	27±2 ^a	NS	*	NS
2-heptanona	98±2 ^A	78±1 ^B	228±7 ^A	101±3 ^A	*	*	*
2-nonanona	30±1 ^{bβ}	36±1 ^{aβ}	45±2 ^{bα}	47±3 ^{aα}	*	*	NS
2-undecanona	14±1	15±4	14±4	17±5	NS	NS	NS
Acetoína	391±39	423±35	431±72	445±37	NS	NS	NS
Diacetilo	248±47 ^B	639±53 ^A	299±30 ^B	379±56 ^B	*	*	*
<i>Ácidos</i>							
Acético	82±4	85±3	79±7	91±6	NS	NS	NS
Butanoico	216±6 ^a	182±1 ^b	215±18 ^a	185±11 ^b	*	NS	NS
Hexanoico	584±40	451±8	595±52	509±11	NS	NS	NS
Heptanoico	10±0.2 ^β	10±1 ^β	11±1 ^α	11±1 ^α	NS	*	NS
Octanoico	377±12	348±49	404±12	366±44	NS	NS	NS
Nonanoico	13±2 ^{aβ}	8±1 ^{bβ}	18±1 ^{aα}	14±1 ^{bα}	*	*	NS
Decanoico	127±2	127±8	125±11	124±3	NS	NS	NS
Dodecanoico	21±2	21±1	20±1	22±2	NS	NS	NS

Los resultados se expresan como el valor medio ± desviación estándar de 3 réplicas de elaboración.

F1: fibra; **F2:** enzima; **F1xF2:** interacción entre factores.

Las diferencias significativas se indican con * en la columna del factor que corresponda ($p < 0,05$),

Las diferencias estadísticas se indican con letras minúsculas (**F1**), letras griegas (**F2**) y letras mayúsculas (**F1xF2**).

NS: no significativo ($p > 0,05$)

Un total de 12 compuestos fueron afectados por la adición de la fibra o de la enzima.

Dentro de la fracción ácida se identificaron mayoritariamente ácidos grasos de cadena lineal y número par de átomos de C, siendo los más abundantes (teniendo en cuenta las áreas de los picos) el hexanoico, octanoico y butanoico. Con excepción del ácido butanoico y de los ácidos de cadena lineal y número impar de átomos de C (heptanoico y nonanoico), los niveles de los restantes compuestos no fueron afectados significativamente por el agregado de la fibra ni de la enzima, ni tampoco por la interacción de estos factores. La producción de ácido butanoico solo fue afectada por *F1*, resultando mayor en los productos sin fibra.

El grupo de las cetonas se caracterizó por la presencia de metilcetonas (C3 a C11), dicetonas (diacetilo y 2,3-pentanodiona) y una hidroxiketona (acetoína). Desde el punto de vista cuantitativo, el diacetilo y la acetoína resultaron mayoritarios, seguido de la 2-propanona y la 2,3-pentanodiona. Es importante notar que el yogur RF fue el único en que el contenido de diacetilo fue mayor al de la acetoína. Compuestos como el diacetilo y la 2-heptanona fueron afectados por *F1* y *F2*, siendo significativa la interacción entre factores. El diacetilo presentó mayores niveles en el yogur RF. En el caso de la 2-heptanona mayores valores de áreas fueron encontrados en los yogures D y DF. La producción de 2-propanona, 2-undecanona y acetoína no fue afectada significativamente por ningún factor ni por su interacción. Tanto la presencia de la fibra como de la enzima impactaron significativamente en las cantidades producidas de 2,3-pentanodiona y de 2-nonanona, sin observarse interacción de los factores. Para el caso de la 2,3-pentanodiona, un compuesto relevante en el *flavor* del yogur, los niveles fueron mayores en el producto con la fibra y con la β -galactosidasa (DF).

Dentro de los aldehídos se identificaron el acetaldehído, el nonanal y el benzaldehído. En todos los yogures, el acetaldehído resultó mayoritario. El agregado de la fibra influyó en su producción, siendo mayor en las versiones sin adición de fibra (R y D). El contenido de benzaldehído resultó similar en todos los yogures, en tanto que el nivel de nonanal resultó afectado significativamente por los dos factores, pero no por su interacción, siendo mayor en los productos con fibra y deslactosados.

Estudios sobre el efecto simultáneo de la reducción de la lactosa y la presencia de fibra en el perfil de compuestos volátiles de yogures incrementados en proteína no se encuentran reportados. Nuestro grupo de investigación ha profundizado en el impacto que tiene la reducción de lactosa (por adición de β -galactosidasa) en la fracción volátil de yogures elaborados a partir de distintas formulaciones de leches base y distintos fermentos. Wolf et al. (2015) reportaron incrementos de algunos compuestos carbonílicos (acetaldehído y dicetonas) durante el almacenamiento de yogures hidrolizados con β -galactosidasa en comparación a los controles sin enzima, lo cual se asoció a mayores niveles de glucosa en dichos productos. Vénica et al. (2016) prepararon distintas formulaciones de leches base (con distintos niveles de grasa, con/sin adición de inulina y con/sin la adición de un cultivo probiótico), estudiándose el efecto de la adición o no de la β -galactosidasa.

Se observó que para la mayoría de las formulaciones de la leche base los productos deslactosados tuvieron proporciones similares de ácidos y cetonas, hecho también observado en esta tesis.

Respecto al impacto del agregado de fibra en la fracción volátil, la mayoría de los trabajos se enfocan en los aspectos sensoriales, en particular el *flavor* y la textura. Staffolo et al. (2004) reportaron que la adición de distintas fibras a yogures resultó en productos con características aceptables para los consumidores, entre ellas el *flavor*. Del mismo modo, Dabija et al. (2017, 2018) estudiaron diferentes niveles de agregado de distintas fibras (de avena, de arveja, de trigo e inulina, entre 1 y 2,5 g/100 g) en yogur tradicional (3 g/100 g de proteína), encontrando que la proporción de adición de fibra afectó la aceptabilidad de los consumidores. Otros estudios de yogures enriquecidos en fibras han indicado que estos productos fueron percibidos como menos cremosos, con *flavor* extraño y cierta granulosis (Vénica et al., 2020b).

Los resultados de este trabajo revelan que un total de 12 compuestos fueron afectados por la adición de la fibra y/o de la enzima, indicando que los factores estudiados intervinieron en alguna medida en la actividad bioquímica del fermento, produciendo un cambio en los sustratos disponibles. Importantes compuestos como el acetaldehído y el diacetilo, considerados claves en el *flavor*, y otros compuestos carbonílicos tales como 2-butanona, 2,3-pentanodiona, 2-heptanona y nonanal, que contribuyen al perfil aromático de los yogures presentaron diferencias entre los productos, y esto podría impactar en las características sensoriales de los mismos, aunque los grupos químicos de compuestos volátiles no se diferenciaron entre yogures.

2.4. Comportamiento reológico, perfil de textura y microestructura de los yogures

Las curvas de Esfuerzo de Corte (τ , Pa) vs. Velocidad de Corte (s^{-1}) y de Viscosidad Aparente (η_a , Pa.s) vs. Esfuerzo de corte (s^{-1}), se muestran en las **Fig. 4.5a** y **4.5b**, respectivamente.

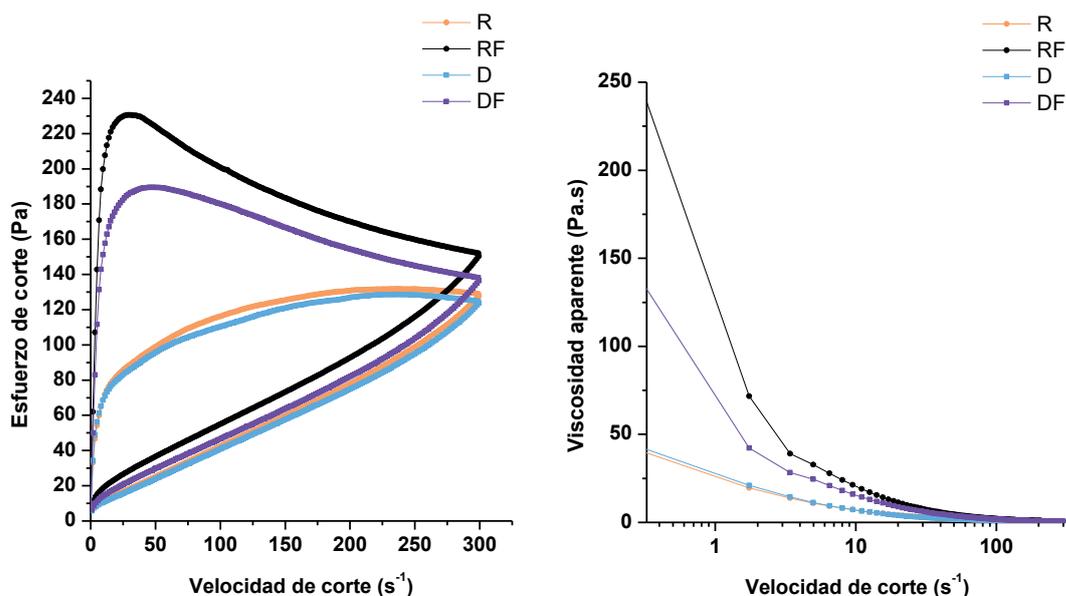


Fig. 4.5. a. Curvas de Esfuerzo de Corte (Pa) vs. Velocidad de Corte (s⁻¹) de los yogures (21 d).
b. Curvas de Viscosidad Aparente (Pa.s) vs. Esfuerzo de corte (s⁻¹) de los yogures (21 d).
 Los resultados se expresan como el valor medio de 3 réplicas de elaboración.

Algunos valores de esfuerzo de corte (a velocidad de corte de 50, 150 y 300 s⁻¹) y de viscosidad aparente (a velocidad de corte de 50 s⁻¹) fueron extraídos de las respectivas curvas, y se muestran en la **Tabla 4.6**.

Tabla 4.6. Valores de esfuerzo de corte (a velocidad de corte de 50, 150 y 300 s⁻¹) y de viscosidad aparente (a velocidad de corte de 50 s⁻¹) de los yogures (21 d).

Parámetros	Yogur				Factores		
	R	RF	D	DF	F1	F2	F1x F2
τ (50 s ⁻¹) (Pa)	98,88±4,85 ^b	223,97±39,47 ^a	95,60±6,07 ^b	189,33±27,43 ^a	*	NS	NS
τ (150 s ⁻¹) (Pa)	125,47±3,51 ^b	183,33±20,85 ^a	120,93±8,34 ^b	166,50±17,43 ^a	*	NS	NS
τ (300 s ⁻¹) (Pa)	128,50±7,04 ^b	151,51±16,70 ^a	124,83±7,01 ^b	138,10±12,83 ^a	*	NS	NS
η_a (50 s ⁻¹) (Pa.s)	1,97±0,10 ^b	4,47±0,79 ^a	1,75±0,35 ^b	3,78±0,55 ^a	*	NS	NS

Los resultados se expresan como el valor medio ± desviación estándar de 3 réplicas de elaboración.

τ : esfuerzo de corte; η_a : viscosidad aparente.

F1: fibra; **F2**: enzima; **F1x F2**: interacción entre factores.

Las diferencias significativas se indican con * en la columna del factor que corresponda (p<0,05),

Letras minúsculas distintas en una fila indican diferencias significativas por **F1**.

NS: no significativo (p>0,05)

El factor fibra mostró un efecto significativo entre los yogures en todos los parámetros extraídos, mientras que ni el agregado de la enzima, ni la interacción entre factores, tuvo impacto significativo en los parámetros.

Independientemente de la velocidad de corte, se hallaron mayores valores de esfuerzo de corte para los yogures con fibra de zanahoria en la curva ascendente (0-300 s⁻¹). Se puede observar en las curvas (**Fig. 4.5a**) que el esfuerzo de corte aumentó durante todo el ciclo de deformación a velocidad de corte creciente (0-300 s⁻¹) para los yogures R y D, mientras que para los yogures con fibra de zanahoria (RF y DF) el esfuerzo de corte aumentó abruptamente hasta ~50 s⁻¹ de velocidad de corte, y luego descendió progresivamente al aumentar la velocidad de corte. Podría interpretarse que a baja velocidad de corte (hasta 50 s⁻¹) la fibra de zanahoria produjo un gel más fuerte (indicado por los mayores esfuerzos de corte hasta ese punto), mientras que al aumentar la deformación (mayor velocidad de corte y mayor tiempo de deformación) el gel se debilita, posiblemente por un desplazamiento de las partículas de fibra de su ubicación original en el mismo, alcanzando valores de esfuerzo de corte similares a los observados para los yogures sin fibra. Este comportamiento fue distinto al reportado por Vénica et al. (2020b) quienes para un yogur con contenido tradicional de proteína y con 2 g/100 g de fibra de zanahoria, obtuvieron curvas de Esfuerzo de Corte vs. Velocidad de Corte similares a la de un yogur sin fibra. Por lo tanto, se puede hipotetizar que las características observadas en nuestro trabajo podrían atribuirse al efecto combinado del alto contenido proteico y la adición de la fibra de zanahoria, o tal vez a las características propias del ingrediente de fibra empleado en cada caso.

Los mayores valores de esfuerzo de corte de los yogures RF y DF a 50 s⁻¹ resulta de interés, ya que, como se mencionó previamente, esta es la velocidad de corte aproximada que se alcanza en la boca durante la masticación, indicando que se requiere un mayor esfuerzo para procesar el alimento y esto podría impactar positivamente en la saciedad otorgada por estos alimentos.

Los valores de viscosidad aparente a 50 s⁻¹ de velocidad de corte también fueron mayores en los yogures RF y DF que en los yogures R y D (**Tabla 4.6**). Este comportamiento coincide con lo observado por Bakirci et al. (2017) en yogures con 1,5 g/100 g de fibra de zapallo y ~5 g/100 g de proteína, que tuvieron mayor viscosidad (evaluada a 20 rpm) que un control sin fibra. Contrariamente, el uso de 2,5 g/100 g de fibras solubles de maíz o povidona en yogures altos en proteína (~7 g/100 g) no mostró diferencias en la viscosidad aparente de los productos luego del almacenamiento (30 y 45 d), respecto a un control sin fibra (Gomes et al., 2023).

De manera similar, también se observaron diferencias significativas en los parámetros firmeza y adhesividad, obtenidos por TPA, dadas por el factor fibra. Sin embargo, no se registraron diferencias significativas por ningún factor para la cohesividad (**Fig. 4.6**).

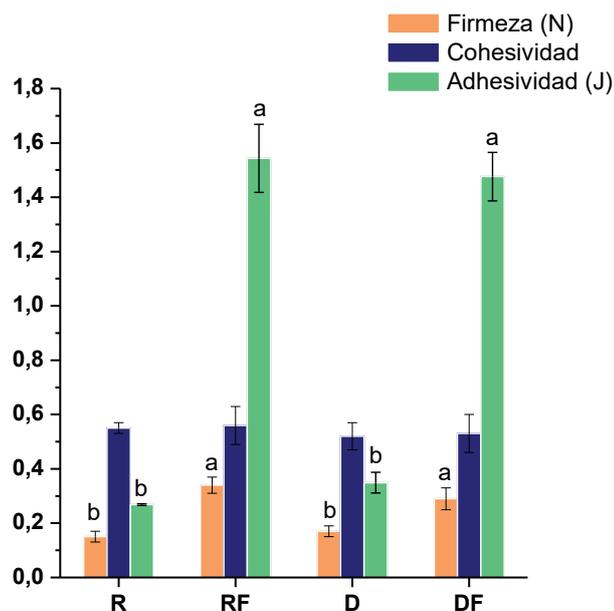


Fig. 4.6. Parámetros de TPA: firmeza (N), cohesividad (adimensional) y adhesividad (J) de los yogures (21 d).

Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de 3 réplicas de elaboración. Letras distintas para el mismo parámetro indican diferencias significativas entre yogures ($p < 0,05$).

Otros autores también encontraron mayores valores de firmeza en yogures (3 g/100 g de proteínas) con el agregado de 2 g/100 g de partículas de pared celular de zanahoria respecto a un control sin este ingrediente (McCann et al., 2011). En el estudio mencionado se observó (mediante CLSM) que el ingrediente de zanahoria no interfiere en la red proteica, si no que se ubica inmerso en la misma, rodeado de proteínas. Esto podría explicar que no se hayan detectado diferencias en la cohesividad de los yogures con y sin fibra de zanahoria, es decir, la interconexión de la red no se vería interrumpida por la fibra y, por lo tanto, la cohesividad (explicada como la relación intra-partículas) no se afectaría. De manera similar, la cohesividad de yogures (3,75 g/100 g de proteína) con agregado de fibra de dátiles (1,5; 3 y 4,5 g/100 g) no mostró diferencias con un control de igual nivel proteico sin adición de la fibra. Además, la firmeza y la adhesividad en los yogures con 3 y 4,5 g/100 g de fibra de dátiles fueron mayores que en el control (Hashim et al., 2009). Un aumento en la firmeza y en la cohesividad fue observado por Güler-Akın et al. (2018) al agregar un ingrediente de fibras de celulosa (2 g/100 g) en yogures (~3,75 g/100 g de proteínas) en comparación a un control sin fibras, aunque la adhesividad disminuyó respecto a dicho control.

Estos resultados ponen de manifiesto que el efecto del uso de fibras en la reología y textura del yogur es dependiente de las características propias del ingrediente fuente de fibra y de la matriz láctea.

En la **Fig. 4.7** se muestran las micrografías de CLSM de los yogures R, RF, D y DF (21 d).

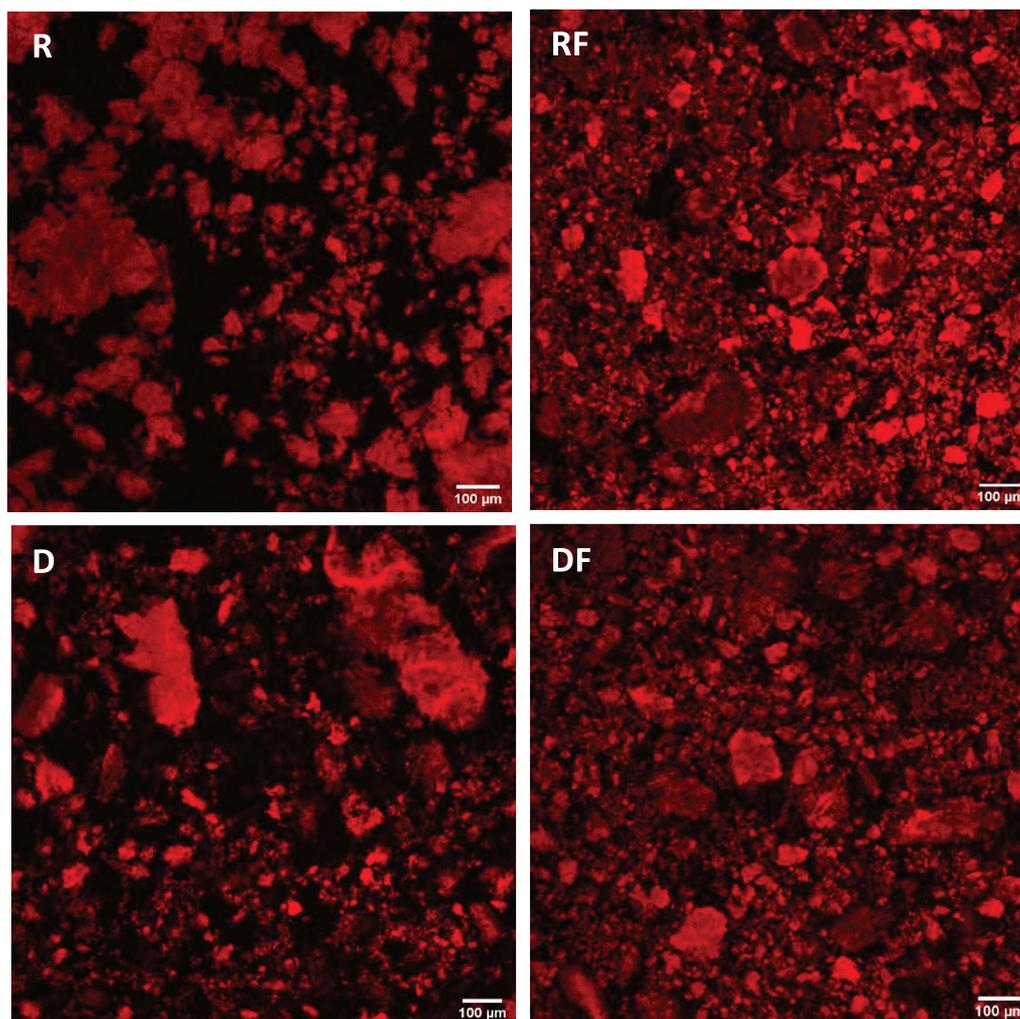


Fig. 4.7. Micrografías de CLSM de los yogures (21 d).

En rojo se observan los agregados proteicos y en negro las regiones correspondientes a los poros de la estructura.

Se pueden apreciar algunas diferencias en los yogures con fibra de zanahoria respecto a sus análogos sin la fibra. Se puede detectar una mayor cantidad de agregados proteicos en los yogures RF y DF, de diferentes tamaños y más cercanos entre ellos que en las microestructuras de R y D. El comportamiento observado en nuestro trabajo puede relacionarse con lo reportado por McCann et al. (2011). Como se mencionó previamente, en dicho estudio se empleó un ingrediente de zanahoria (partículas de la pared celular), y se halló que el ingrediente se encontraba rodeado por proteínas y formando parte de la red proteica, sin interferir en la misma (McCann et al., 2011). A pesar de que en nuestro trabajo no podemos distinguir las partículas de fibra de zanahoria, podemos hipotetizar, a partir de las imágenes y de los resultados de CRA, reología y TPA, que la fibra podría ubicarse en los poros de la red proteica, absorbiendo y reteniendo parte del suero. Bakirci et al. (2017) arribaron a una conclusión similar respecto a la ubicación de fibra de zapallo en yogures al observar la microestructura mediante SEM: la fibra se encontraba inserta entre los

agregados proteicos, formando estructuras fibrosas y disminuyendo el número y tamaño de los poros.

Por otro lado, no se observan diferencias notables por el uso de β -galactosidasa en la microestructura de los yogures, como tampoco se detectó un efecto significativo de este factor en los parámetros reológicos o del perfil de textura de los mismos.

3. Conclusiones

Se obtuvieron yogures incrementados en proteína (6,3 g/100 g), parcialmente descremados (<1,5 g/100 g), sin y con agregado de fibra de zanahoria (2 g/100 g), con contenido regular y reducido de lactosa (6,5 y 1,5 g/100 g, respectivamente). Adicionalmente, la β -galactosidasa empleada permitió la producción de GOS en simultáneo con la fermentación en cantidades similares a las reportadas previamente (~1 g/100 g). No se hallaron diferencias en el pH ni en la AT de los yogures a los 21 d, y la única diferencia composicional se observó en los ST (siendo mayores en los yogures con fibra de zanahoria). El ácido láctico fue similar en todos los yogures (1200-1400 mg/100 g).

El perfil de compuestos volátiles no presentó diferencias cualitativas, detectándose en todos los casos los mismos compuestos. Algunas diferencias cuantitativas, asociadas a la presencia de fibra y/o de la enzima fueron observadas. Los compuestos más característicos del perfil aromático de yogur mostraron diferencias entre los productos, destacándose un mayor contenido de acetaldehído en los yogures sin fibra, y de diacetilo en el yogur RF. También se hallaron diferencias en algunas cetonas (2-butanona, 2,3-pentanodiona y 2-heptanona) y en el aldehído nonanal por los factores estudiados.

Se encontraron diferencias en el comportamiento reológico, perfil de textura y CRA de los yogures dados por el efecto de la fibra, mientras que la inclusión de β -galactosidasa no afectó estos parámetros. Las curvas de Esfuerzo de Corte vs. Velocidad de Corte, y las de Viscosidad Aparente vs. Velocidad de Corte mostraron mayores valores en los yogures con fibras hasta 50 s⁻¹ de velocidad de corte. El comportamiento reológico diferencial observado para los yogures con fibra podría resultar de interés para incrementar la capacidad saciante del producto. La CRA fue mayor en los yogures con fibra, atribuido a la capacidad de retención de agua propia de las fibras vegetales. También se encontraron diferencias, dadas por la incorporación de fibra, en los parámetros firmeza y adhesividad, mientras que la cohesividad fue similar en todos los productos.

Se observaron diferencias en la microestructura de los yogures por el agregado de fibra de zanahoria, y sin efecto aparente del uso de la β -galactosidasa. A partir de las micrografías y de los resultados de TPA, CRA y reología, se puede pensar que las partículas de fibra se encuentran ubicadas en los espacios intersticiales, absorbiendo parte del suero, y rodeadas por agregados proteicos.

Según nuestro conocimiento, no hay trabajos que hayan evaluado la incorporación de un ingrediente de fibra de zanahoria, la hidrólisis de lactosa y la generación in situ de GOS en yogur alto en proteínas, constituyendo un alimento de interés para la salud gastrointestinal y el aumento de la saciedad.

A partir de los resultados del uso de la β -galactosidasa en yogur incrementado en proteínas, formulado a partir de polvos lácteos con alto contenido de lactosa (SMP y WPC35), se comprobó la posibilidad de obtener un yogur con bajo contenido de este carbohidrato, a pesar de la elevada concentración en la leche base. Esta estrategia será implementada en el próximo capítulo para validar la elaboración de esta formulación de yogur a escala piloto (40 L).

Capítulo 5

Evaluación del cambio de escala en la elaboración de un yogur incrementado en proteínas

Resumen

En este capítulo, el objetivo fue validar los resultados observados en los yogures, obtenidos a escala laboratorio, en elaboraciones de yogur a escala piloto (40 L). La finalidad del escalado fue elaborar el producto en cantidades suficientes para realizar, posteriormente, un estudio clínico en humanos (**Capítulo 6**), evaluando los posibles cambios en los aspectos microbiológicos, fisicoquímicos y estructurales de los yogures que podrían darse por el cambio de escala respecto a la preparación en el laboratorio.

Se seleccionó una de las formulaciones de yogur incrementados en proteínas, y reducido en lactosa y en contenido graso, que se ensayó en el **Capítulo 4** (yogur D). Esta formulación se preparó con leche parcialmente descremada, leche en polvo descremada (SMP) y concentrado de proteínas de suero al 35% (WPC35), y se agregó β -galactosidasa para reducir el contenido de lactosa y promover la formación de GOS. Dicha selección se hizo teniendo en cuenta el costo de los ingredientes y la disponibilidad de los mismos en nuestro país, como así también la mejora del perfil nutritivo y el incremento de funcionalidad dado por la presencia de GOS, y la reducción de lactosa, ya que este yogur se destinó, como se verá en el **Capítulo 6**, a un estudio de funcionalidad en humanos. Además, se incorporó un edulcorante natural no nutritivo (Stevia) para incrementar el sabor dulce y mejorar la aceptabilidad del producto. Luego de 21 d de almacenamiento, se analizaron los parámetros fisicoquímicos (pH, acidez titulable), la composición global, los perfiles de ácidos orgánicos, carbohidratos, y compuestos volátiles, microbiología (recuentos diferenciados de bacterias lácticas, coliformes, mohos y levaduras), el comportamiento reológico y la microestructura. Los resultados fueron comparados con los obtenidos a escala laboratorio. Además, los yogures a escala piloto fueron analizados sensorialmente con un panel entrenado y se realizó un estudio de aceptabilidad con consumidores.

El nivel proteico alcanzado en el yogur elaborado a escala piloto fue $\sim 6,3$ g/100 g, y el contenido de grasa de $\sim 1,50$ g/100 g, siendo este último valor ligeramente mayor al obtenido a escala laboratorio. La reducción de lactosa fue $>80\%$, siendo la concentración final de este azúcar de 1,70 g/100 g. De los ácidos orgánicos analizados, solo se encontró una ligera diferencia en el ácido láctico, aunque no se observó un impacto del cambio de escala en la acidez titulable. Algunos compuestos volátiles (aldehídos y ésteres) mostraron diferencias entre el yogur elaborado a escala laboratorio y el elaborado a escala piloto, lo que podría asociarse al ligeramente mayor nivel graso y un probable deterioro oxidativo de los ácidos en el yogur elaborado a escala piloto. Se observaron diferencias en la capacidad de retención de agua y en la microestructura. Las diferencias encontradas en los productos obtenidos en ambas escalas podrían asociarse a las diferencias en las etapas de enfriamiento y agitación inherentes al cambio de escala. A pesar de ello, las características del yogur obtenido a escala piloto fueron satisfactorias. Mediante un análisis sensorial con panel entrenado se les asignaron puntuaciones elevadas a los atributos de brillo, consistencia, uniformidad, cremosidad, gusto ácido y sabor a crema del yogur. El análisis

sensorial de aceptabilidad por parte de los consumidores denotó un nivel de agrado satisfactorio y una alta intención de compra.

1. Materiales y métodos

1.1. Materiales

Se emplearon leche pasteurizada parcialmente descremada (1,2 g/100 mL de grasa, 3,2 g/100 mL de proteína), SMP (36 g/100 g de proteína, 0 g/100 g de grasa) y WPC35 (35 g/100 g de proteína, 6 g/100 g de grasa) (Milkaut S.A., Argentina), Stevia REB-A 98 (Saporiti S.A., Argentina) y la β -galactosidasa comercial (YNL-2, GODO, Japón). El fermento utilizado fue YF-L811 (Chr. Hansen, Dinamarca). Los envases plásticos (capacidad de 200 g) con tapa de aluminio termo-sellable fueron provistos por Frecicar S.R.L. (Argentina).

1.2. Diseño experimental

La formulación del yogur denominada 'D' en el **Capítulo 4**, con 6,3 g/100 g de proteína, fue la seleccionada para realizar las experiencias de escalado; el mismo fue renombrado 'L' en este Capítulo. Las elaboraciones a escala piloto se realizaron en las instalaciones de la Escuela Técnica N° 298 Miguel Manfredi (Franck, Santa Fe, Argentina). Tres réplicas de elaboración fueron llevadas a cabo en diferentes días (una por semana). El producto obtenido se nombró P. El protocolo de elaboración escala piloto y los análisis realizados se indican a continuación.

1.3. Preparación del fermento y dosis del inóculo

De manera similar a lo planteado en el apartado **1.4.1** del **Capítulo 1**, la preparación del fermento se realizó acorde a la dosis recomendada por el fabricante (0,2 U/L) pero se recalcularon las cantidades necesarias para una mayor escala. Para esto, 2,2 g del fermento (equivalente a 11 U), se disolvió en 100 mL de leche estéril a ~40 °C durante 20 min antes de la inoculación. Esta preparación (100 mL) se inoculó en 40 L de leche base (11 U/40 L \equiv 0,27 U/L).

1.4. Elaboración de los yogures a escala piloto y análisis

La composición de la formulación se muestra en la **Tabla 5.1**.

Tabla 5.1. Composición de la formulación de yogur elaborado a escala piloto (P).

Ingredientes	Yogur
	P
SMP (g/100 g)	7,5
WPC35 (g/100 g)	3,5
Leche pasteurizada parcialmente descremada*	✓
Stevia (g/100 g)	0,01
β -galactosidasa (g/100 g)	0,03

*Se agregó el volumen necesario para alcanzar ~40 L.

La tecnología de elaboración se adaptó, respecto a lo realizado a escala laboratorio, de acuerdo a los equipos y elementos disponibles.

Las instalaciones de la Escuela contaban con un fermentador con camisa (capacidad de 50 L), calentamiento con vapor, agitador mecánico de hélice para productos con baja viscosidad y cámara refrigerada (10 °C). Los ingredientes en polvo (SMP y WPC35) se pesaron y se mezclaron con la leche utilizando el agitador mecánico. La mezcla se dejó reposar en refrigeración (10 °C/20 h) para asegurar la completa hidratación e incorporación de los ingredientes en polvo. La mezcla (leche base, LB) fue tratada térmicamente a 85 °C/20 min con agitación mecánica. Luego, se hizo circular agua fría por la camisa hasta alcanzar la temperatura de fermentación (42 °C). Se incorporaron, simultáneamente, la Stevia, la β -galactosidasa y el fermento. La fermentación transcurrió hasta alcanzar pH=4,9±0,1. Esta diferencia en el pH target para detener la fermentación respecto a las elaboraciones a escala laboratorio se debió a la falta de equipamiento para enfriar el producto al final de la fermentación, ya que solo se disponía de agua corriente (~20 °C) que se hizo circular por la camisa del fermentador, pero esto no era suficiente para detener el proceso rápidamente. Por lo tanto, se hizo un primer enfriamiento de esta manera y luego se trasladó el fermentador conteniendo el yogur a la cámara (10 °C). Una vez que la temperatura del producto alcanzó 20-25 °C, el yogur se agitó manualmente con un agitador de disco perforado, con movimientos ascendentes/descendentes enérgicos, hasta lograr la textura deseada. El yogur se dejó dentro del fermentador en la cámara fría hasta el día siguiente (~18 h).

El yogur fue envasado en potes plásticos (120-150 g) que se taparon con tapas de aluminio termo-sellables. Los potes de yogur fueron trasladados al INLAIN en refrigeración y luego almacenados (5 °C) hasta el momento del análisis. En la **Fig. 5.1** se muestran algunas fotografías de las instalaciones.

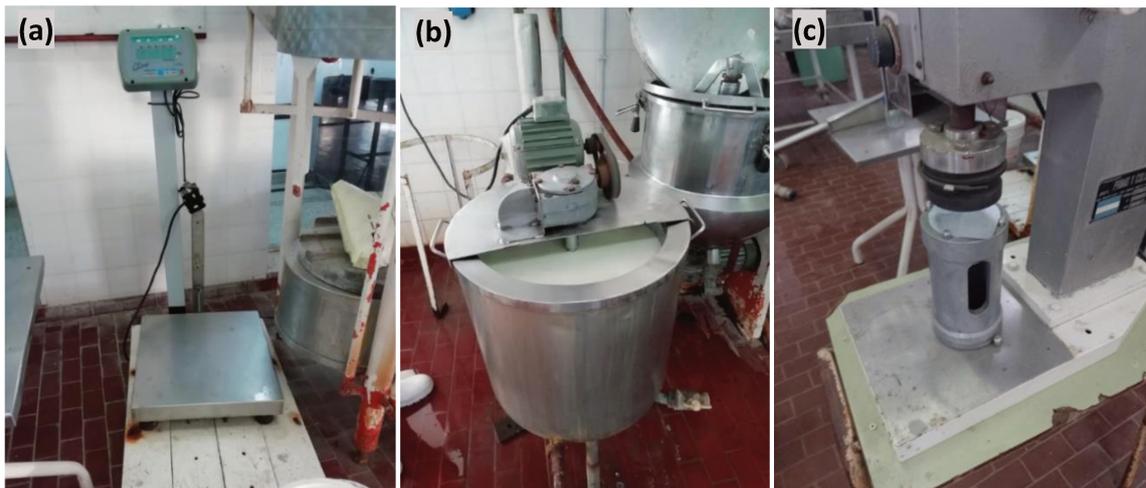


Fig. 5.1. a. Balanza empleada para pesar los ingredientes en polvo. b. Fermentador con camisa de 50 L de capacidad, con agitación mecánica. c. Envasadora manual.

Se determinó el pH y la acidez titulable (AT) (TA 1), y la concentración de ácidos orgánicos y carbohidratos en la LB (TA 9). Se realizó el seguimiento de pH durante la fermentación. Las muestras de yogur necesarias para los análisis fueron tomadas de un pote individual en el momento requerido. A los 21 d, se determinaron el pH, AT, CRA (TA 15), concentraciones de ácidos orgánicos y carbohidratos, composición global (proteína, grasa, sólidos totales, cenizas y calcio, –TA 3, 4, 5, 6 y 7, respectivamente-), perfil de compuestos volátiles (TA 10), recuentos microbianos (TA 11, 13 y 14) y los análisis estructurales: reometría rotacional CC (TA 17.1) y microestructura (TA 20). También se realizó un análisis sensorial descriptivo (QDA) con panel entrenado y de aceptabilidad con consumidores, a una de las réplicas de elaboración.

El esquema de muestreo y análisis se presenta en la Fig. 5.2.

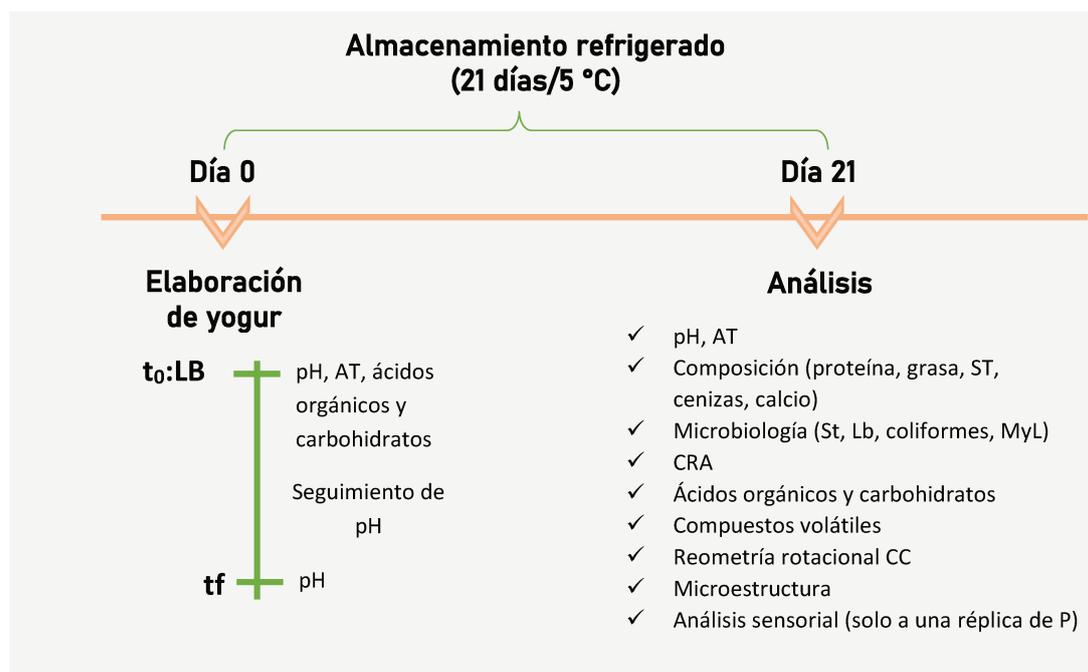


Fig. 5.2. Esquema de muestreo y controles analíticos realizados durante la elaboración y almacenamiento de los yogures.

AT: acidez titulable; ST: sólidos totales; St: *Streptococcus thermophilus*; Lb: *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*; MyL: mohos y levaduras; CRA: capacidad de retención de agua; CC: cilindros concéntricos.

1.5. Análisis sensorial

1.5.1. Análisis cuantitativo descriptivo (QDA®)

El análisis se realizó en el laboratorio de análisis sensorial del Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA, FIQ-UNL), que posee cabinas individuales cumpliendo con los requerimientos presentados en la norma ISO Standard 8589 (2007). El panel estuvo conformado por once evaluadores entrenados (5 varones y 6 mujeres de entre 22 y 62 años). La muestra de yogur (30 g a 5 °C, contenida en un recipiente plástico) fue entregada a los panelistas.

Los descriptores seleccionados fueron: color, brillo, sinéresis, consistencia, filancia, uniformidad, aspereza, adherencia, astringencia, cremosidad, sabor ácido, sabor amargo, sabor a polvo, sabor lácteo, sabor a crema, sabor residual y sabor global, a los que se les asignó un puntaje en una escala no estructurada de 10 cm de longitud, anclada en 1 y 9. La intensidad de cada atributo fue medida por cada evaluador, y los resultados fueron promediados entre todos los evaluadores (ISO Standard 8589, 2007).

1.5.2. Análisis de consumidores

Se reclutaron 149 participantes teniendo en cuenta su patrón de consumo de yogur (al menos dos veces por semana), disponibilidad e interés en participar. El análisis se llevó a cabo en cabinas

individuales, al igual que el QDA (apartado 1.5.1). La muestra de yogur (30 g a 5 °C, contenida en un recipiente plástico) se entregó a los participantes, a quienes se les solicitó, en primer lugar, que probaran la muestra e indicaran su grado de gusto general en una escala hedónica de nueve puntos, donde 9=Me gusta muchísimo y 1=Me disgusta muchísimo (Xia et al., 2021). Finalmente, debieron completar la opción de si comprarían o no el producto. En la Fig. 5.3 se muestra la planilla presentada a los consumidores.

Estimado/a participante,
 Usted está siendo invitado a participar en un estudio sobre percepción **de yogures con un perfil nutricional mejorado**. Tiene absoluta libertad de preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Género: | **Edad:**

.....

FIRMA

Por favor pruebe la muestra e indique cuanto le gusta:

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Me disgusta muchísimo	Me disgusta mucho	Me disgusta poco	Me resulta indiferente	Me gusta poco	Me gusta mucho	Me gusta mucho	Me gusta mucho	Me gusta muchísimo

COMPRARÍA ESTE YOGUR: **SI** **NO**

Fig. 5.3. Planilla entregada a los participantes del análisis sensorial con consumidores.

1.6. Análisis estadístico

Los datos de los análisis fisicoquímicos, microbiológicos, ácidos orgánicos y carbohidratos, compuestos volátiles y análisis estructurales, obtenidos en ambas escalas de elaboración, fueron comparados mediante test t de Student, (nivel de significancia $p < 0,05$) (Statgraphics Centurion XIV, Royal Technology S.A., Estados Unidos).

También se realizaron análisis multivariados: análisis de componentes principales (PCA) y de cuadrados mínimos parciales (PLS), a la matriz de datos compuesta por los valores de los metabolitos de la fermentación (ácido láctico y compuestos volátiles) y lactosa final, obtenidos en cada una de las tres réplicas de elaboración de los yogures L y P (Rstudio, R Core Team, 2014). El análisis de PLS es un método estadístico de análisis multivariado utilizado principalmente para modelar relaciones complejas entre un conjunto de variables predictoras y un conjunto de variables de respuesta, que se emplea cuando el número de variables es mayor que el número de observaciones.

Para los resultados del análisis sensorial con consumidores, se utilizó el test chi-cuadrado para evaluar la independencia del grado de gusto y la intención de compra (XLSTAT 2014, Addinsoft, Estados Unidos).

2. Resultados

2.1. Evolución de la fermentación, composición global, análisis fisicoquímicos y microbiológicos

La curva de pH vs. Tiempo de Fermentación (min) de los yogures P y L se muestran en la **Fig. 5.4**.

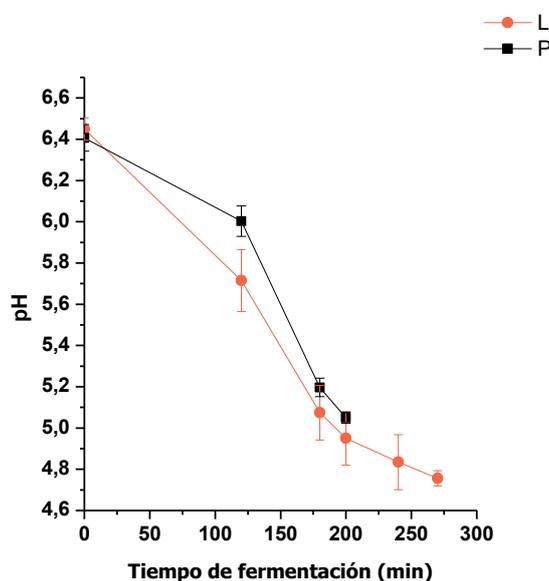


Fig. 5.4. Evolución de pH durante la fermentación para los yogures L y P.

Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de 3 réplicas de elaboración.

La fermentación del yogur P demoró 200 ± 5 min hasta alcanzar su pH target que, como se mencionó, fue mayor al propuesto para L ($4,9 \pm 0,1$ vs. $4,7 \pm 0,1$, respectivamente). No se detectaron diferencias en el pH en ninguno de los puntos de muestreo comunes a ambos yogures (0, 120, 180 y 200 min).

Los parámetros pH, AT, composición global, CRA y recuentos microbianos de los yogures a los 21 d se muestran en la **Tabla 5.2**.

El pH fue significativamente menor en P que en L, lo que puede relacionarse al enfriamiento más lento post fermentación del yogur P. A pesar de esto, la AT no mostró diferencias significativas entre ambos yogures, siendo los valores menores a $150 \text{ }^\circ\text{D}$, cumpliendo con lo exigido por la normativa (CAA, 2006).

De los parámetros de composición, solo se hallaron diferencias significativas en el nivel de grasa. Esto se atribuyó al uso de distintas fuentes de materias primas: para L se empleó leche parcialmente descremada UHT con $1,0 \text{ g}/100 \text{ mL}$ de grasa, mientras que para P se empleó leche pasteurizada con $\sim 1,3 \text{ g}/100 \text{ mL}$ de grasa. De todas maneras, en ambos casos se obtuvieron yogures parcialmente descremados (CAA, 2006), respetando el diseño original. El nivel proteico no mostró diferencias significativas entre L y P, obteniéndose productos fermentados concentrados según la definición del *Codex Alimentarius* (FAO/OMS, 2011a). Los niveles de

calcio no mostraron diferencias significativas entre L y P, y los mismos coinciden con los reportados para yogures incrementados en proteínas (Jørgensen et al., 2015).

Tabla 5.2. pH, AT, composición global, CRA y recuentos microbiológicos de los yogures L y P (21 d).

Parámetros	Yogur	
	L	P
pH	4,57±0,12 ^a	4,41±0,04 ^b
AT (°D)	128,57±9,02	127,50±1,61
Proteína (g/100 g)	6,25±0,29	6,28±0,08
Grasa (g/100 g)	1,13±0,18 ^b	1,50±0,23 ^a
Cenizas (g/100 g)	1,49±0,04	1,44±0,03
Calcio (g/100 g)	185,28±7,74	189,55±6,79
Sólidos totales (g/100 g)	18,84±0,25	17,78±0,14
CRA (%)	46,21±2,01 ^b	59,91±1,67 ^a
BAL totales (log ufc/g)	9,17±0,09	9,36±0,05
Mohos y levaduras (log ufc/g)	<1	<1
Coliformes (log ufc/g)	NA	<1

Los resultados se expresan como el valor medio ± desviación estándar de 3 réplicas de elaboración. Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre yogures (p<0,05).

La CRA fue mayor en el yogur P que en el L. De todos modos, los valores son similares a los reportados para yogures altos en proteínas (Gyawali e Ibrahim, 2018)

Los recuentos de BAL totales no mostraron diferencias significativas entre L y P, y su nivel fue mayor a 9 log ufc/g. El recuento de mohos y levaduras fue menor a 1 log ufc/g, y el recuento de coliformes (realizado solamente en P dado que este producto se destinó al consumo en el estudio sensorial) también fue menor a 1 log ufc/g.

2.2. Ácidos orgánicos y carbohidratos de las leches base y de los yogures

Los niveles de ácidos orgánicos y carbohidratos en LB y yogures (21 d) se muestran en la **Tabla 5.3.**

En ambas LB se detectaron los ácidos cítrico, orótico e hipúrico, en niveles similares entre ellas. Como se mencionó previamente, estos ácidos se encuentran naturalmente en la leche bovina. En cuanto a los carbohidratos, el único hallado fue lactosa en niveles mayores a 8 g/100 g. Es importante destacar que a pesar del elevado aporte que hacen los ingredientes (SMP y WPC35) al nivel de lactosa en las LB, se decidió utilizarlos por las ventajas de ser accesibles y económicos, lo cual resultó crucial para esta experiencia.

Tabla 5.3. Niveles de ácidos orgánicos y carbohidratos de las leches base y de los yogures (21 d).

Compuestos	Leche base	
	L	P
Ácido cítrico (mg/100 g)	351,87±18,17	331,16±11,12
Ácido orótico (mg/100 g)	11,51±0,36	10,98±0,44
Ácido láctico (mg/100 g)	ND	ND
Ácido hipúrico (mg/100 g)	3,97±0,28	3,52±0,27
GOS (g/100 g)	ND	ND
Lactosa (g/100 g)	8,78±0,48	8,61±0,23
Glucosa (g/100 g)	ND	ND
Galactosa (g/100 g)	ND	ND

Compuesto	Yogur	
	L	P
Ácido cítrico (mg/100 g)	324,33±38,31	353,80±34,27
Ácido orótico (mg/100 g)	10,02±0,61	10,74±0,23
Ácido láctico (mg/100 g)	1189,26±96,29 ^b	1694,94±74,51 ^a
Ácido hipúrico (mg/100 g)	1,50±0,06 ^a	0,98±0,32 ^b
GOS (g/100 g)	0,97±0,16	1,08±0,08
Lactosa (g/100 g)	1,50±0,17	1,71±0,15
Glucosa (g/100 g)	2,78±0,08	2,66±0,24
Galactosa (g/100 g)	2,80±0,19	2,86±0,20

Los resultados se expresan como el valor medio ± desviación estándar de 3 réplicas de elaboración. Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0,05$). ND: no detectado.

En los yogures se detectaron los ácidos cítricos, orótico hipúrico y láctico. Para los primeros tres, no se observaron diferencias significativas entre L y P. En el caso del ácido láctico sí se hallaron diferencias entre los yogures, siendo mayor su concentración en el yogur P.

Entre los carbohidratos, se encontraron GOS, lactosa, glucosa y galactosa, sin diferencias significativas entre yogures en ningún caso. Los niveles de GOS fueron ~1 g/100 g; como se mencionó anteriormente, su producción se debe a la actividad secundaria de transgalactosilación que posee la enzima empleada. En relación a esto, los niveles de lactosa en los yogures fueron de 1,5-1,7 g/100 g, lo que indica una disminución del 80% respecto a la concentración inicial en LB. La glucosa y la galactosa alcanzaron niveles de ~3 g/100 g en los yogures. Este comportamiento fue también observado en el estudio de Vénica et al. (2013) en fermentaciones de yogur (5 L) con 4,5 g/100 g de proteínas formulados con SMP y WPC35.

2.3. Perfil de compuestos volátiles de los yogures

Se detectaron 19 y 23 compuestos volátiles en L y P, respectivamente, pertenecientes a los grupos químicos de las cetonas (11), ácidos (6), aldehídos (5) y ésteres (2). En la **Fig. 5.5** se presenta el porcentaje de los grupos químicos respecto al área total de compuestos mientras que en la **Tabla 5.4** se muestran los compuestos individuales para ambos tipos de yogures.

Las cetonas y los ácidos fueron los grupos más abundantes, constituyendo alrededor del 90% de los compuestos identificados. Los valores porcentuales de las cetonas (~48%) y de los ácidos (~42%) fueron similares ($p > 0.05$) en ambos yogures.

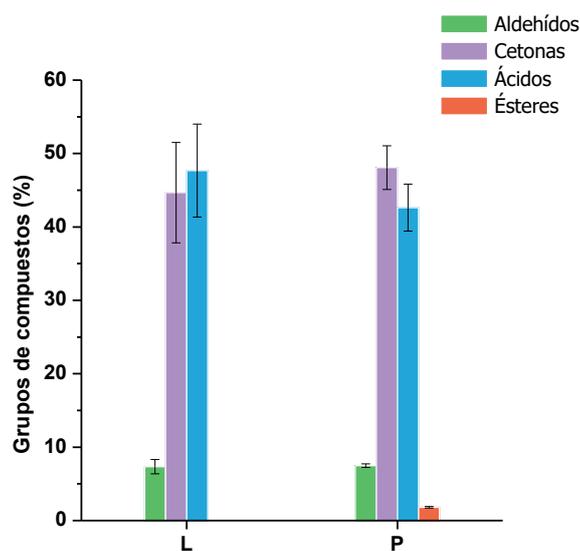


Fig. 5.5. Porcentaje de grupos de compuestos volátiles agrupados según familias químicas para los yogures (21 d)

Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de 3 réplicas de elaboración.

Tabla 5.4. Compuestos volátiles (valores de áreas en unidades arbitrarias x 1000) en los yogures (21 d) agrupados según familias químicas.

	Yogur	
	L	P
<i>Aldehídos</i>		
Acetaldehído	177±17 ^a	99±1 ^b
Hexanal	ND ^b	14±1 ^a
Heptanal	ND ^b	121±0 ^a
Nonanal	12±1 ^b	55±4 ^a
Benzaldehído	32±9	33±5
<i>Cetonas</i>		
2-propanona	179±20 ^a	109±7 ^b
2-butanona	87±13	62±7
2-pentanona	37±5 ^a	ND ^b
2,3-pentanodiona	137±14	124±15
2-hexanona	39±14 ^b	363±43 ^a
2-heptanona	228±7	166±5
2-octanona	ND ^b	52±1 ^a
2-nonanona	45±2	36±1
2-undecanona	14±4	12±1
Diacetilo	299±30	293±15
Acetoína	431±72	443±30
<i>Ácidos</i>		
Acético	79±7 ^a	49±8 ^b
Butanoico	215±18	241±4
Hexanoico	595±52	588±17
Octanoico	404±12 ^a	331±14 ^b
Decanoico	125±11	107±1
Dodecanoico	20±1	15±0
<i>Ésteres</i>		
Butanoato de etilo	ND ^b	29±2 ^a
Hexanoato de etilo	ND ^b	33±1 ^a

Los resultados se expresan como el valor medio ± desviación estándar de 3 réplicas de elaboración. Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre yogures ($p < 0,05$).

El perfil de las cetonas se caracterizó por metilcetonas (de C3 a C11), dicetonas (diacetilo, y 2,3-pentanodiona) y una hidroxicetona (acetoína). Como ya se mencionó previamente, diacetilo, acetoína y 2,3-pentanodiona se consideran como compuestos clave en el aroma del yogur (Liu et al., 2022; Ott et al., 2000); el área de estos compuestos fue similar en ambos yogures.

Metilcetonas como 2-propanona, 2-pentanona, 2-hexanona y 2-octanona presentaron diferencias significativas entre yogures. Los niveles de 2-propanona y 2-pentanona fueron mayores en el yogur L, mientras que los de 2-hexanona y 2-octanona fueron mayores en el yogur P. Las metilcetonas son compuestos comúnmente presentes en la fracción volátil del yogur, y los mecanismos que les dan origen están generalmente asociados al catabolismo de los ácidos grasos (Güler y Park, 2011; Ott et al., 1997).

La fracción ácida estuvo compuesta por ácidos de cadena lineal, con número par de átomos de C (C2-C12). En ambos yogures, el ácido hexanoico fue el más abundante, seguido por octanoico, butanoico, decanoico y acético. Solo los ácidos octanoico y acético presentaron diferencias significativas entre ambos yogures, siendo mayores en L que en P. Como ya se mencionó, los ácidos contribuyen al aroma de yogur y pueden originarse por procesos lipolíticos mediados por lipasas, fermentación de la lactosa y degradación de aminoácidos (Güler y Park, 2011; Liu et al., 2022).

Los aldehídos y los ésteres constituyeron los grupos minoritarios del perfil aromático. El yogur P tuvo mayor porcentaje de aldehídos (9,3%) y de ésteres (1,8%) que el yogur L (6,8 y 0%, respectivamente). Los aldehídos detectados fueron acetaldehído, hexanal, heptanal, nonanal y benzaldehído. Se hallaron diferencias significativas entre yogures para todos los aldehídos de cadena lineal: el acetaldehído fue mayor en L y el hexanal, heptanal y nonanal fueron mayores en P. Dentro de los aldehídos, el acetaldehído es el compuesto más característico en el perfil aromático de yogur. Por otra parte, los restantes aldehídos de cadena lineal encontrados principalmente en los yogures P (hexanal, heptanal y nonanal) se forman por procesos oxidativos de la materia grasa (Zhao et al., 2023). A niveles bajos, el heptanal y el nonanal proporcionan notas dulces y a hierbas, mientras que el hexanal proporciona un sabor afrutado y fresco, así como notas rancias (Li et al., 2024).

Finalmente, se encontraron dos ésteres etílicos en P, y sus niveles fueron bajos en relación con el resto de compuestos. Sin embargo, incluso a muy bajas concentraciones, los ésteres etílicos contribuyen a los aromas afrutados y florales, siendo esenciales para la formación del sabor en leches fermentadas como el yogur (Dan et al., 2017). En particular, se ha informado que el butanoato de etilo es un componente aromático clave (Liu et al., 2022). Los ésteres etílicos se originan a partir de las reacciones enzimáticas o la esterificación de ácidos grasos libres y etanol. Es importante señalar que el etanol no se identificó en los yogures, y esto podría explicar los bajos niveles de etil ésteres encontrados.

A partir de los resultados puede verse, que varios de los compuestos asociados a la hidrólisis de la grasa y al proceso de oxidación, y al catabolismo de los ácidos grasos presentaron diferencias entre los yogures (hexanal, heptanal, nonanal, etil ésteres, algunas metilcetonas); en todos los casos, los valores fueron estadísticamente mayores en los yogures P. Esto podría explicarse por los ligeramente mayores niveles de grasa en estos productos y posiblemente una mayor

incorporación de aire durante el proceso de elaboración; este hecho podría modificar el potencial de óxido-reducción del medio, favoreciendo procesos oxidativos (Martin et al., 2011). Por el contrario, el acetaldehído presentó mayores niveles en los yogures L. En este caso se puede hipotetizar que este compuesto, en condiciones oxidativas, puede convertirse rápidamente en ácido acético, el cual se encuentra presente en altos niveles en los yogures L.

Considerando las diferencias observadas en los compuestos volátiles entre los yogures L y P, se aplicaron análisis estadísticos multivariados como PCA y PLS para estudiar las fuentes primarias de variabilidad, teniendo en cuenta también la concentración de ácido láctico y lactosa de los yogures a los 21 d (**Fig. 5.6** y **5.7**). El primer componente principal (PC1) capturó el 67% de la varianza, mientras que el segundo componente principal (PC2) explicó el 18%. Juntos, explicaron el 85% de la variabilidad total. Por otra parte, el primer componente de PLS (PLS1) mostró una relación lineal con PC1, captando la mayor separación entre los dos grupos de yogur (**Fig. 5.8**). Sin embargo, PLS2 difirió ligeramente de PC2, reflejando aspectos únicos de la variabilidad relacionados con la naturaleza predictiva de PLS (**Fig. 5.9**). Mientras que PCA se centra en maximizar la varianza en las variables medidas ('y') e identifica las direcciones de mayor variabilidad independientemente de los grupos de estudio (tipos de yogur -'x'-, L y P), PLS incorpora las etiquetas de grupo durante la descomposición, con el objetivo de maximizar la covarianza entre 'x' e 'y'. De este modo, el PCA se llevó a cabo para descomponer matriz conformada por las variables medidas en componentes ortogonales (PC) que explican la varianza total, mientras que el PLS se aplicó para explorar la relación entre los tipos de yogur y las variables medidas.

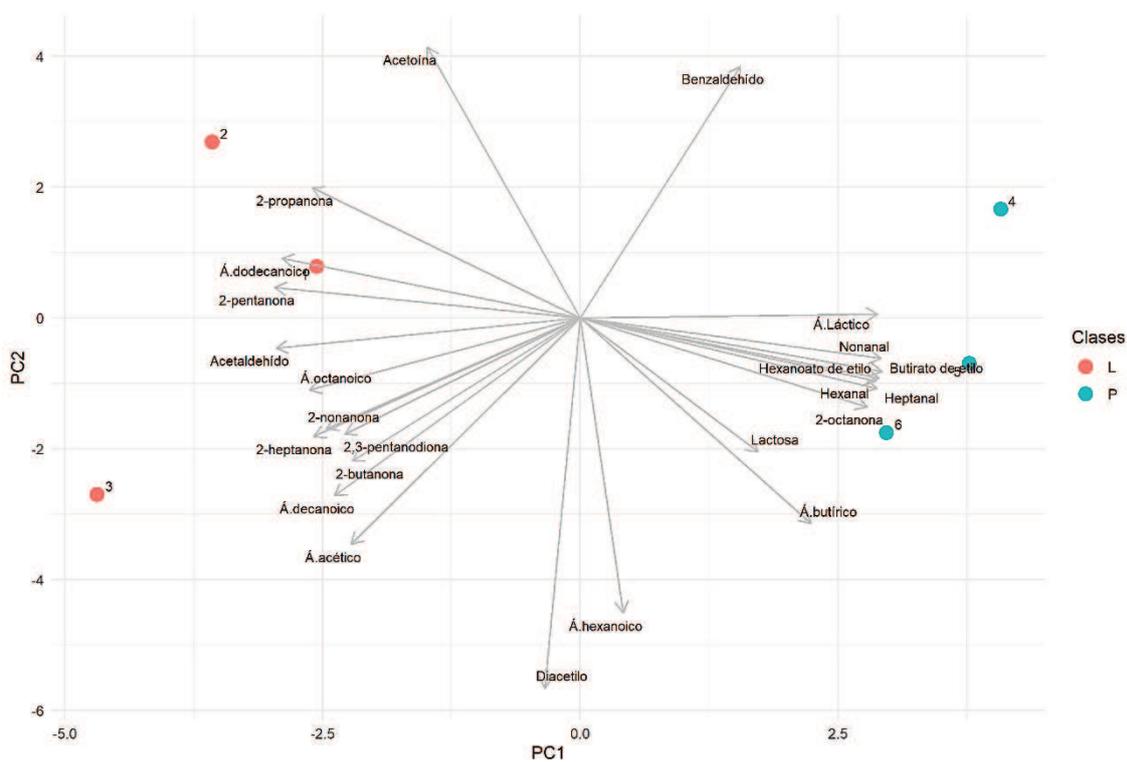


Fig. 5.6. Biplot de los Componentes Principales 1 (PC1) y 2 (PC2) de los compuestos volátiles, ácido láctico y lactosa de los yogures L y P (21 d).

Análisis realizado para los resultados de 3 réplicas de elaboración.

1, 2, 3: réplicas de elaboración de L.

4, 5, 6: réplicas de elaboración de P.

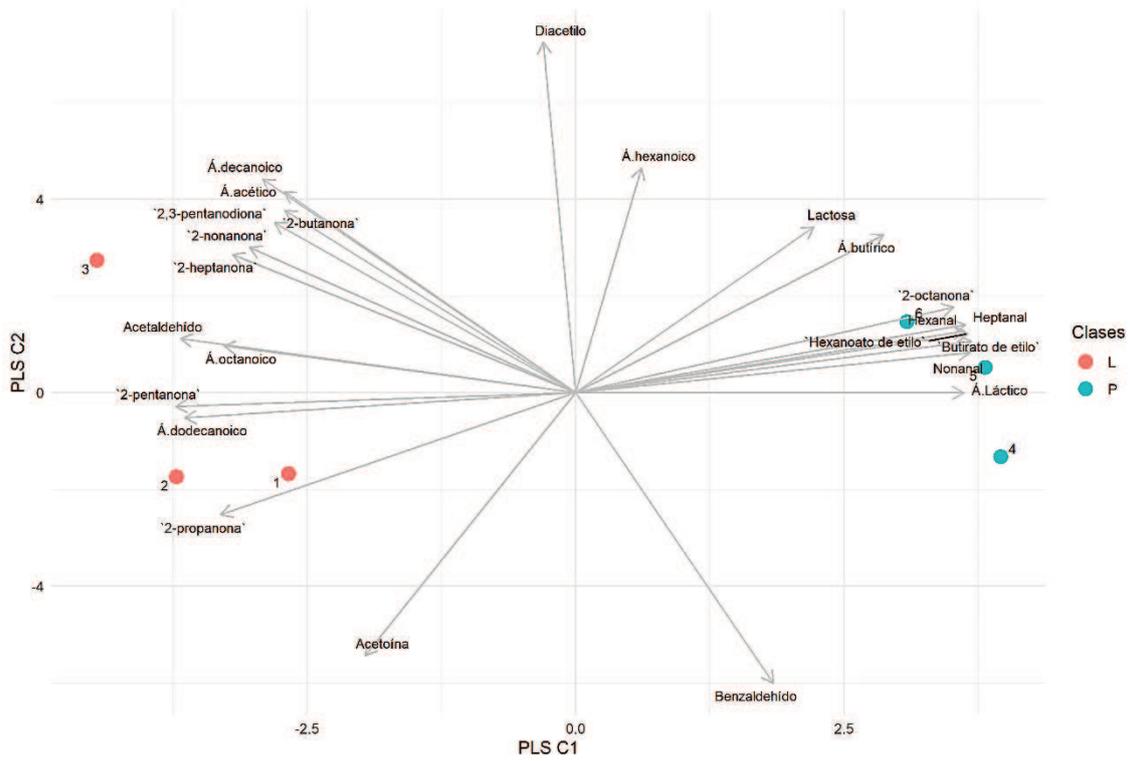


Fig. 5.7. Biplot de los componentes 1 (PLS C1) y 2 (PLS C2) de los compuestos volátiles, ácido láctico y lactosa de los yogures L y P (21 d).

Análisis realizado para los resultados de 3 réplicas de elaboración.
 1, 2, 3: réplicas de elaboración de L.
 4, 5, 6: réplicas de elaboración de P.

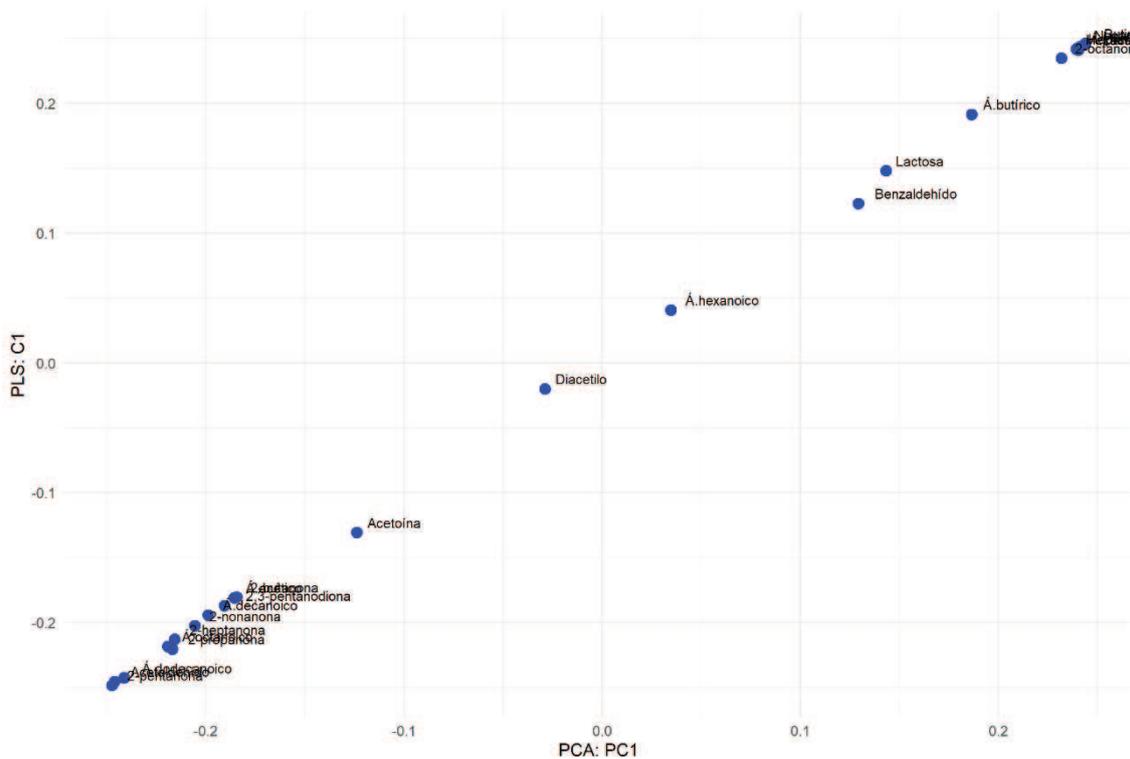


Fig. 5.8. Correlación de PLS:C1 vs. PCA:PC1.

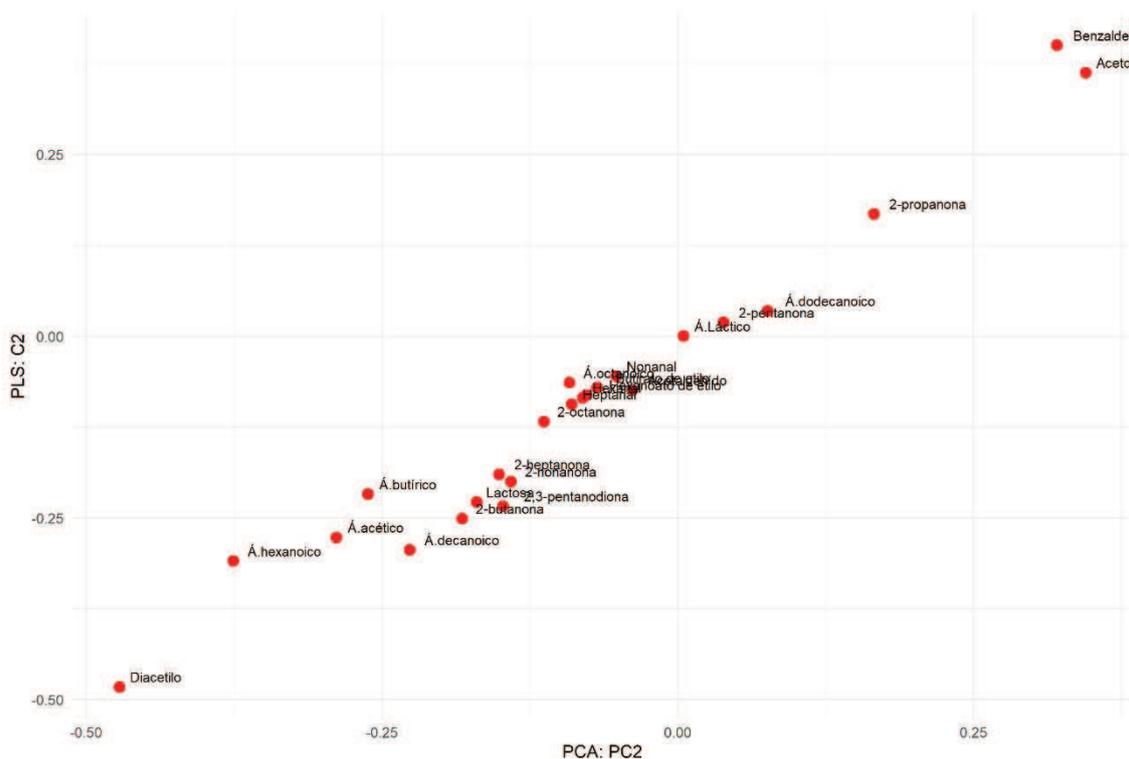


Fig. 5.9. Correlación de PLS:C2 vs. PCA:PC2.

Varias variables contribuyeron positiva o negativamente al primer componente (PC1/PLS1), pero con magnitudes similares. Se encontraron contribuciones positivas para el ácido láctico, hexanal, heptanal, nonanal, 2-octanona, hexanoato de etilo y butanoato de etilo, asociados a los yogures P. Se observaron contribuciones negativas para el acetaldehído, la 2-propanona, la 2-pentanona, la 2-heptanona, el ácido octanoico y el ácido dodecanoico, asociados a los yogures L. Estas variables son críticas para distinguir entre los dos tipos de yogur.

Globalmente, nuestros resultados revelaron que la proporción de los principales grupos químicos de compuestos (cetonas y ácidos) fue similar para L y P, aunque los componentes de los grupos minoritarios (aldehídos y ésteres) parecen ser los responsables de la diferenciación entre los productos L y P. El impacto de las modificaciones detectadas en la fracción volátil por el cambio de escala debería ser profundizado a partir de análisis sensoriales.

2.4. Reología y microestructura de los yogures

Las curvas de flujo (Esfuerzo de Corte vs. Velocidad de Corte) y de Viscosidad vs. Velocidad de Corte en los yogures L y P a los 21 d se muestran en la **Fig. 5.10**. Los parámetros obtenidos a partir del ajuste de los datos a la Ley de Potencia se presentan en la **Tabla 5.5**.

Tabla 5.5. Índice de consistencia (k), viscosidad aparente (η_a) a 50 s^{-1} de velocidad de corte, de los yogures (21 d).

Parámetros	Yogur	
	L	P
k (Pa.s)	44,89±4,63	57,13±8,24
η_a (50s ⁻¹ , Pa.s)	1,75±0,35	2,20±0,20

Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de 3 réplicas de elaboración.

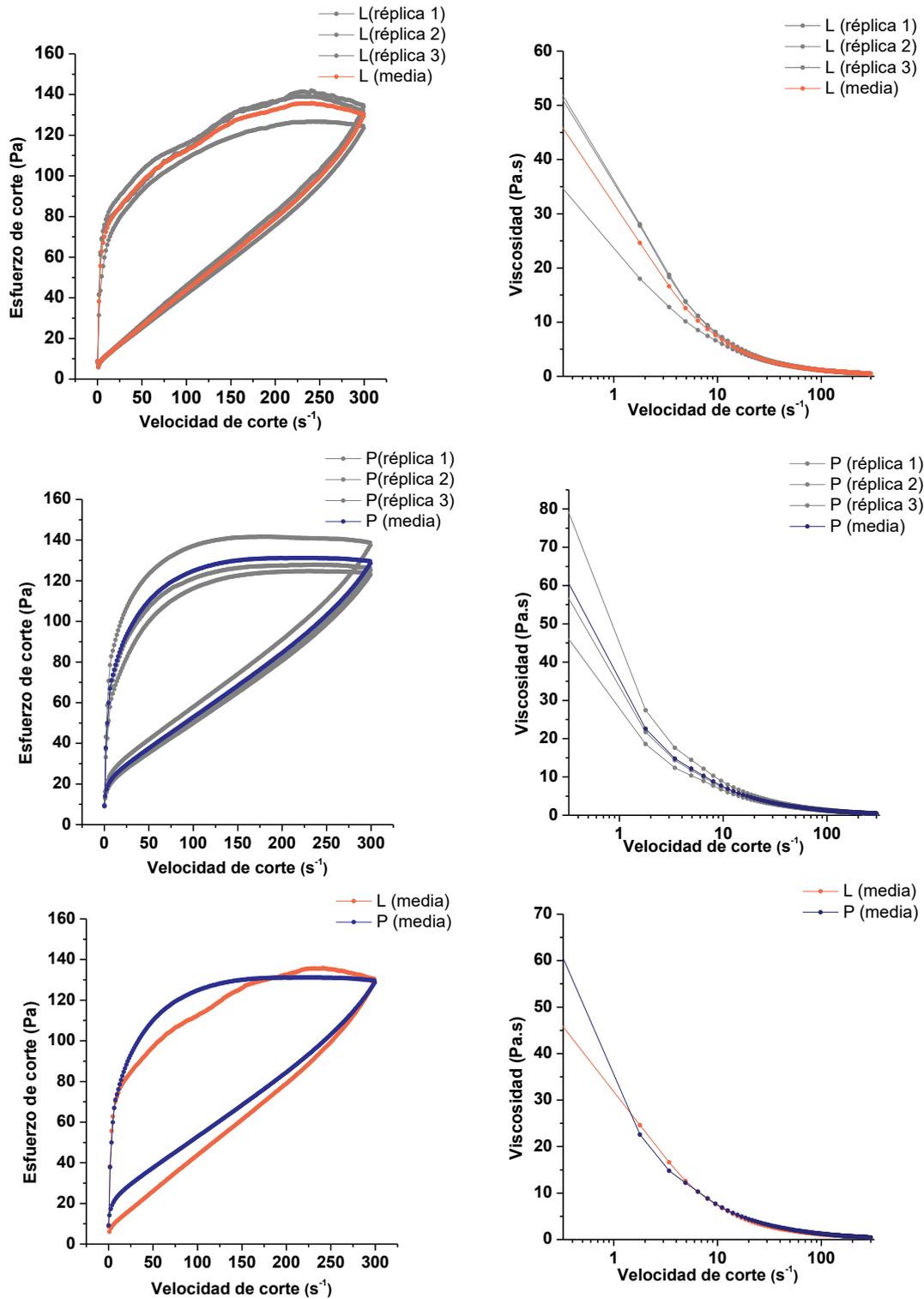


Fig. 5.10. Izq.: curvas de flujo (Esfuerzo de Corte vs. Velocidad de Corte). Der.: curvas de Viscosidad vs. Esfuerzo de Corte, de los yogures (21 d).

En gris se presentan las curvas de cada réplica y en color (naranja y azul) las curvas promedio para cada caso.

No se encontraron diferencias significativas en el índice k entre los yogures L y P, ni tampoco en la viscosidad aparente, evaluada a 50 s⁻¹ de velocidad de corte. Como ya se mencionó, el índice

k se asocia con la interacción intermolecular y las fuerzas atractivas que existen entre las partículas proteicas que forman la estructura (Costa et al., 2019), y la viscosidad evaluada a la velocidad de corte mencionada es una representación más cercana del comportamiento del alimento en la boca, ya que se asocia con el esfuerzo que se produce durante la masticación.

Las micrografías obtenidas por CLSM se muestran en la **Fig. 5.11**.

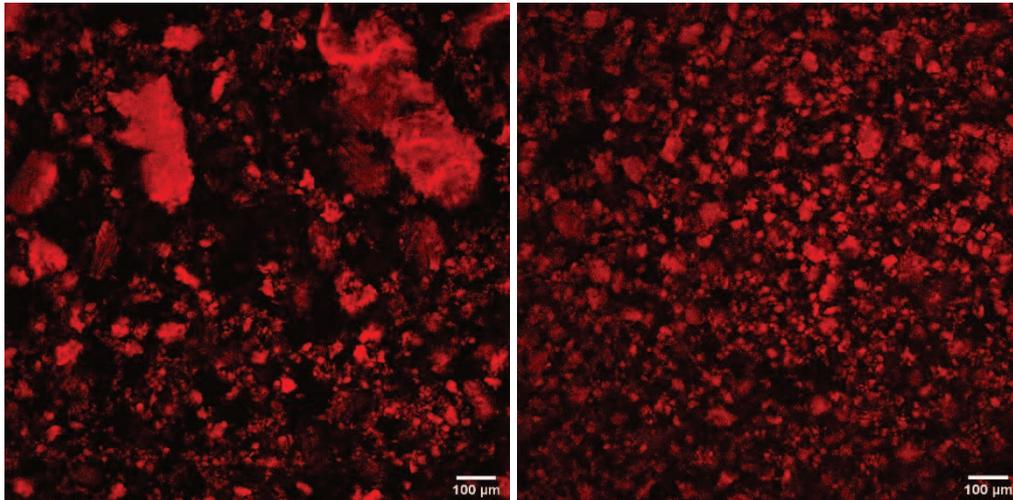


Fig. 5.11. Micrografías de CLSM de los yogures (21 d). **Izq.:** L. **Der.:** P.

Se pueden apreciar algunas diferencias entre las mismas: en el caso del yogur L, la distribución del tamaño de las partículas fue más heterogénea que en el P. De hecho, en L predominaron los agregados proteicos más grandes rodeados por otros más pequeños, mientras que en el P los agregados proteicos fueron más pequeños y regulares. Como ya se recaló, estas diferencias podrían atribuirse a las distintas condiciones de agitación y almacenamiento aplicadas, que podrían haber provocado una diferente reestructuración de la matriz durante los 21 días de almacenamiento. En la **Fig. 5.12** se muestran fotografías de la evolución del yogur P a lo largo de la agitación y su aspecto final luego del envasado y 1 día de almacenamiento.

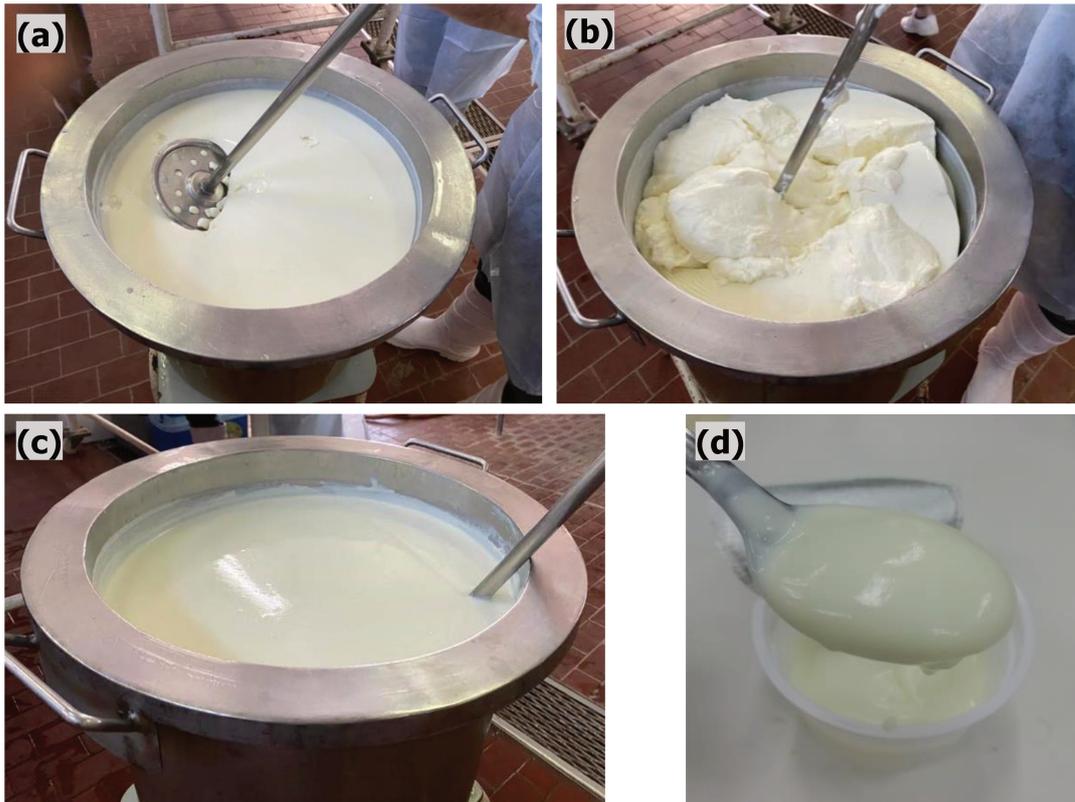


Fig. 5.12. a, b y c. Progreso de la etapa de agitación del yogur P. d. Aspecto del yogur envasado (1 d).

Observando los resultados en su conjunto, podemos decir que las condiciones de fabricación tuvieron algún impacto en la estructura del yogur: la CRA fue significativamente mayor en P que en L, y los valores medios de los parámetros k y η_a fueron mayores, aunque no revelaron diferencias estadísticas. Cada paso en la elaboración del yogur debe tenerse en cuenta al considerar su efecto en los parámetros estudiados (Mokoonlall et al., 2016). Teniendo en cuenta que la composición de la leche base, y que las condiciones de tratamiento térmico, tipo de fermento y temperatura de fermentación fueron similares en ambos casos, la atención debe centrarse en otras etapas que pueden incidir en la disposición estructural. De hecho, la principal diferencia entre ambas escalas de trabajo fue el paso de enfriamiento/agitación, como se mencionó anteriormente. El yogur batido es una dispersión de agregados proteicos y partículas de 10 a 100 μm , causada por la ruptura de la matriz de gel continua formada durante la fermentación, al aplicar altas fuerzas de deformación (Sodini et al., 2004; Van Marle, 1998). Un cizallamiento intenso se ha correlacionado con una mayor ruptura del gel, partículas más pequeñas y, en consecuencia, una menor viscosidad y resistencia del gel (Gilbert y Turgeon, 2021). En este trabajo no fue posible medir las fuerzas de cizallamiento correspondientes a cada tipo de agitación aplicada, ya que se realizaron en las condiciones que las instalaciones y los equipos (del laboratorio y la planta piloto) permitieron en cada caso.

Esta falta de estandarización de las condiciones de agitación, principalmente para la fabricación de yogures a escala de laboratorio, fue destacada por Moussier et al. (2019). Dichos autores aplicaron una lógica de ingeniería inversa basada en parámetros estructurales, para obtener un producto similar en términos de sus aspectos estructurales, en ambas escalas de trabajo. Esto significa que elaboraron yogures (~ 3 g/100 g de proteína, 6-10 g/100 g de grasa) a escala piloto (100 kg) y utilizaron los resultados de cada etapa de fabricación para diseñar un protocolo a escala de laboratorio (1,5 kg). Al igual que en nuestro trabajo, Moussier et al. (2019) encontraron diferencias en los parámetros reológicos relacionados a la fuerza del gel entre ambas escalas a pesar de haber realizado un trabajo exhaustivo de modelización de cada etapa del proceso. En el trabajo mencionado también hallaron que los tamaños de los agregados proteicos fueron más grandes en el yogur elaborado a escala laboratorio que en el yogur de la escala piloto. En nuestro trabajo, las partículas más pequeñas detectadas en la microestructura del yogur P podrían ser un indicio de una agitación más intensa en este yogur que en el L, y los mayores valores de índice k y viscosidad aparente (a 50 s⁻¹ de velocidad de corte) podrían indicar que estos agregados de proteínas más pequeños estarían más fuertemente interconectados que los agregados de mayor tamaño del yogur L.

2.5. Análisis sensorial

En la **Fig. 5.13** se muestran los descriptores y los niveles de intensidad asignados por los evaluadores para el yogur P.

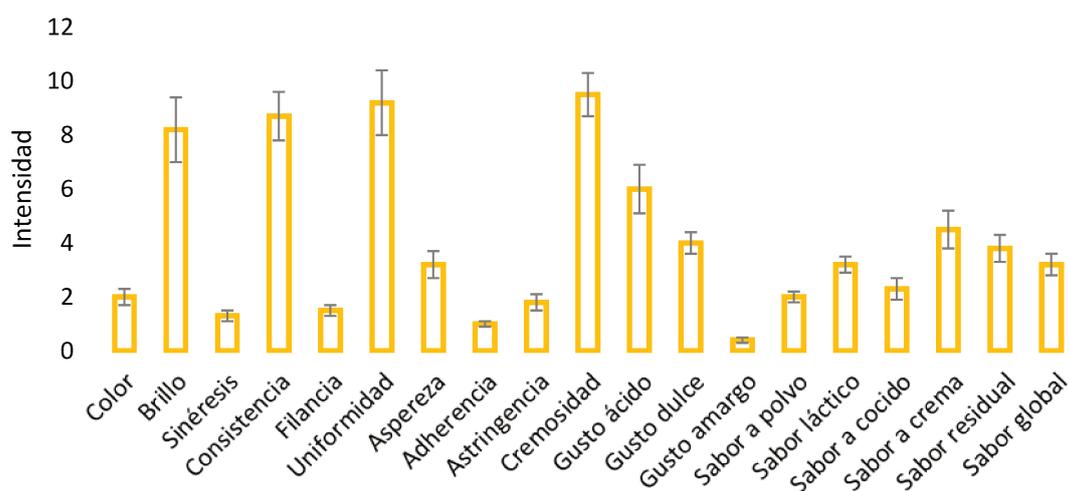


Fig. 5.13. Intensidad de los descriptores sensoriales percibidos por el panel entrenado para el yogur P (21 d).

Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de los 11 evaluadores.

Como se puede observar en la **Fig. 5.13**, el yogur se caracterizó por su color blanco, su brillo, consistencia, uniformidad de masa, cremosidad un moderado gusto ácido y dulce y sabor a crema; todos estos descriptores sensoriales se asocian positivamente a un producto fermentado de este tipo (Salman et al., 2024; Souza Olegario et al., 2022).

Por otro lado, el análisis sensorial basado en los consumidores (quienes tenían entre 18 y 62 años, siendo en su mayoría mujeres -71%-), mostró un agrado general de $6,80 \pm 1,49$, en torno a «Me gusta moderadamente» (**Fig. 5.14**). Esto indica que bajo la perspectiva de los consumidores el grado de agrado es alto y similar a otros desarrollos que intentan aumentar el contenido proteico en el yogur (Cândido de Souza et al., 2021; He et al., 2024).

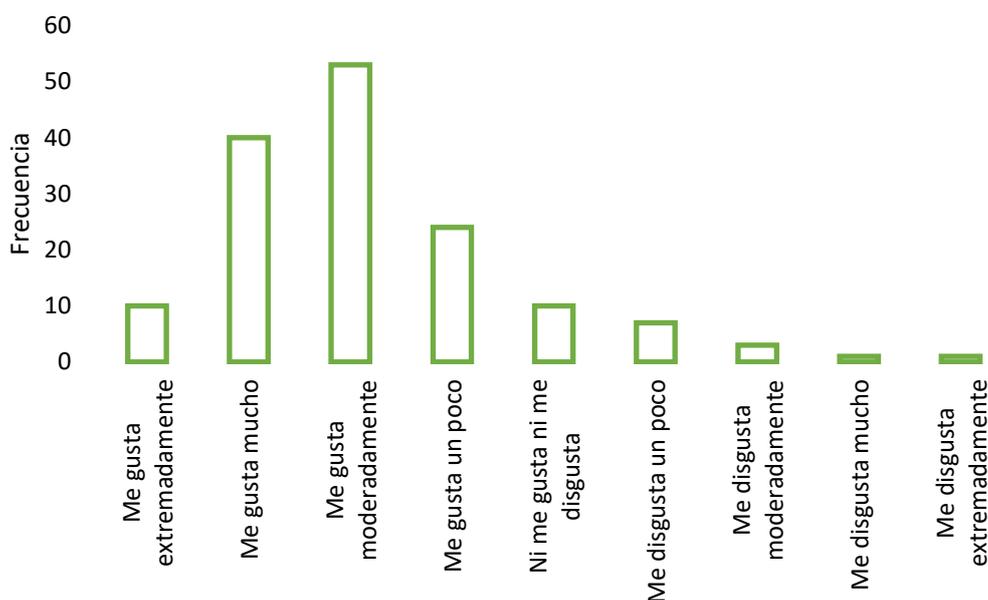


Fig. 5.14. Histograma de frecuencias de la escala hedónica de 9 puntos correspondientes al yogur P (21 d), según la evaluación realizada por consumidores (149).

Estos resultados son consistentes con los reportados por Cândido de Souza et al. (2021), quienes evaluaron cómo la adición de SMP influenciaba las características sensoriales del yogur estilo griego (6,5 g/100 g de proteína): un yogur con 10% de SMP fue el más aceptado, demostrando que es posible obtener yogures altos en proteína con mejores propiedades nutricionales y alta aceptación sensorial.

Por último, la intención de compra alcanzó el 78% (frente a un 22% que no compraría el producto). Es importante señalar que la prueba chi-cuadrado indicó que las diferencias en las distribuciones de frecuencias por género (mujer y hombre) y edad (entre 18-40 años y 41-62 años, respectivamente) no fueron significativas, indicando la independencia entre el nivel agrado por el producto, y el sexo y la edad de los participantes.

3. Conclusiones

Se obtuvieron yogures incrementados en proteínas, reducidos en lactosa, parcialmente descremados, y con GOS, a escala de laboratorio y piloto. Los niveles de proteína fueron lo suficientemente altos como para clasificarlos como leches fermentadas concentradas (>5,6 g/100 g de proteína). La reducción de lactosa fue del 80%. Los yogures mantuvieron la clasificación de parcialmente descremados (<1,5 g/100 g de grasa), aunque se tuvieron ligeras diferencias entre los contenidos de grasa de cada tipo de yogur lo que se debió al uso de distintas materias prima que dependieron de las posibilidades disponibles en cada instancia del trabajo.

Los principales metabolitos de la fermentación láctica fueron similares en ambos yogures, pero algunos compuestos volátiles (aldehídos y ésteres) mostraron diferencias, lo que se podría asociar al ligeramente mayor nivel graso y un cierto deterioro oxidativo de los ácidos en el yogur elaborado a escala piloto. Se observaron diferencias en la capacidad de retención de agua y en la microestructura, que se atribuyeron principalmente a la diferente velocidad de enfriamiento del yogur y también al esfuerzo aplicado en la fase de agitación. Los parámetros reológicos no fueron estadísticamente distintos, lo que podría atribuirse a la variabilidad entre las réplicas de elaboración, aunque la consistencia y la viscosidad aparente fueron mayores en el yogur P que en el L. A pesar de ello, en ambos casos se obtuvieron yogures con características de aspecto, fisicoquímicas, microbianas y estructurales satisfactorias. Una prueba sensorial del yogur P reveló que el panel entrenado encontró características compatibles y comparables con productos de este tipo. Por otro lado, los consumidores denotaron un nivel de agrado satisfactorio y una alta intención de compra.

Dado los buenos resultados obtenidos en el yogur elaborado a escala piloto, este producto se destinó a un estudio de eficacia en humanos, que se presentará en el siguiente Capítulo.

Capítulo 6

Estudio de la funcionalidad del yogur desarrollado en humanos

Resumen

El objetivo de este capítulo fue comprobar la funcionalidad del yogur incrementado en proteínas y reducido en lactosa y con GOS que se presentó en el **Capítulo 5**. Para ello, se diseñó un estudio clínico de eficacia de una rama. En primer lugar, los participantes fueron seleccionados acorde al cumplimiento de los criterios de inclusión/exclusión establecidos para este estudio. El grupo de participantes quedó compuesto por 43 personas de entre 18 y 65 años, con sobrepeso tipo I y II, IMC: 25-29,9 kg/m², de la ciudad de Santa Fe. El estudio se prolongó por cuatro semanas, período durante el cual los participantes consumieron una porción de yogur diaria. Se realizaron análisis bioquímicos de parámetros sanguíneos (recuento de glóbulos blancos, de glóbulos rojos y de plaquetas, niveles de hemoglobina, hematocrito, glucemia en ayunas, proteína C-reactiva, triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL -lipoproteína de alta densidad- e insulinemia en ayunas) y de composición de la microbiota intestinal, al inicio y al final de la administración del yogur. También se les solicitó completar una encuesta de síntomas gastrointestinales al inicio, en un tiempo intermedio y al final de la intervención.

Se detectaron mejoras en algunos indicadores sanguíneos. Si bien los cambios en la composición de la microbiota intestinal no fueron significativos, los participantes manifestaron percibir una notoria mejoría en sus síntomas gastrointestinales a lo largo del estudio, especialmente en las participantes de sexo femenino.

Este estudio fue el primero de su tipo que se realizó en la ciudad de Santa Fe, permitiendo un primer acercamiento a la caracterización de la composición de la microbiota intestinal de la población de la región.

1. Materiales y métodos

1.1. Elaboración del yogur a escala piloto

1.1.1. Materiales

Para la elaboración del yogur se empleó leche pasteurizada parcialmente descremada (1,2 g/100 mL de grasa, 3,2 g/100 mL de proteína), SMP (0 g/100 g de grasa, 36 g/100 g de proteína) y WPC35 (6 g/100 g de grasa, 35 g/100 g de proteína) (Milkaut S.A., Argentina), Stevia REB-A 98 (Saporiti S.A., Argentina) y una enzima β -galactosidasa comercial (YNL-2, GODO, Japón). El fermento utilizado fue YF-L811 (Chr. Hansen, Dinamarca). Los envases plásticos (capacidad de 200 g) con tapa de aluminio termo-sellable fueron provistos por Frecicar S.R.L. (Argentina).

1.1.2. Protocolo de elaboración y análisis

El protocolo de elaboración de yogur se detalló en el **Capítulo 5**. Se realizaron cuatro elaboraciones en semanas consecutivas a escala piloto (una por semana), en la Escuela Técnica N° 298 Miguel Manfredi (Franck, Santa Fe, Argentina). De esta manera, se hicieron cuatro réplicas de elaboración para cubrir la demanda necesaria del producto para el estudio clínico; es decir, para que los 43 participantes consuman una porción de 120 g de yogur por día.

Se realizaron análisis a la leche base (LB) y al yogur recién elaborado y durante el almacenamiento refrigerado.

La composición global (proteína, grasa, sólidos totales -ST-, cenizas, calcio y fósforo) y el contenido de lactosa se determinó en la LB de cada réplica, según las técnicas descriptas previamente (**TA 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9**, respectivamente). También se analizó el contenido de sodio en la LB de dos de las réplicas de elaboración mediante espectrometría de emisión atómica de llama (solicitado como servicio en el Programa de Investigación y Análisis de Residuos y Contaminantes Químicos –PRINARC, FIQ-UNL).

Se realizaron controles microbiológicos en el yogur a los días 1, 7, 14 y 21 mediante recuentos diferenciados de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (**TA 12**), de mohos y levaduras (**TA 13**), y de coliformes totales (**TA 14**), para corroborar el cumplimiento con la normativa alimentaria y la seguridad del producto antes de administrarlo a los participantes (CAA, 2006).

Asimismo, se realizaron los siguientes análisis fisicoquímicos y estructurales en el yogur a los días 1, 7, 14 y 21: pH y acidez titulable (**TA 1**), concentración de ácido láctico y de carbohidratos (**TA 9**), capacidad de retención de agua (**TA 15**) y reometría rotacional con configuración de cilindros concéntricos (**TA 17.1**).

El esquema de análisis se muestra en la **Fig. 6.1**.

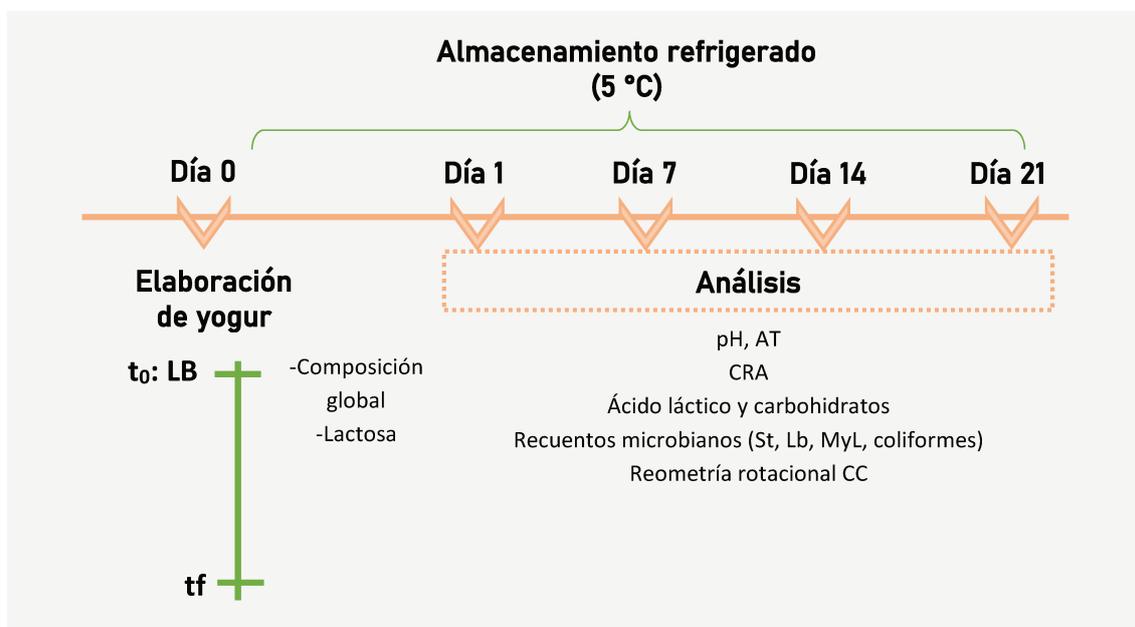


Fig. 6.1. Esquema de muestreo y controles analíticos realizados durante la elaboración y almacenamiento de los yogures

AT: acidez titulable; CRA: capacidad de retención de agua; St: *Streptococcus thermophilus*; Lb: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; MyL: mohos y levaduras; CC: cilindros concéntricos.

1.2. Estudio clínico

1.2.1. Diseño experimental, desarrollo del protocolo y selección de participantes

Se desarrolló un protocolo de investigación clínica titulado: *Estudio del efecto de la administración de un yogur enriquecido con proteínas en la composición de la microbiota intestinal y parámetros metabólicos en adultos con sobrepeso*. El documento fue presentado ante el comité de ética de la Facultad de Ciencias Médicas (FCM-UNL) para su evaluación, siendo aprobado sin modificaciones (marzo de 2023).

Este protocolo incluye el diseño experimental del estudio y los criterios de inclusión y exclusión para la selección de los participantes, y fue confeccionado conjuntamente con profesionales médicos de la FCM- UNL. Dicho protocolo se incluye en el **Anexo 6.1**.

El diseño experimental planteado fue de una rama, abierto, cuasi-experimental. Es decir, solo se incluyó un único grupo (grupo tratado) y los participantes tenían conocimiento de que conformaban ese grupo. La duración fue de 4 semanas consecutivas, durante las cuales se les solicitó a los participantes que consumieran una porción por día del yogur en estudio (120 g), en un único episodio alimentario (la porción completa, por ejemplo, como colación de media mañana), durante 5 días a la semana (de lunes a viernes). También se pidió a los participantes que hicieran una modificación en su dieta dos semanas previas al inicio del estudio y durante el mismo, la cual consistió en dejar de consumir otros alimentos fermentados (excepto queso, del

que se toleró un consumo ocasional) y de suplementos y/o alimentos probióticos. También se les requirió que limitaran lo más posible el consumo de alcohol (1 vaso de bebida alcohólica por semana como máximo).

Los participantes fueron convocados mediante diversos medios: canales oficiales de la FIQ-UNL (redes sociales, boletín informativo, etc.), contactos y redes sociales de los integrantes del grupo de investigación. Los mismos fueron pre seleccionados en base a su manifestación del cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión que se muestran en la **Tabla 6.1**.

Tabla 6.1. Criterios de inclusión y exclusión para la selección de los participantes del estudio clínico.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Sujetos de 18 a 65 años de edad de ambos sexos. ✓ Deben presentar IMC de 25-29,9 (sobrepeso grado I y II). ✓ Deben ser omnívoros. ✓ Deben consumir lácteos regularmente. 	<ul style="list-style-type: none"> - Tratamientos con fármacos antimicrobianos en los últimos 30 días previos al estudio. - Dieta vegana o vegetariana. - Intolerancias alimentarias (incluida intolerancia a la lactosa), restricciones o reacciones adversas a los productos lácteos. - Enfermedades crónicas (diabetes mellitus, hipo/hipertiroidismo, enfermedades autoinmunes u oncológicas) y otras enfermedades o condiciones que, por criterio médico, se considere que puedan afectar la función gastrointestinal e intervenir como factores potencialmente confundidores en la evaluación de los objetivos del estudio. - Infecciones agudas o crónicas en curso. - Historial de anemia (menos de 10 g/dL de Hb) en los últimos 6 meses previos al comienzo del estudio. - Actividad física intensa (más de 6 horas por semana). - Consumo regular de suplementos nutricionales. - Embarazo o lactancia en curso. - Hábito enolista de jerarquía: no más de 10 g de alcohol por día para mujeres y 20 g por día para hombres (equivale aproximadamente a 1 vaso de cerveza, 1 copa de vino).

A los participantes pre seleccionados se los citó a concurrir a una entrevista médica. La anamnesis fue realizada por médicos de la FCM-UNL para verificar que se cumplieran los criterios de inclusión y de exclusión mencionados. Además, se realizaron determinaciones de circunferencia de cintura, peso, altura y presión sanguínea. De esta manera, se seleccionaron 43 participantes, quienes manifestaron su acuerdo a participar del estudio mediante la firma de un consentimiento informado (**Anexo 6.2**).

Los participantes fueron incorporados a un grupo de WhatsApp junto con los integrantes del grupo de investigación para poder responder o resolver dudas o inconvenientes que surgieran durante el transcurso del estudio.

1.2.2. Recolección de muestras de los participantes y análisis

✓ Muestras de sangre

Se indicó a los participantes que asistieran a un laboratorio de análisis bioquímicos local (Interlab, Santa Fe, Argentina) para la extracción de sangre a tiempo inicial, una semana antes de empezar a consumir el yogur, y a tiempo final, al día posterior de consumo del último yogur.

Los parámetros determinados, analizados por metodologías estandarizadas, fueron: recuento de glóbulos blancos, recuento de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, recuento de plaquetas, glucemia en ayunas, proteína C-reactiva, triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL (lipoproteína de alta densidad) e insulinemia en ayunas. Los resultados de glucemia e insulinemia fueron utilizados para calcular el índice HOMA-2IR, como indicador del nivel de resistencia a la insulina. Este cálculo fue realizado con el software libre HOMA2 Calculator v2.2.4 para uso no comercial (University of Oxford, 2014).

✓ Muestras de materia fecal

Se indicó a los participantes que recolectaran una muestra de materia fecal en sus hogares el día previo al inicio del estudio y el día siguiente del consumo del último yogur. Para esto, se les proporcionó, previamente, un kit de recolección y un instructivo detallado de cómo realizarlo. Las muestras fueron congeladas inmediatamente por los participantes a -20 °C, y transportadas, congeladas, a las instalaciones del INLAIN dentro de las 24 h de la recolección.

El ADN genómico de las muestras de heces fue extraído con el kit QIAamp Fast Stool DNA Mini kit (Qiagen, Alemania) según el protocolo provisto por el fabricante. La concentración de ADN se cuantificó empleando un fluorómetro Qubit 2.0 (Life Technology, Estados Unidos).

Las bibliotecas dirigidas a la región V4 del gen 16S rRNA se prepararon en la plataforma Kiel Microbiome Platform, utilizando el *primer* directo 515 F (5'-

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCG GTAA-3') y el *primer* reverso 806rbc0 (5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCCCTTGTCTCCAGTCAGTCAGCCGGACTACH VGGGTWTCTAAT-3'). Las bibliotecas agrupadas se secuenciaron utilizando el sistema Illumina MiSeq 300 (Illumina Inc., Estados Unidos) en la plataforma CCGA de la Universidad de Kiel (Alemania), utilizando un índice personalizado (5'-ATTAGAWACCCBDGTAGTCCGGCTGACTGACT-3') y *primers* personalizados para la Lectura 1 (5'-TATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') y Lectura 2 (5'-AGTCAGTCAGCCGGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'). Las bibliotecas se secuenciaron como lecturas de 300 par de bases en Illumina MiSeq, en la Plataforma de Secuenciación de la Universidad de Kiel (Alemania). La visualización inicial de la calidad de los datos crudos se llevó a cabo en FastQC (Andrews, 2010) y su control de calidad se realizó en el software Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME 2) (Caporaso et al., 2011). Las lecturas se demultiplexaron, se eliminó el ruido, se fusionaron, se recortaron las lecturas de baja calidad, se filtraron y se eliminaron las quimeras utilizando el paquete DADA2 (Callahan et al., 2016) con una mediana de 11726 lecturas por muestra. Los datos de Variantes de Secuencia de Amplicones (ASV) fueron generados por un clasificador de aprendizaje automático Naive-Bayes en QIIME 2, que posteriormente generó una tabla de características que identificaba un total de 45653 ASV. La clasificación taxonómica se llevó a cabo en QIIME 2 utilizando un clasificador Naive-Bayes basado en la base de datos Greengenes 2 (McDonald et al., 2024).

✓ Encuesta de síntomas gastrointestinales

Se les solicitó a los participantes que completaran una encuesta de percepción de síntomas gastrointestinales validada en español durante el consumo del yogur, que se muestra en el **Anexo 6.1** (Kulich et al., 2005).

La encuesta, suministrada a los participantes en formato de cuestionario de *Google Forms*, consistía en 15 preguntas; cada pregunta tenía una escala de medida en puntaje de síntomas gastrointestinales (GSRS). Los participantes completaron la misma antes del primer consumo de yogur, en el punto medio del estudio (a las 2 semanas) y en el día posterior al consumo del último yogur (a las 4 semanas).

Las respuestas de la encuesta fueron promediadas para todos los participantes, y transformadas en 5 dimensiones de síntomas y síndromes gastrointestinales, denominadas dolor abdominal (AP, media de las preguntas 1, 4 y 5), síndrome de reflujo (RS, media de las preguntas 2 y 3), síndrome de indigestión (IS, media de las preguntas 6, 7, 8 y 9), síndrome de diarrea (DS, media de las preguntas 11, 12 y 14) y síndrome de constipación (CS, media de las preguntas 10, 13 y 15).

1.3. Análisis estadístico

Para los parámetros analizados en LB y yogur, se calculó el valor medio y la desviación estándar de 2 ó 4 réplicas de elaboración, según corresponda.

Para los datos de los participantes del estudio clínico, se calculó el valor medio de la edad, IMC, circunferencia de cintura, presión sistólica y presión diastólica, según sexo (mujer/varón) y se comparó entre ambos grupos mediante test t de Student (valor de significancia $p < 0,05$).

Para los datos obtenidos de las muestras humanas, se tuvo en cuenta la no-independencia de los datos derivados de un mismo participante en los distintos puntos de muestreo. Se asumió la independencia de los datos derivados entre los participantes (Hammouri et al., 2020; Saulnier et al., 2014). Dado que tanto los parámetros sanguíneos como la encuesta de síntomas gastrointestinales fueron evaluados en distintos puntos de muestreo (al inicio y al final, y al inicio, en un punto intermedio y al final, respectivamente) se empleó un modelo lineal de medidas repetidas (MLMR) en ambos casos, para determinar el efecto del tratamiento sobre los parámetros estudiados. También se consideró el factor sexo (mujer/varón) en el análisis.

Como los parámetros sanguíneos son medidas continuas pero su distribución es asimétrica, se aplicó una transformación de Box-Cox (transformación logarítmica), logrando una distribución normal que permitió operar con los datos transformados. Un test de Shapiro-Wilk fue empleado para confirmar la normalidad de los residuos. El MLMR se aplicó a los datos transformados. Los resultados fueron expresados como la relación valor inicial/valor final y como porcentajes de variación, ambos en la escala original.

En cuanto a los síntomas y síndromes gastrointestinales (AP, CS, DS, IS y RS), el MLMR se aplicó a los datos sin ninguna transformación.

Se utilizó el software Rstudio (R Core Team, 2014). En todos los casos, se tomó como valor de significancia $p < 0,05$.

Para el análisis de datos del gen 16S rARN, las comparaciones se realizaron considerando las fases final e inicial para evaluar las diversidades alfa y beta del microbioma, la composición de la comunidad núcleo y la abundancia de taxones específicos. Dos medidas típicamente reportadas en estudios de microbioma son la alfa- y beta-diversidad. La alfa-diversidad es un término general para describir la riqueza, uniformidad o diversidad de especies dentro de una muestra, y se puede representar con el índice de Shannon (a mayor índice, mayor alfa-diversidad). La beta-diversidad compara la similitud de dos o más comunidades (Cassol et al., 2025). Los análisis de alfa- y beta-diversidad se realizaron en Rstudio v.4.3.1 (R Core Team, 2014) empleando los paquetes “phyloseq” y “vegan” (McMurdie y Holmes, 2013; Oksanen et al., 2019). Para estimar la alfa-diversidad, las muestras se sometieron al proceso de rarefacción, estandarizándolas a 5000 ASVs. Esto significa que se igualó el número de lecturas (reads) en cada muestra a 5000 para evitar sesgos que puedan surgir por el tamaño desigual de las muestras. El microbioma núcleo de cada

grupo se definió como aquellos taxones que estaban presentes en al menos el 50% de los individuos de ese grupo. Para calcular las diferencias en la abundancia de los taxones entre grupos, se utilizó el software MaAsLin2 (Mallick et al., 2021), que permite realizar análisis de diferencias de abundancia en datos de microbioma. Para comparar la abundancia relativa de taxones específicos entre diferentes grupos, se usó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney U. Esta prueba es útil cuando no se puede asumir que los datos siguen una distribución normal. El análisis se realizó utilizando el paquete ggplot2 (Wickham, 2016).

2. Resultados

2.1. Análisis en leches base y yogures

2.1.1. Composición global y contenido de lactosa en LB

La composición global y el contenido de lactosa, determinada en LB, se muestra en la **Tabla 6.2**.

Tabla 6.2. Composición global (proteína, grasa, ST, cenizas, calcio, fósforo, sodio) y contenido de lactosa de la leche base.

Parámetros	LB
Proteína (g/100 g)	6,31±0,09
Grasa (g/100 g)	1,45±0,21
Sólidos totales (g/100 g)	17,84±0,17
Cenizas (g/100 g)	1,43±0,02
Calcio (mg/100 g)	188,65±5,78
Fósforo (mg/100 g)	127,82±3,27
Sodio [†] (mg/100 g)	155,32±1,26
Lactosa (g/100 g)	8,83±0,35

Los resultados se expresan como el valor medio ± desviación estándar de 4 réplicas de elaboración.

[†]El resultado se expresa como el valor medio ± desviación estándar de 2 réplicas de elaboración.

El contenido de proteína fue mayor a 5,6 g/100 g y el nivel de grasa fue menor a 1,5 g/100 g, por lo que este yogur corresponde a la categoría de producto fermentado concentrado y parcialmente descremado según lo establecido en las normativas (FAO/WHO, 2011; CAA, 2006, respectivamente). Los niveles de calcio y de fósforo fueron ligeramente mayores a los reportados para yogures con contenido tradicional de proteína (de la Fuente et al., 2003; Hashemi Gahrue et al., 2015), y similar a lo informado por Jørgensen et al. (2019) para yogures altos en proteína. Se ha propuesto que el calcio dietario está relacionado con el control del peso corporal y la salud

metabólica por diferentes mecanismos. Un incremento en el consumo de calcio tiene un impacto en la concentración intracelular del mismo (su transporte está mediado por la concentración de vitamina D en el organismo) y su regulación en el medio intracelular de los adipocitos podría reducir la lipogénesis y estimular la lipólisis y la oxidación lipídica (Zemel, 2005). También se ha propuesto que ocurre la formación de las sales cálcicas de los ácidos grasos a nivel intestinal, lo que reduce parcialmente la absorción neta de energía ya que los ácidos grasos no pueden ser absorbidos en esta forma química (Zemel, 2009).

La relación calcio:fósforo en el yogur fue de 1,5:1. A pesar de que no hay muchos reportes acerca de la relación entre el fósforo consumido en la dieta y el peso corporal, se ha encontrado que una relación inversa (mayor proporción de fósforo que de calcio en la dieta) se relaciona con situaciones de sobrepeso y obesidad (Pereira et al., 2013). Es decir, el consumo de un yogur que tenga mayor proporción de calcio que de fósforo colaboraría en mantener esta relación en valores beneficiosos para controlar el peso.

La concentración de lactosa en LB fue de ~9 g/100 g. Como ya se mencionó en los Capítulos anteriores, el uso de ingredientes como SMP y WPC35 para alcanzar los niveles proteicos propuestos trae aparejado un incremento sustancial en la concentración de lactosa en la leche de partida. En el apartado siguiente se observará que este nivel fue disminuido gracias a la incorporación de β -galactosidasa en la elaboración de yogur.

2.1.2. Recuentos microbiológicos en el yogur

La composición microbiológica del yogur, evaluada mediante recuentos diferenciales a lo largo del almacenamiento, se muestra en la **Tabla 6.3**.

Tabla 6.3. Recuentos microbiológicos en los yogures elaborados a escala piloto, a los días 1, 7, 14 y 21 d de almacenamiento refrigerado.

Recuentos (log ufc/g)	Día			
	1 d	7 d	14 d	21 d
<i>S. thermophilus</i>	9,41±0,08	9,36±0,05	9,34±0,11	9,41±0,14
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	3,99±0,16	3,93±0,06	3,88±0,07	3,87±0,08
Mohos y levaduras	<1	<1	<1	<1
Coliformes	<1	<1	<1	<1

Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de 4 réplicas de elaboración.

Los recuentos de coliformes y de mohos y levaduras estuvieron por debajo del límite de detección (<1 log ufc/g), indicando que los yogures eran seguros para su consumo a lo largo de

todo el período de almacenamiento (CAA, 2007). Los niveles de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* fueron $\sim 9,4$ y $\sim 4,0$ log ufc/g, respectivamente, en todos los puntos de muestreo.

2.1.3. pH, acidez titulable, ácido láctico y carbohidratos del yogur

El pH se mantuvo entre 4,3 y 4,4 durante el almacenamiento por 21 d, y la AT entre 130 y 133 °D (Fig. 6.2). Los valores de AT se mantuvieron por debajo de 150 °D durante todo el almacenamiento, cumpliendo con el requisito legal para yogur (CAA, 2006).

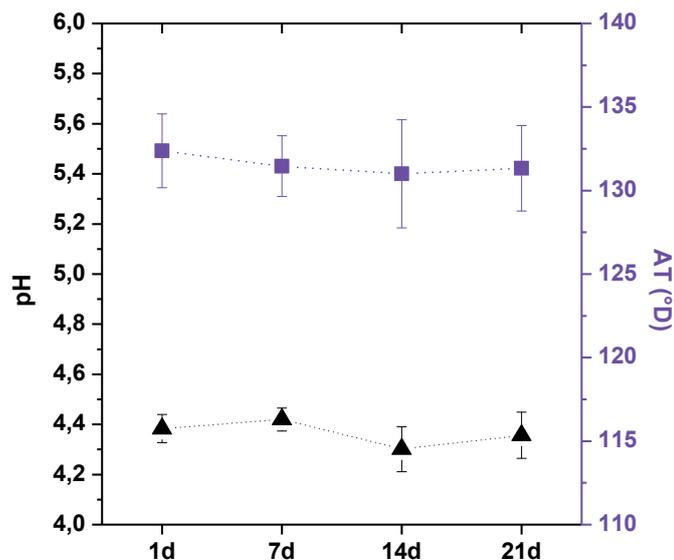


Fig. 6.2. Evolución de pH y AT a lo largo del almacenamiento de los yogures obtenidos a escala piloto.

Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de 4 réplicas de elaboración.

En la Fig. 6.3 se muestran las concentraciones de ácido láctico y de carbohidratos en LB y yogur a lo largo del almacenamiento.

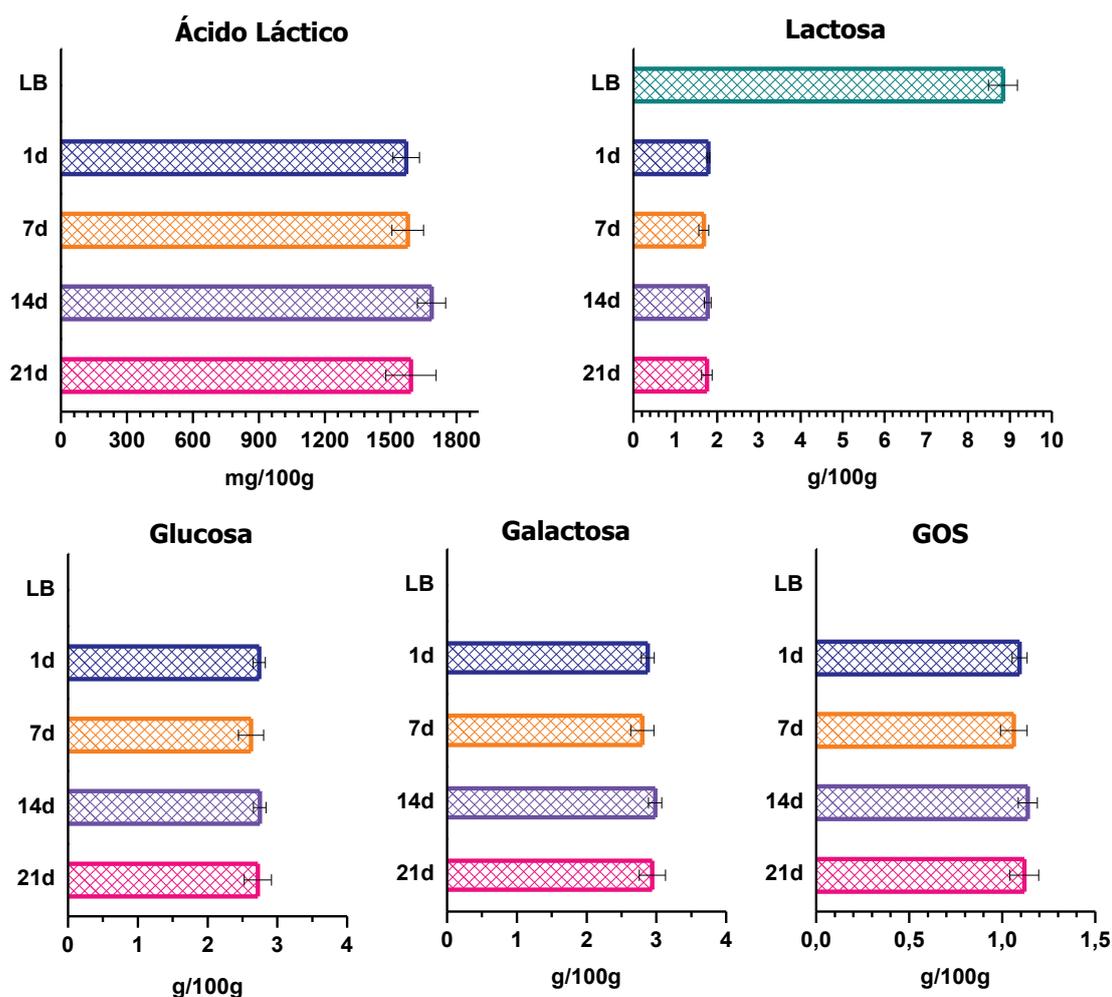


Fig. 6.3. Concentraciones de ácido láctico, lactosa, glucosa, galactosa y galactooligosacáridos (GOS) en LB y yogur (mg/100 g y g/100 g, respectivamente), a 1, 7, 14 y 21 d de almacenamiento refrigerado.

Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de 4 réplicas de elaboración.

El ácido láctico alcanzó valores entre 1570 y 1686 mg/100 g a lo largo del almacenamiento. Estos niveles son similares a los hallados en los Capítulos anteriores. La concentración de lactosa en el yogur rondó 1,7-1,8 g/100 g en todos los puntos estudiados. Este valor es menor al observado en yogures sin β -galactosidasa (por ejemplo, los yogures del **Capítulo 1**), aunque solo algo menores que los del **Capítulo 2** y del **Capítulo 3**. Como ya se mencionó previamente, el uso de ingredientes con alto contenido de lactosa para incrementar la concentración proteica de las formulaciones provoca un aumento significativo de la lactosa en la leche base, de la que se hidroliza 30-40% durante la fermentación. En los **Capítulos 2 y 3** se emplearon como ingredientes principales MPC y leche concentrada por UF (respectivamente), con alto contenido de proteínas y bajo de lactosa. Como también se mencionó, estos ingredientes son más costosos y menos asequibles que otros como SMP y WPC35. En el Capítulo anterior (**Capítulo 5**) se destacó la importancia de emplear ingredientes más económicos para el escalado, necesidad que se reforzó

en esta instancia del estudio donde se requirieron cantidades elevadas de los ingredientes para las elaboraciones a escala piloto para cubrir la demanda que se necesitaba de yogur para el estudio clínico. Es por esto que la estrategia de emplear β -galactosidasa resultó una alternativa tecnológica conveniente para disminuir el contenido de lactosa en yogur, lo que, como se verá en las próximas secciones, podría ser una explicación para la buena tolerancia que tuvieron los participantes del estudio por el producto. Además, como ya ha sido corroborado en estudios anteriores (Vénica et al., 2014) y en el **Capítulo 4**, la enzima empleada presenta la capacidad de producir GOS, favoreciendo la salud intestinal. Los GOS alcanzaron niveles de 1,1-1,2 g/100 g en yogur. Considerando la porción de yogur administrada a los participantes (~130 g/día), éstos consumieron aproximadamente 1,5 g de GOS diariamente, durante 4 semanas. Si bien la dosis de GOS que ha demostrado efectos benéficos a la salud intestinal es mayor (2,5 g/día), la presencia de GOS en este yogur contribuye al aporte recomendado de fibra dietaria, que al no ser digerida ni absorbida presenta un efecto prebiótico (Gibson et al., 2007). Además, se le han atribuido otros beneficios como la prevención del cáncer, mejoramiento del metabolismo lipídico, estimulación de la absorción de minerales y propiedades inmunomoduladoras (de la Fuente et al., 2003; Hashemi Gahruie et al., 2015).

Como consecuencia de la hidrólisis enzimática, las concentraciones de glucosa y de galactosa fueron mayores, ~2,7 y ~3 g/100 g, respectivamente, que las encontradas en los yogures de los **Capítulos 1, 2 y 3**. La glucosa posee mayor poder endulzante que la lactosa y la galactosa, y su presencia en el yogur brinda un ligero sabor dulce sin necesidad de agregar sacarosa ni exceso de edulcorantes no nutritivos. Además, el agregado de Stevia colaboró en el sabor ligeramente dulce que tuvo el yogur, y condujo a que el producto sea bien aceptado por los participantes, ya que en nuestro país se acostumbra a consumir yogures endulzados.

2.1.4. Capacidad de retención de agua y comportamiento reológico del yogur

Los valores hallados de CRA, índice de consistencia (k) y viscosidad aparente (a 50 s⁻¹ de velocidad de corte) del yogur durante el almacenamiento, se muestran en la **Fig. 6.4**.

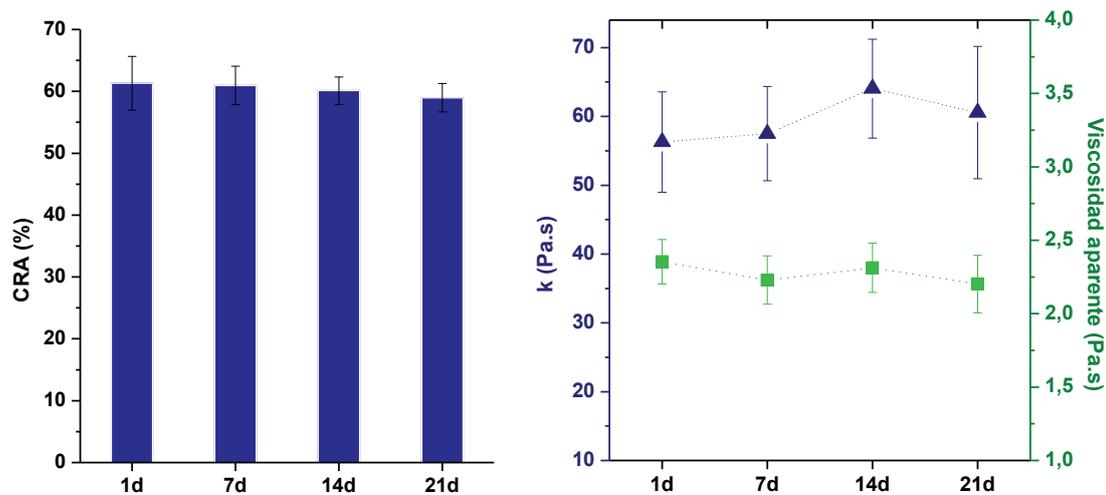


Fig. 6.4. Niveles de CRA (%) (izq.), índice k (Pa.s) y viscosidad aparente (Pa.s) (der.) en el yogur a lo largo del almacenamiento.

Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de 4 réplicas de elaboración

La CRA se mantuvo en $\sim 60\%$ desde el día 1 al 21, similar a lo hallado en los yogures con agregado de concentrados proteínas de suero presentados en esta Tesis.

El índice k osciló entre 56 y 64 Pa.s, y la viscosidad aparente entre 2,2 y 2,3 Pa.s; no se observaron diferencias significativas por el tiempo de almacenamiento para cada parámetro.

2.2. Parámetros analizados en los participantes

El estudio se llevó a cabo con un grupo de 43 participantes, cuyas características (agrupados por sexo) se muestran en la **Tabla 6.4**.

Ninguno de los participantes abandonó el estudio y no se reportaron efectos adversos indeseables como hinchazón, dolor o molestias abdominales, eructos o diarrea.

Tabla 6.4. Características de los participantes del estudio clínico de consumo de yogur incrementado en proteínas.

Características	Mujer	Varón	Diferencia
Número de participantes	27	16	NA
Edad (años)	37±13	45±12	*
IMC (kg/m ²)	28±3	28±2	NS
Circunferencia de cintura (cm)	90,6±10,9	91,4±8,9	NS
Presión sistólica (mmHg)	113±11	113±7	NS
Presión diastólica (mmHg)	72±8	79±5	*

Los resultados se expresan como el valor medio ± desviación estándar de los 43 participantes.

IMC: índice de masa corporal.

* indica diferencia significativa entre sexos ($p < 0,05$).

NA: no aplicable; NS: no significativo.

Los parámetros sanguíneos evaluados en los participantes al inicio y final del estudio se presentan en la **Tabla 6.5**; también se indica el porcentaje de variación y la significancia.

Se encontró un aumento significativo en el recuento de glóbulos rojos, la hemoglobina, el hematocrito y el colesterol HDL, mientras que se registró un descenso en el recuento de glóbulos blancos. No se encontraron diferencias significativas para la proteína C-reactiva, insulina, colesterol total, glucemia, plaquetas, triglicéridos y HOMA2 IR.

Tabla 6.5. Parámetros sanguíneos evaluados en los participantes al inicio y final del estudio clínico de consumo del yogur.

Parámetros	Valor inicial	Valor final	Final/Inicial	% de variación	Valor p
Glóbulos rojos/mm³	4478636±380316	4864318±387637	1,08	8,0±0,4	*
Colesterol HDL (g/L)	0,55±0,14	0,57±0,14	1,05	5,0±0,8	*
Hematocrito (%)	40,75±2,97	43,87±3,45	1,08	8,0±0,5	*
Hemoglobina (g/dL)	13,85±1,17	14,01±1,07	1,02	1,2±0,3	*
Glóbulos blancos/mm³	6585±1736	6221±1801	0,94	-6,1±1,3	*
Proteína C-reactiva (mg/L)	3,00±4,91	3,37±5,28	1,00	NA	NS
Insulina (uUI/mL)	9,14±6,29	9,63±6,07	1,00	NA	NS
Colesterol total (g/L)	1,86±0,34	1,90±0,36	1,00	NA	NS
Glucemia (g/L)	0,93±0,10	0,96±0,10	1,00	NA	NS
Plaquetas/mm³	247182±47528	268545±61611	1,00	NA	NS
Triglicéridos (g/L)	1,03±0,57	0,96±0,47	1,00	NA	NS
HOMA2 IR	1,03±0,71	1,10±0,70	1,00	NA	NS

Los resultados se expresan como el valor medio ± desviación estándar de los 43 participantes.

* indica diferencia significativa ($p < 0,05$).

NS: no significativo; NA: no aplicable

Las diferencias en el recuento de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, colesterol HDL y recuento de glóbulos blancos antes y después de la administración del yogur separado por sexo se muestran en la **Fig. 6.5**.

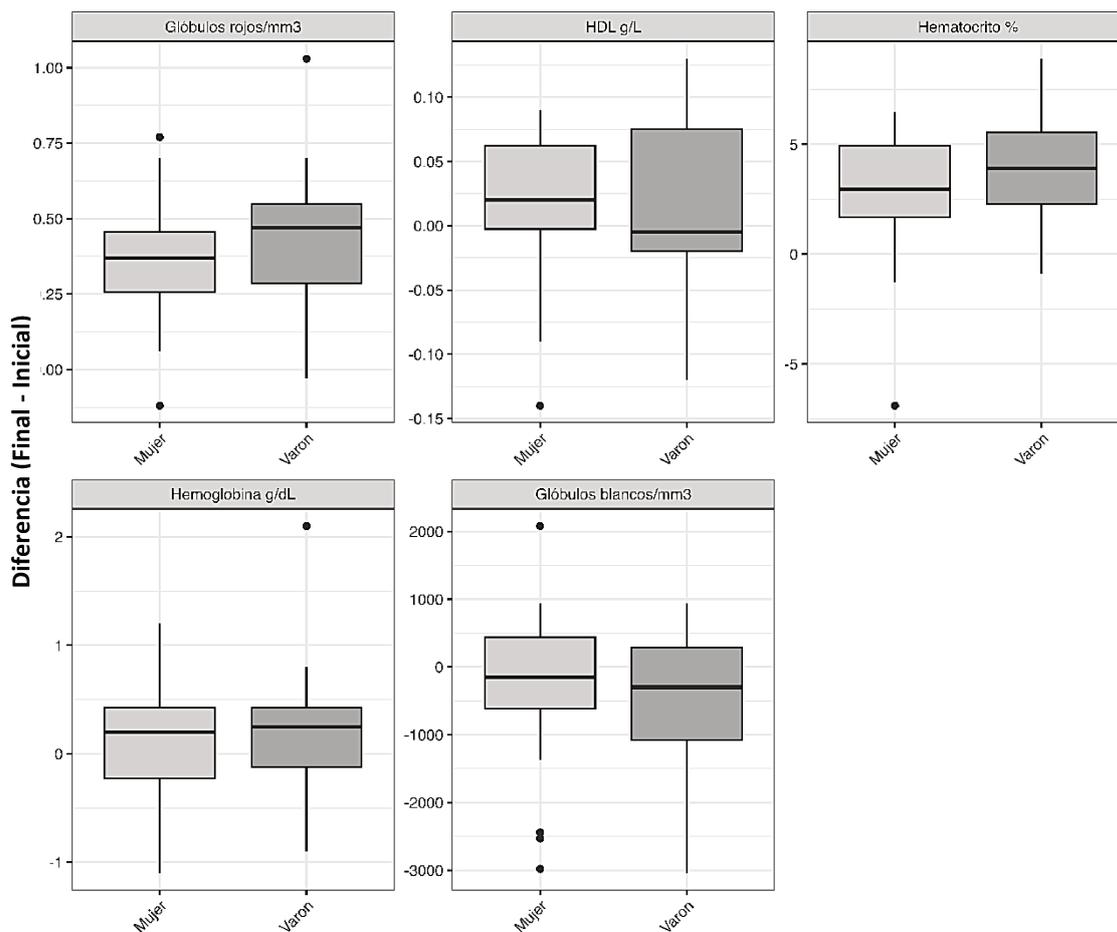


Fig. 6.5. Diagrama box-plot de las diferencias de medianas en los parámetros sanguíneos (Final-Inicial) evaluados en los participantes del estudio clínico de consumo del yogur, discriminado por sexo.

Las medianas observadas en los primeros cuatro parámetros son positivas para ambos sexos (parámetros que aumentaron), mientras que la mediana correspondiente a la diferencia en el recuento de glóbulos blancos es negativa en ambos casos (parámetro que disminuyó), reflejando el mismo comportamiento que se observó para el grupo completo (**Tabla 6.5**). Para los glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito, los varones mostraron medianas mayores que las mujeres. Por el contrario, las mujeres tuvieron mayor mediana para el colesterol HDL y los glóbulos blancos respecto a los varones. El análisis estadístico confirmó estas diferencias significativas según el sexo, sin interacción significativa entre los factores tiempo (inicial y final) y sexo. Una observación más detallada del cambio en estos parámetros sanguíneos que tuvo cada individuo y su mediana se muestra en la **Fig. 6.6**. Se observa que, a pesar de las diferencias detectadas en cuanto al sexo, la dirección de cambio es consistente entre ambos sexos y coincide con la del grupo completo.

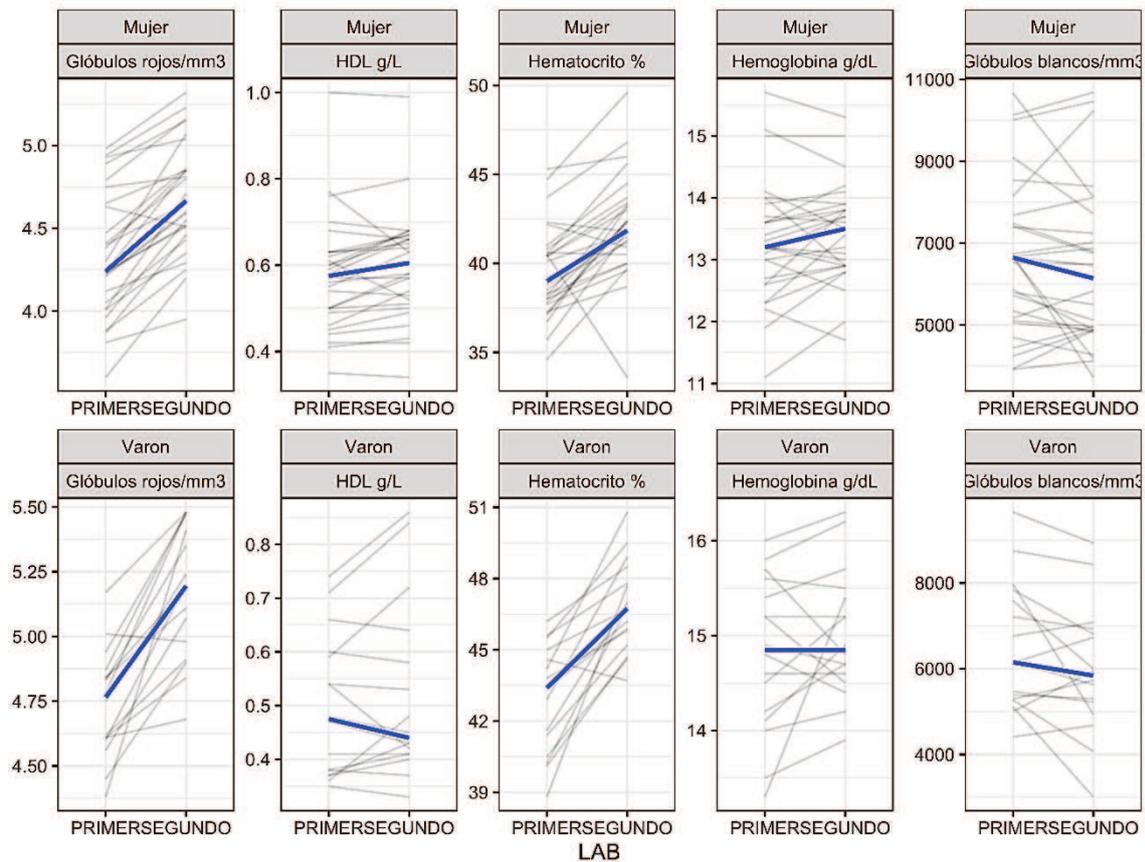


Fig. 6.6. Variación en los parámetros sanguíneos evaluados en cada participante, entre los resultados bioquímicos del punto inicial (‘primer’) y final (‘segundo’) y valor de mediana (línea azul) en el estudio clínico de consumo del yogur.

Se calculó la percepción de síntomas y síndromes gastrointestinales a partir de la encuesta de GSRS. Los valores se presentan en la **Tabla 6.6**, como el cambio o la diferencia entre los distintos puntos de análisis.

Tabla 6.6. Percepción de síntomas y síndromes gastrointestinales registrados a partir de la encuesta GSRS realizada por los participantes durante el estudio clínico de consumo del yogur, expresado como la diferencia entre los distintos puntos de muestreo.

Síntomas/Síndromes	Diferencias		
	Intermedio - Inicial	Final - Intermedio	Final - Inicial
AP	-0,197±0,130	-0.156±0,130	-0.356±0,130
RS	—	—	—
IS	-0.290±0,130	—	-0.495±0,130
DS	—	—	—
CS	-0.439±0,160	—	-0.450±0,160

Los resultados se expresan como el valor medio ± desviación estándar de los 43 participantes. Se muestran solo las diferencias que presentaron diferencia significativa ($p < 0,05$). AP: dolor abdominal; RS: síndrome de reflujo; IS: síndrome de indigestión; DS: síndrome de diarrea; CS: síndrome de constipación.

Se hallaron diferencias significativas para AP, CS e IS, entre los puntos intermedio e inicial y entre los puntos final e inicial, y en todos los casos se encontró una reducción en los mismos. Para AP, también se encontraron diferencias entre los puntos final e intermedio, pero esto no se observó para IS y CS. Es decir, los cambios más significativos se encontraron en las primeras dos semanas de la intervención.

En la **Fig. 6.7** se muestran las medidas de síntomas y síndromes gastrointestinales para los tres puntos de muestreo discriminado por sexo. La diferencia por sexo fue significativa solamente para AP e IS, sin encontrarse interacción significativa entre los factores sexo y tiempo de muestreo.

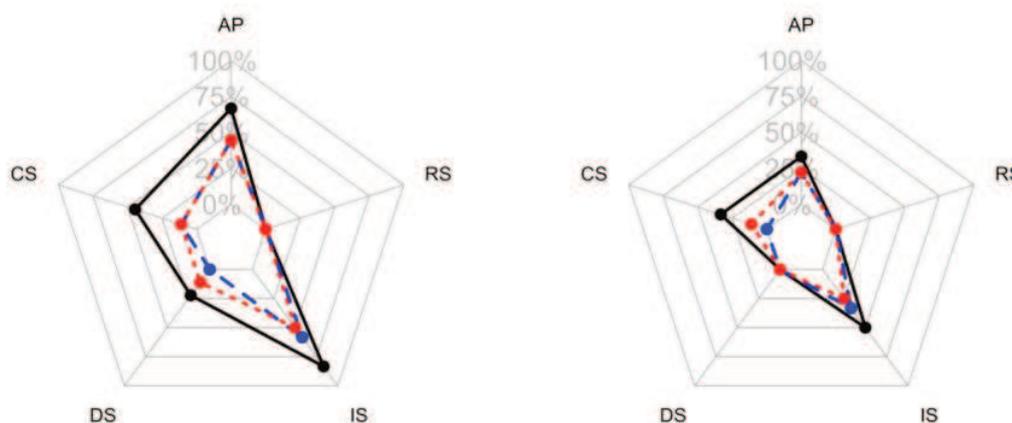


Fig. 6.7. Gráficos de radar de síntomas y síndromes gastrointestinales en mujeres (izq.) y varones (der.). La línea negra representa el punto inicial, la línea roja el punto intermedio y la línea azul el punto final.

AP: dolor abdominal; RS: síndrome de reflujo; IS: síndrome de indigestión; DS: síndrome de diarrea; CS: síndrome de constipación. Los resultados en cuartiles se expresan como el valor medio de los 43 participantes.

En general, no se observaron cambios mayores en la composición de la microbiota analizada en la materia fecal de los individuos, antes y después de la intervención. La alfa-diversidad mostró una disminución significativa luego de la intervención (**Fig. 6.8**). Este efecto podría deberse a una disminución abrupta de la diversidad a nivel individual para algunos participantes (como se puede observar en la **Fig. 6.8**), más que a un efecto a nivel grupal. Otra posible explicación es una dominancia transitoria de las especies bacterianas del yogur, como se ha reportado previamente (Le Roy et al., 2022). Cuando se analiza la abundancia de algunas familias bacterianas específicas (*Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* y *Acidaminococcaceae*) (**Fig. 6.9**), incluyendo algunos géneros productores de butirato (*Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Roseburia*, entre otros) y otros géneros específicos como *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Akkermansia* y *Anaerostipes* (**Fig. 6.10**), se observa que la diferencia en su abundancia al inicio y al final del estudio no fue significativa.

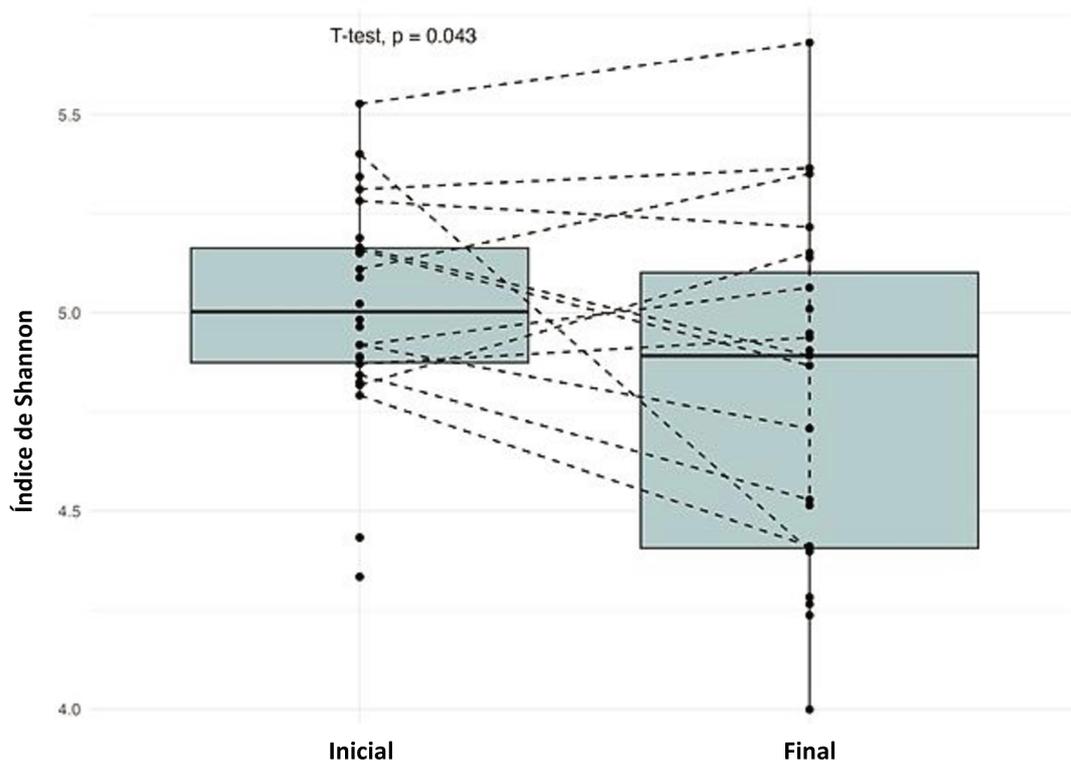


Fig. 6.8. Comparaciones de la alfa-diversidad antes y después del consumo del yogur, utilizando el índice de Shannon. Las líneas discontinuas conectan los valores del punto inicial y final para cada participante.

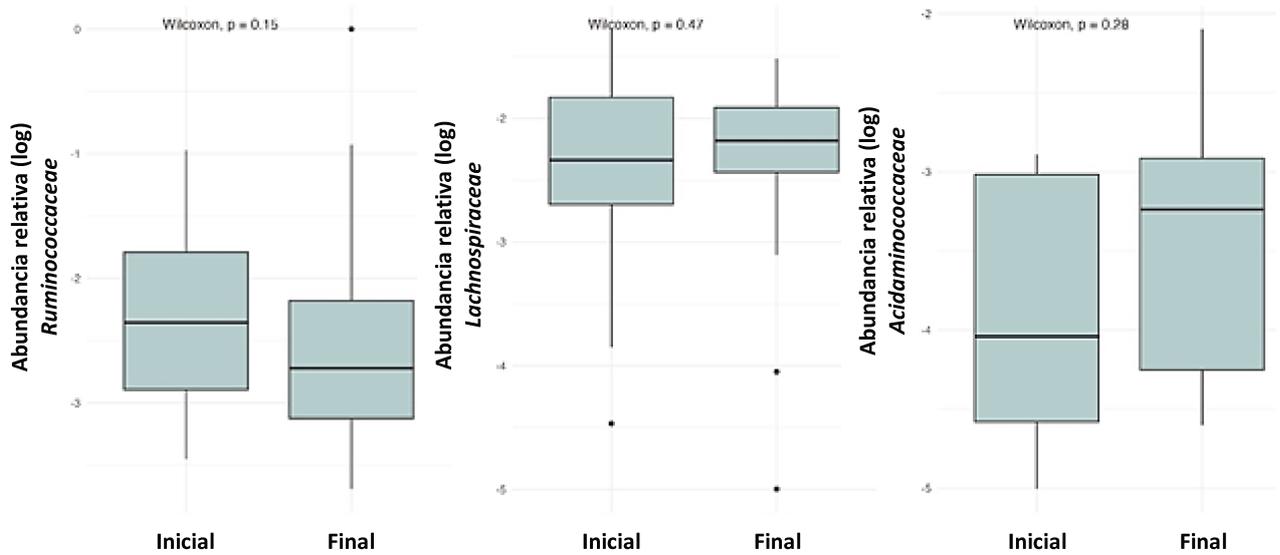


Fig. 6.9. Diferencias en la abundancia de las familias *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* y *Acidaminococcaceae* antes y después del consumo del yogur.

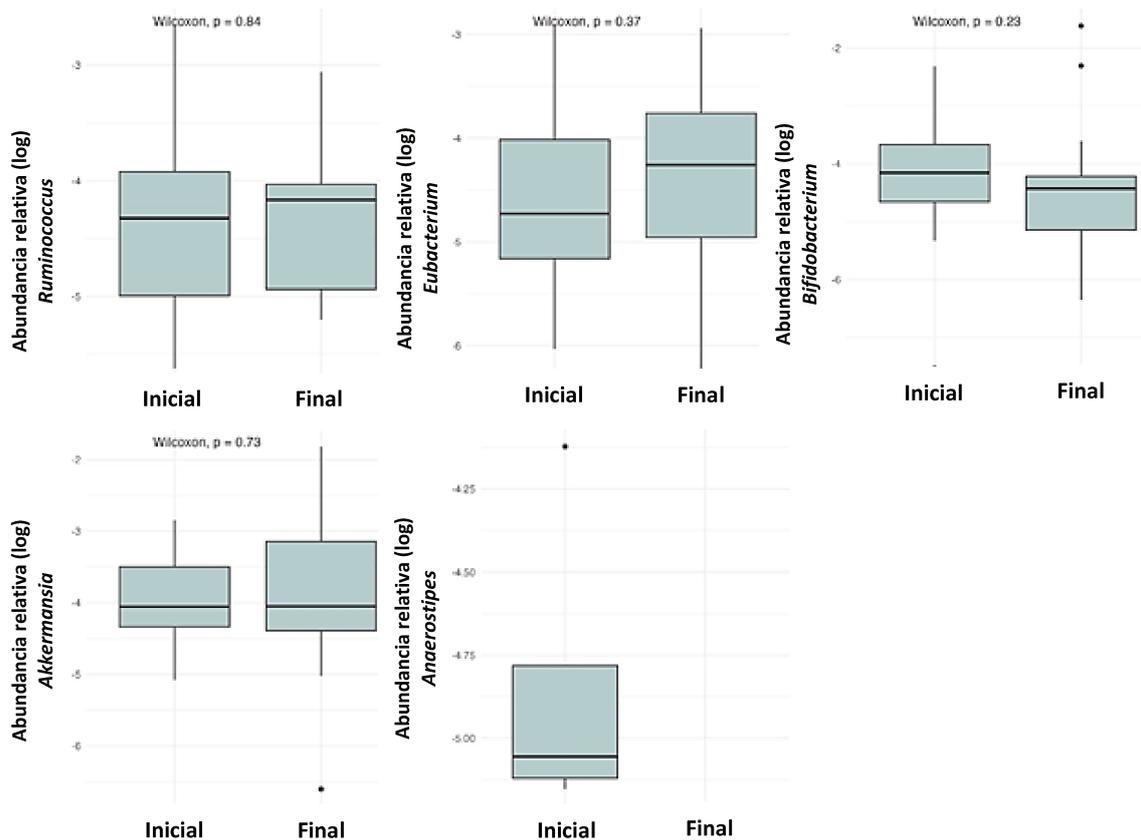


Fig. 6.10. Diferencias en la abundancia de géneros específicos antes y después del consumo del yogur (se eliminaron *Butyricimonas* y *Lactobacillus* debido a los pocos puntos de datos y se incluyeron *Ruminococcus* y *Eubacterium*).

También se hizo foco en la abundancia relativa de *Proteobacteria*, un filo naturalmente presente en la microbiota intestinal humana, pero en una menor proporción en comparación con *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*. Altos niveles de *Proteobacteria* en el intestino podrían reflejar una estructura inestable de la microbiota, como ocurre normalmente en casos de desórdenes metabólicos e inflamación intestinal (Shin et al., 2015). En este sentido, numerosos estudios respaldan el concepto de que un aumento de proteobacterias en el intestino puede reflejar una disbiosis o una estructura inestable de la comunidad microbiana intestinal (Grabherr et al., 2019). En este estudio no se observaron diferencias significativas a nivel grupal en la abundancia de especies dentro del filo *Proteobacteria* entre los dos puntos de muestreo. A pesar de esto, se pudo detectar una tendencia a disminuir luego de la administración del yogur, y para algunos participantes, se observó una reducción en la abundancia de algunas familias de *Proteobacteria* (Fig. 6.11).

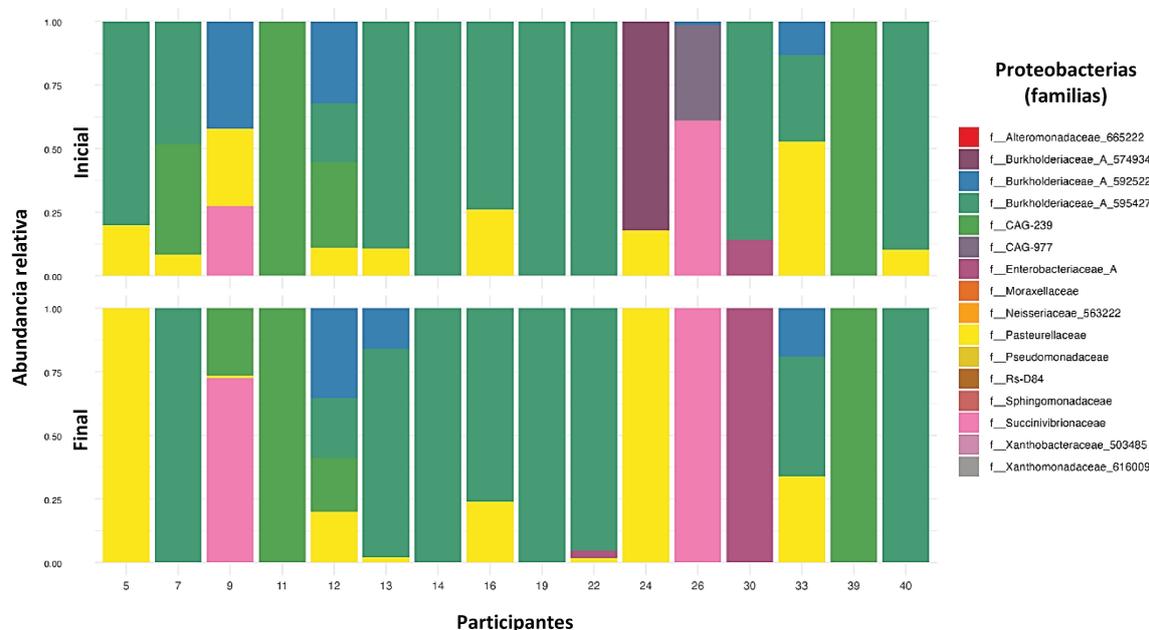


Fig. 6.11. Composición de las familias de *Proteobacteria* en muestras de materia fecal de algunos participantes (16 de 43) recolectadas antes y después del consumo del yogur.

Las modificaciones observadas en la mejora de síntomas/síndromes gastrointestinales y de algunos parámetros sanguíneos (aumento del recuento de glóbulos rojos, hematocrito, hemoglobina, colesterol HDL, y disminución del recuento de glóbulos blancos), podrían atribuirse a los ligeros cambios observados en la composición de la microbiota y a la producción de metabolitos microbianos en el intestino. Posiblemente, la ausencia de efectos indeseados durante este estudio y la mejora efectiva de los síntomas gastrointestinales podrían deberse a la remoción de gran parte de la lactosa en el yogur y a la presencia de GOS prebióticos (Sharp et al., 2021). Se ha reportado que los GOS promueven el crecimiento de bacterias beneficiosas, en

particular productoras de butirato (Wilson y Whelan, 2017). La mejoría de los síntomas gastrointestinales tras la ingesta de yogur se ha registrado en estudios previos (Hadjimbei et al., 2022; Watanabe et al., 2018). Un reciente estudio de revisión presenta los posibles mecanismos subyacentes a este beneficio para la salud (Mukherjee et al., 2024). Algunos indicios del efecto del consumo de un yogur incrementado en proteínas (5 g/100 g) sobre los niveles de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IFN-g y TNF-a) fueron observados en ratones con obesidad inducida por la dieta, donde se detectó una reducción de dichas citoquinas (en machos en mayor medida que en hembras). Este efecto antiinflamatorio fue acompañado por un aumento de los niveles de IL-10, cuya principal acción biológica es controlar la respuesta inflamatoria (Siroli et al., 2021). En conjunto, los resultados del estudio de Siroli et al. (2021) indicarían una disminución en marcadores de inflamación en ratones con obesidad inducida luego del consumo de yogur.

La asociación entre la ingesta de yogur y sus beneficios para la salud, específicamente el efecto en el control del peso corporal, se ha estudiado en numerosos trabajos (Eales et al., 2016; El Khoury et al., 2014; Hadjimbei et al., 2022; Jacques y Wang, 2014; Khorraminezhad y Rudkowska, 2021; Panahi y Tremblay, 2016; Thomas et al., 2011; Wang et al., 2021; Watanabe et al., 2018; Zemel et al., 2005), pero los resultados no son concluyentes en cuanto a los mecanismos que subyacen a estos efectos. Diferencias en la calidad de la dieta entre países/regiones y otros factores confundidores como la actividad física, el estilo de vida, la composición del yogur administrado, el nivel de consumo del yogur, necesitan ser considerados para establecer una comparación válida entre estudios (Jacques y Wang, 2014).

Aunque los mecanismos detrás de estos hallazgos son poco claros, la evidencia sugiere que cambios en la microbiota, y, en consecuencia, en la producción de metabolitos intestinales podrían influenciar en el peso corporal. En primer lugar, el yogur tiene un rol en el control del apetito, ya que puede reemplazar a alimentos menos saludables. Su contenido de nutrientes específicos como las proteínas y el calcio, las características estructurales y texturales de su matriz y el hecho de contener microorganismos vivos también respaldarían este efecto. Las principales hipótesis propuestas para explicar el efecto de la saciedad provocada por el yogur justamente coinciden en la ralentización del vaciado gástrico por las proteínas contenidas en el yogur y la forma en que éstas se encuentran (medio ácido, conformando una estructura semisólida, con mayor consistencia y viscosidad que la leche de partida), y la inducción de hormonas y péptidos relacionados con la saciedad (Yanni et al., 2021). Sin embargo, la mayoría de los trabajos mencionados estudian el efecto de yogur con contenido regular de proteínas (3,3-4 g/100 g), por lo que se necesita mayor evidencia sobre el efecto de yogures incrementados en proteínas, sobre todo en cuanto al efecto de su consumo a largo plazo (Khorraminezhad y Rudkowska, 2021; Wang et al., 2021).

Es importante considerar que el presente estudio contó con algunas limitaciones. En primer lugar, fue un estudio de una sola rama, por lo que no se contó con un grupo control, limitando la comparación de resultados. La decisión de adoptar un diseño de este tipo se debió a la gran

dificultad que se presentó a la hora de reclutar participantes por los numerosos criterios de inclusión/exclusión. A esto se suma la falta de costumbre de nuestra sociedad de participar en estudios de este tipo. También se podrían haber incluido más puntos de muestreo de sangre y materia fecal, durante y en un periodo post administración de yogur, o plantear una mayor duración de la administración de yogur para obtener una mejor perspectiva de la estabilidad de los parámetros medidos y los cambios inducidos por la intervención. Sin embargo, esto no fue posible por el presupuesto limitado con el que se contaba. Una actividad pendiente que no se pudo realizar al momento del estudio, es analizar la concentración de ácidos grasos de cadena corta (butirato, acetato y propionato) en las muestras de materia fecal para evaluar, de manera indirecta, el impacto de la intervención en los productores de butirato.

A pesar de las limitaciones, también es importante resaltar las fortalezas de este estudio. Fue el primer estudio en humanos realizado en el INLAIN, y el primero de su tipo en la región. Además, nos permitió estudiar el efecto de un producto desarrollado en el instituto en el marco de esta tesis. Por otra parte, el estudio de la composición de la microbiota de individuos con sobrepeso contribuye en la expansión de los datos reportados a la fecha para nuestra región. Como ya se mencionó, los estudios de administración de yogures incrementados en proteínas son escasos, constituyendo una contribución de interés que permite vincular el desarrollo tecnológico y sus implicancias en la salud de una población.

3. Conclusiones

La administración de un yogur incrementado en proteínas, parcialmente descremado y reducido en lactosa, y con GOS, desarrollado en esta tesis, durante 4 semanas a un grupo de individuos con sobrepeso de la ciudad de Santa Fe (Argentina), mostró modificaciones en ciertos parámetros sanguíneos (aumento del recuento de glóbulos rojos, hematocrito, hemoglobina y colesterol HDL, y disminución del recuento de glóbulos blancos), y se detectaron diferencias menores en la composición de la microbiota intestinal. El dato más relevante de este estudio fue la mejora de los síntomas y síndromes gastrointestinales percibida por los participantes. Este aspecto fue destacado por ellos como una mejora en su sensación de bienestar.

El yogur es un alimento rico en nutrientes y fácil de digerir que contiene microorganismos vivos, y que es elegido por muchas personas. Es fácil de introducir en la mayoría de las dietas y su consumo puede limitar la ingesta de alimentos menos saludables, contribuyendo potencialmente a mejorar la salud pública.

Conclusiones

En los últimos años se ha registrado una tendencia marcada hacia el consumo de yogures con funcionalidad incrementada, tales como altos en proteína, reducidos en lactosa y con agregado de fibras (algunas reconocidas como prebióticas), entre otros. A lo largo de esta tesis se logró desarrollar una serie de formulaciones de yogur incrementado en proteínas (>5,6 g/100 g), parcialmente descremados (<1,5 g/100 g), reducidos en lactosa (lactosa residual <30% del contenido original), y con GOS, utilizando, para incrementar el contenido proteico, diversos ingredientes lácteos (leche en polvo descremada, concentrados de proteínas de suero al 35% y al 80%, proteínas de suero microparticuladas, aislado de proteínas de suero de leche, concentrado de proteínas de leche al 70%) y tecnologías de membrana para la concentración de la leche (UF). Esta Tesis abordó desde la optimización tecnológica, nutricional y estructural de los productos incrementados en proteína a escala laboratorio (desde 6,3 hasta 7,8 g/100 g de proteína), hasta el escalado, aspectos de calidad sensorial, y el estudio de la funcionalidad de uno de los productos formulados, mediante un estudio clínico en humanos. De esta manera, se alcanzó un enfoque integral de la problemática.

Inicialmente, en el **Capítulo 1**, el uso de concentrado de proteínas de suero (WPC35) y proteínas de suero microparticuladas (MWP) en la formulación de la leche base, y un fermento comercial clásico para yogur (compuesto por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*), permitió obtener yogures parcialmente descremados (<1,5 g/100 g de grasa) con aspectos fisicoquímicos y microbiológicos aceptables (recuento de BAL totales de 10^8 ufc/g) y un contenido proteico de 7,0-7,8 g/100 g, 5,1-6,6 g/100 g de lactosa y 161,5-168,2 mg/100 g de calcio. Se observó que las diferencias en la micro y macroestructura, así como en los perfiles de fermentación, formación del gel y perfil de compuestos volátiles, estuvieron influenciadas por las distintas características de las proteínas de suero utilizadas, más que por la concentración de cada una o la relación CN:WP (2:1 y 1,5:1).

En el **Capítulo 2**, la inclusión de concentrado de proteínas de leche (MPC70) y concentrados de proteínas de suero al 35 y al 80% (WPC35 y WPC80, respectivamente) y proteína de suero microparticulada (MWP) en la formulación de la leche base (obteniendo dos relaciones CN:WP -2:1 y 1,5:1- que se compararon con un control de 4:1), utilizando el mismo fermento que en el **Capítulo 1**, permitió alcanzar niveles de proteína aún más elevados (7,3-7,7 g/100 g) y reducir significativamente el contenido de lactosa (2,5-4,5 g/100 g), como también obtener mayores niveles de calcio (173,6-209,5 mg/100 g) respecto a lo alcanzado en el **Capítulo 1**. Se confirmó que la elección de los ingredientes impacta fuertemente en la viscosidad, formación y estructura del gel, y en los niveles presentes de algunos compuestos volátiles (como acetaldehído, diacetilo, acetoina y la mayoría de los ácidos). Microbiológicamente, los productos cumplieron con los requerimientos de la normativa: el recuento de *Streptococcus thermophilus* fue $>10^9$ ufc/g y el de *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* $>10^3$ ufc/g. También se estudió el comportamiento reológico en condiciones orales simuladas, lo que podría relacionarse con la capacidad saciante

del producto, encontrándose diferencias según el ingrediente empleado y no por la relación CN:WP en las condiciones estudiadas. El yogur que contenía WPC80 resultó el de mayor capacidad saciante potencial. Si bien se obtuvieron yogures con menor contenido de lactosa respecto a las primeras experiencias, el alto costo y la disponibilidad limitada de estos ingredientes en Argentina motivó la exploración de alternativas más accesibles.

En el **Capítulo 3**, se evaluó el empleo de retentado de leche obtenido por UF, tecnología que dispone la industria láctea argentina, junto con aislado de proteínas de suero de leche (mWPI) en la formulación de la leche base, y el uso de distintos fermentos (dos de ellos con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*, y uno de ellos conteniendo además cepas potencialmente probióticas de las familias *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactocaseibacillus paracasei*). Se obtuvieron yogures con 7,3 g/100 g de proteína, 3,3 g/100 g de lactosa y 217,6 mg/100 g de calcio, que tuvieron una matriz más densa, mayor viscosidad evaluada en condiciones orales y menor permeabilidad, lo cual se relacionó con una mayor capacidad saciante potencial, en comparación a un yogur con contenido tradicional de proteína (3,2 g/100 g) y los mismos fermentos mencionados. Asimismo, se evidenció que el efecto combinado del fermento y el nivel proteico afectó la formación del gel durante la fermentación. Además, la aplicación o no de agitación (simulando las tecnologías de yogur batido y firme, respectivamente) impactaron directamente en la estructura final del yogur, y en la potencial capacidad saciante.

En el **Capítulo 4**, se mejoró el perfil nutricional del yogur mediante la adición de un ingrediente de fibra de zanahoria y el uso de una β -galactosidasa, para disminuir el contenido de lactosa residual en el yogur, dado que en la formulación de la leche base se emplearon ingredientes con alto contenido de lactosa (SMP y WPC35). Los yogures tuvieron 6,3 g/100 g de proteína y 1,5 g/100 g de lactosa (80% de reducción respecto a la leche base). También ocurrió la formación simultánea de GOS (1 g/100 g). El efecto combinado de la presencia de fibra y enzima impactó en alguna medida el perfil de compuestos volátiles. En general, se hallaron diferencias cuantitativas en el acetaldehído, nonanal, diacetilo y otras cetonas, ácidos butanoico, heptanoico y nonanoico. A pesar de que los grupos químicos de compuestos volátiles no se diferenciaron estadísticamente entre los yogures, el yogur con agregado de fibra presentó predominancia de cetonas a diferencia del resto de los productos, donde el grupo de los ácidos mostró mayores niveles. El agregado de la fibra produjo una mejora de la capacidad de retención de agua, firmeza y viscosidad aparente. Estos atributos potencian el valor funcional del producto, especialmente en el contexto de la salud gastrointestinal y la sensación de saciedad.

Posteriormente, y teniendo en cuenta que el objetivo final era obtener un producto en cantidad suficiente para ser destinado al estudio en humanos, es que se realizó una etapa de validación de los resultados a escala piloto. En la selección del prototipo de yogur para dicho estudio se tuvo en cuenta la disponibilidad y costo de las materias primas e ingredientes (destacándose la relación

costo-calidad como un factor importante en la elección) y la disponibilidad de las instalaciones y equipamiento (**Capítulo 5**). A pesar de algunas diferencias halladas en el perfil de compuestos volátiles (en acetaldehído, hexanal, nonanal, 2-propanona, 2-pentanona, 2-hexanona, 2-octanona, ácido acético y ésteres etílicos) y de algunos parámetros estructurales (CRA y microestructura), en el yogur a escala piloto respecto a los resultados a escala laboratorio, se obtuvo un yogur aceptable desde el punto de vista sensorial y que cumplía los requisitos microbiológicos y fisicoquímicos establecidos en la legislación. De hecho, en el análisis sensorial con panel entrenado, los atributos brillo, consistencia, uniformidad y cremosidad fueron valorados con un puntaje elevado; además, el análisis sensorial con consumidores mostró una alta intención de compra y un nivel de agrado en torno a ‘Me gusta moderadamente’. Los resultados en su conjunto demostraron la viabilidad de utilizar esta formulación de yogur y el protocolo de elaboración a escala piloto para producirlo en cantidad suficiente para el estudio clínico en humanos.

Finalmente, en el **Capítulo 6**, se evaluó la funcionalidad del yogur con 6,3 g/100 g de proteína, 1,4 g/100 g de grasa, 1,6 g/100 g de lactosa y 1,1 g/100 g de GOS, en personas con sobrepeso de la Ciudad de Santa Fe. Se demostró que el consumo a lo largo de cuatro semanas consecutivas tuvo efectos beneficiosos sobre algunos parámetros bioquímicos, con una mejora significativa de síntomas y síndromes gastrointestinales (principalmente en mujeres), y modificaciones en la composición de la microbiota intestinal (asociadas a las familias bacterianas de productores de butirato) en algunos individuos. Estos hallazgos podrían haberse correlacionado con el análisis de ácidos de cadena corta en la materia fecal de los participantes. Sin embargo, los mismos no pudieron llevarse a cabo. Es de destacar que los resultados contribuyen a enriquecer la información disponible sobre la composición de la microbiota intestinal de esta población, para la cual no hay datos reportados. Estas observaciones refuerzan el potencial del yogur como alimento funcional, accesible y con impacto positivo en la salud pública.

En síntesis, esta Tesis aporta valiosa información y resultados inéditos, y demuestra la factibilidad del desarrollo de un alimento innovador para el mercado argentino, con alto valor nutricional y funcional, con características microbiológicas y fisicoquímicas que cumplen con los aspectos normativos (acidez titulable <150 °D, altos recuentos de bacterias lácticas viables y ausencia de coliformes, mohos y levaduras) y con una calidad sensorial aceptable para un producto de este tipo, adaptado a las necesidades y demandas actuales del consumidor. Los hallazgos abren nuevas posibilidades para la producción local de yogur incrementado en proteína, con menor contenido de lactosa, formulados con ingredientes más disponibles y económicos, y con aplicaciones potenciales en un contexto poblacional con tendencia al aumento de condiciones de salud como el sobrepeso y la obesidad.

Bibliografía

- Abbas, H., Shahein, N., Abd Rabou, N., Kassem, J., y Youssef, Y. (2014). Conjugated Linoleic Acid: Biosynthesis, benefits for human health and its contents in milk and milk products. *Life Science Journal*, *11*, 215-227.
- Adolfsson, O., Meydani, S. N., y Russell, R. M. (2004). Yogurt and gut function. *Am J Clin Nutr*, *80*, 245-256. <https://academic.oup.com/ajcn/article/80/2/245/4690304>
- Akalin, A. S., Unal, G., Dinkci, N., y Hayaloglu, A. A. (2012). Microstructural, textural, and sensory characteristics of probiotic yogurts fortified with sodium calcium caseinate or whey protein concentrate. *Journal of Dairy Science*, *95*(7), 3617-3628. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5297>
- Ale, E. C., Ibáñez, R. A., Wilbanks, D. J., Peralta, G. H., Ceylan, F. D., Binetti, A. G., Bolling, B. W., y Lucey, J. A. (2023). Technological role and metabolic profile of two probiotic EPS-producing strains with potential application in yoghurt: Impact on rheology and release of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, *137*. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105533>
- Alvaro, E., Andrieux, C., Rochet, V., Rigottier-Gois, L., Lepercq, P., Sutren, M., Galan, P., Duval, Y., Juste, C., y Doré, J. (2007). Composition and metabolism of the intestinal microbiota in consumers and non-consumers of yogurt. *British Journal of Nutrition*, *97*(1), 126-133. <https://doi.org/10.1017/S0007114507243065>
- Amatayakul, T., Halmos, A. L., Sherkat, F., y Shah, N. P. (2006). Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal*, *16*(1), 40-51. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.01.004>
- Ambrogi, V., Bottacini, F., Cao, L., Kuipers, B., Schoterman, M., y van Sinderen, D. (2023). Galacto-oligosaccharides as infant prebiotics: production, application, bioactive activities and future perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *63*(6), 753-766. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1953437>
- Anderson, J. W., Baird, P., Davis Jr, R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., Waters, V., y Williams, C. L. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*, *67*(4), 188-205. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00189.x>
- Andrews, S. (2010). *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data*. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Anema, S. G., Siew, Lee, K., y Klostermeyer, H. (2006). Effect of Protein, Nonprotein-Soluble Components, and Lactose Concentrations on the Irreversible Thermal Denaturation of Lactoglobulin and r-Lactalbumin in Skim Milk. *J. Agric. Food Chem.*, *54*, 7339-7348. <https://doi.org/10.1021/jf061508>
- ANMAT. (2006). *Código Alimentario Argentino (CAA) – Capítulo VIII- Alimentos Lácteos. Artículo 576 - (Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyA N° 33/2006 y N° 563/2006)* https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo_viii_lacteosactualiz_2025-03.pdf

- ANMAT. (2007). *Código Alimentario Argentino (CAA) – Capítulo VIII, Artículo 576. Resolución conjunta SPRyRS N°68/2007 y SAGPyA N° 196/2007.* <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-68-2007-128630>.
- ANMAT. (2021). *Código Alimentario Argentino (CAA) - Cap. XVII: . Alimentos de régimen o dietéticos. Artículo 1372 y 1372 bis – (Resolución Conjunta SCS y SAByDR N°19/2021).* https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo_xvii_dieteticosactualiz_2024-08.pdf. En *Cap. XVII: aditivos alimentarios*.
- AOAC International. (2007). *AOAC 945.46-19454: 2007 Cenizas en Leche - Método Gravimétrico.*
- AOAC International. (2012a). AOAC Official Method 989.05. En *Official Methods of Analysis. Fat in Milk - Modified Mojonnier Ether Extract.* AOAC International.
- AOAC International. (2012b). AOAC Official Method 990.19. En *Official Methods of Analysis. Solids(Total) in Milk - By Forced Air Oven Dry.* AOAC International.
- AOAC International. (2012c). AOAC Official Method 991.20. En *Official Methods of Analysis. Nitrogen(Total) in Milk - Kjeldahl Methods.* AOAC International.
- AOAC Official Method 991.25. (2007). *Calcium, magnesium, and phosphorus in cheese. Atomic absorption spectrophotometric and colorimetric methods, 18th Edition. Chapter 33, p. 81.*
- Arab, M., Yousefi, M., Khanniri, E., Azari, M., Ghasemzadeh-Mohammadi, V., y Mollakhalili-Meybodi, N. (2023). A comprehensive review on yogurt syneresis: effect of processing conditions and added additives. *Journal of Food Science and Technology*, 60(6), 1656-1665. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05403-6>
- Arango Bedoya, O. (2015). *Aplicación de dispersión de luz de infrarrojo próximo en la producción de derivados lácteos bajos en grasa con inulina.* Universidad Autónoma de Barcelona.
- Arango, O., Trujillo, A. J., y Castillo, M. (2020). Inline control of yoghurt fermentation process using a near infrared light backscatter sensor. *Journal of Food Engineering*, 277. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109885>
- Arla Foods Ingredients. (s. f.). *Clean Label Textures.* Recuperado 11 de abril de 2025, de <https://www.arlafoodsingredients.com/dairy/solutions-functionalities/clean-label-textures/>
- Aryana, K. J., y Olson, D. W. (2017). A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 9987-10013. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12981>
- Babio, N., Mena-Sánchez, G., y Salas-Salvadó, J. (2017). Beyond the nutritional value of yogurt: a diet quality indicator? *Nutricion Hospitalaria*, 34, 26-30. <https://doi.org/10.20960/NH.1567>
- Bakirci, S., Dagdemir, E., Boran, O. S., y Hayaloglu, A. A. (2017). The effect of pumpkin fibre on quality and storage stability of reduced-fat set-type yogurt. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 180-187. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13264>

- Bandyopadhyay, S., Kashyap, S., Calvez, J., Devi, S., Azzout-Marniche, D., Tome, D., Kurpad, A. V., y Gaudichon, C. (2022). Evaluation of Protein Quality in Humans and Insights on Stable Isotope Approaches to Measure Digestibility - A Review. En *Advances in Nutrition* (Vol. 13, Número 4, pp. 1131-1143). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/advances/nmab134>
- Banks, J., y Weimer, B. (2007). Producing low fat cheese. Improving the Flavour of Cheese. En B. Weimer (Ed.), *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. 520-536).
- Barakat, H., Mohamed, A., Gemiel, D. G., y Atallah, A. A. (2021). Microstructural, volatile compounds, microbiological and organoleptical characteristics of low-fat buffalo milk yogurt enriched with whey protein concentrate and ca-caseinate during cold storage. *Fermentation*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/fermentation7040250>
- Barba, G., y Russo, P. (2006). Dairy foods, dietary calcium and obesity: A short review of the evidence. En *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* (Vol. 16, Número 6, pp. 445-451). <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2006.04.004>
- Barone, G., O'Regan, J., Kelly, A. L., y O'Mahony, J. A. (2022). Interactions between whey proteins and calcium salts and implications for the formulation of dairy protein-based nutritional beverage products: A review. En *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 21, Número 2, pp. 1254-1274). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12884>
- Beaulieu, M., Pouliot, Y., y Pouliot, M. (1999). Thermal aggregation of whey proteins in model solutions as affected by casein/whey protein ratios. *Journal of Food Science*, 64(5), 776-780. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb15910.x>
- Bertenshaw, E. J., Lluch, A., y Yeomans, M. R. (2013). Perceived thickness and creaminess modulates the short-term satiating effects of high-protein drinks. *British Journal of Nutrition*, 110(3), 578-586. <https://doi.org/10.1017/S0007114512005375>
- Bianchi, G., Nuzzi, M., Leva, A. A., y Rizzolo, A. (2007). Development of a headspace-solid phase micro extraction method to monitor changes in volatile profile of rose (*Rosa hybrida*, cv David Austin) petals during processing. *Journal of Chromatography A*, 1150(1-2), 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.012>
- Bierzuńska, P., Cais-Sokolińska, D., y Yiğit, A. (2019). Storage Stability of Texture and Sensory Properties of Yogurt with the Addition of Polymerized Whey Proteins. *Foods*, 8(11), 548. <https://doi.org/10.3390/foods8110548>
- Biliaderis, C. G., Khan, M. M., y Blank, G. (1992). Rheological and sensory properties of yogurt from skim milk and ultrafiltered retentates. *International Dairy Journal*, 2(5), 311-323. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(92\)90035-K](https://doi.org/10.1016/0958-6946(92)90035-K)
- Bong, D. D., y Moraru, C. I. (2014). Use of micellar casein concentrate for Greek-style yogurt manufacturing: Effects on processing and product properties. *Journal of Dairy Science*, 97(3), 1259-1269. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7488>

- Bowen, J., Noakes, M., y Clifton, P. M. (2006). Appetite regulatory hormone responses to various dietary proteins differ by body mass index status despite similar reductions in ad Libitum energy intake. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(8), 2913-2919. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0609>
- Bradley, R. L., Arnold, E., Barbano, D. M., Semerad, R. G., Smith, D. E., y Vines, B. K. (1992). Chemical and physical methods. En R. T. Marshall (Ed.), *Standard Methods for the Examinations of Dairy Products* (16th ed.). American Public Health Association.
- Brodziak, A., Król, J., Barłowska, J., Teter, A., y Florek, M. (2020). Changes in the physicochemical parameters of yoghurts with added whey protein in relation to the starter bacteria strains and storage time. *Animals*, 10(8), 1-21. <https://doi.org/10.3390/ani10081350>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., y Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Cândido de Souza, W. F., Souza do Amaral, C. R., y Lima da Silva Bernardino, P. D. (2021). The addition of skim milk powder and dairy cream influences the physicochemical properties and the sensory acceptance of concentrated Greek-style yogurt. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 24, 100349. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2021.100349>
- Cantú, S. M., Lee, H. J., Donoso, A., Puyó, A. M., y Peredo, H. A. (2017). El ácido araquidónico y sus derivados. generalidades de los prostanoïdes en relación con procesos inflamatorios. *Ciencia e Investigación*, 67(4), 5-13.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., y Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(supplement_1), 4516-4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Cassol, I., Ibañez, M., y Bustamante, J. P. (2025). Key features and guidelines for the application of microbial alpha diversity metrics. *Scientific Reports*, 15(1), 622. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77864-y>
- Castillo, M. (2001). *Cutting Time Prediction Methods in Cheese Making*. <https://doi.org/10.1081/E-EAFE-120040365>
- Cenini, V. L., Gallagher, L., McKerr, G., McCarthy, N. A., McSweeney, D. J., Auty, M. A. E., y O'Hagan, B. M. G. (2020). A novel approach for dynamic in-situ surface characterisation of milk protein concentrate hydration and reconstitution using an environmental scanning electron microscope. *Food Hydrocolloids*, 108, 105881. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105881>
- Chandan, R. C. (2006). *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks* (R. C. Chandan, C. H. White, A. Kilara, y Y. H. Hui, Eds.; 1st ed.). Blackwell Publishing Ltd.
- Chandan, R. C. (2017). An overview of yogurt production and composition. En *Yogurt in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805134-4.00002-X>

- Chao, H.-C., Lai, M.-W., Kong, M.-S., Chen, S.-Y., Chen, C.-C., y Chiu, C.-H. (2008). Cutoff Volume of Dietary Fiber to Ameliorate Constipation in Children. *The Journal of Pediatrics*, *153*(1), 45-49.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2007.12.044>
- Chaves, A. C. S. D., Fernandez, M., Lerayer, A. L. S., Mierau, I., Kleerebezem, M., y Hugenholtz, J. (2002). Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(11), 5656-5662. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5656-5662.2002>
- Chen, B., Zhao, X., Cai, Y., Jing, X., Zhao, M., Zhao, Q., y Van der Meeren, P. (2023). Incorporation of modified okara-derived insoluble soybean fiber into set-type yogurt: Structural architecture, rheological properties and moisture stability. *Food Hydrocolloids*, *137*, 108413. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108413>
- Chen, M., Sun, Q., Giovannucci, E., Mozaffarian, D., Manson, J. A. E., Willett, W. C., y Hu, F. B. (2014). Dairy consumption and risk of type 2 diabetes: 3 cohorts of US adults and an updated meta-analysis. *BMC Medicine*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0215-1>
- Cheng, H. (2010). Volatile Flavor Compounds in Yogurt: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *50*(10), 938-950. <https://doi.org/10.1080/10408390903044081>
- Chourasia, R., Chiring Phukon, L., Minhajul Abedin, M., Sahoo, D., y Kumar Rai, A. (2022). Production and characterization of bioactive peptides in novel functional soybean chhurpi produced using *Lactobacillus delbrueckii* WS4. *Food Chemistry*, *387*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132889>
- Chr. Hansen. (s. f.). *YOFLEX*. Recuperado 29 de diciembre de 2024, de <https://www.chr-hansen.com/es/food-cultures-and-enzymes/fresh-dairy/cards/collection-cards/yoflex>
- Chua, D., Deeth, H. C., Oh, H. E., y Bansal, N. (2017). Altering the casein to whey protein ratio to enhance structural characteristics and release of major yoghurt volatile aroma compounds of non-fat stirred yoghurts. *International Dairy Journal*, *74*, 63-73. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.05.002>
- Chuah, L. O., y Mao, Y. (2020). Stability assessment and improvement of a *Lactobacillus plantarum* mutant with low post-fermentation acidification characteristics. *Journal of Dairy Science*, *103*(9), 7898-7907. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18285>
- Costa, M. F., Pimentel, T. C., Guimaraes, J. T., Balthazar, C. F., Rocha, R. S., Cavalcanti, R. N., Esmerino, E. A., Freitas, M. Q., Raices, R. S. L., Silva, M. C., y Cruz, A. G. (2019). Impact of prebiotics on the rheological characteristics and volatile compounds of Greek yogurt. *LWT*, *105*, 371-376. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.007>
- Crisà, A. (2013). Milk Carbohydrates and Oligosaccharides. En Y. W. Park y G. F. Haenlein (Eds.), *Milk and dairy products in human nutrition. Production, composition and health* (pp. 129-141). John Wiley y Sons Ltd.
- da Silva, A. T., de Lima, J. J., Reis, P., Passos, M., Baumgartner, C. G., Sereno, A. B., Krüger, C. C. H., y Cândido, L. M. B. (2022). Application of Lactose-Free Whey Protein to Greek Yogurts: Potential Health Benefits and Impact on Rheological Aspects and Sensory Attributes. *Foods*, *11*(23). <https://doi.org/10.3390/foods11233861>

- Dabija, A., Codină, G. G., Gâțlan, A.-M., y Rusu, L. (2018). Quality assessment of yogurt enriched with different types of fibers. *CyTA - Journal of Food*, 16(1), 859-867. <https://doi.org/10.1080/19476337.2018.1483970>
- Dabija, A., Codină, G. G., y Sidor, P. S. A. M. (2017). Effect of different fibre types addition on the yogurts quality. *Proceedings of 17th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2017*, 655-664.
- Dabour, N., Elsaadany, K., Shoukry, E., Hamdy, S., Taïbi, A., y Kheadr, E. (2022). The ability of yoghurt supplemented with dietary fibers or brans extracted from wheat or rice to reduce serum lipids and enhance liver function in male hypercholesterolemic rats. *Journal of Food Biochemistry*, 46(12). <https://doi.org/10.1111/jfbc.14499>
- Dalgleish, D. G., y Law, A. J. R. (1988). pH-Induced dissociation of bovine casein micelles. I. Analysis of liberated caseins. *Journal of Dairy Research*, 55(4), 529-538. <https://doi.org/10.1017/S0022029900033306>
- Dan, T., Wang, D., Jin, R. L., Zhang, H. P., Zhou, T. T., y Sun, T. S. (2017). Characterization of volatile compounds in fermented milk using solid-phase microextraction methods coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 100(4), 2488-2500. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11528>
- de Graaf, C. (2012). Texture and satiation: The role of oro-sensory exposure time. *Physiology y Behavior*, 107(4), 496-501. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.05.008>
- de la Fuente, M. A., Montes, F., Guerrero, G., y Juárez, M. (2003). Total and soluble contents of calcium, magnesium, phosphorus and zinc in yoghurts. *Food Chemistry*, 80(4), 573-578. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00505-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00505-8)
- Delikanli, B., y Ozcan, T. (2014). Effects of various whey proteins on the physicochemical and textural properties of set type nonfat yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 67(4), 495-503. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12142>
- Delikanli, B., y Ozcan, T. (2017). Improving the Textural Properties of Yogurt Fortified with Milk Proteins. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(5). <https://doi.org/10.1111/jfpp.13101>
- Delisle, J., Amiot, J., y Dore, F. (1995). Biological Availability of Calcium and Magnesium from Dairy Products. En *Int. Dairy Journal* (Vol. 5).
- Deshmukh, N., Rao, P. S., Sharma, H., M.H., S. K., N., L. N., y C.T., M. K. (2024). Waste to nutrition: The evolution of whey, a byproduct to galactooligosaccharides production. *Food Chemistry Advances*, 4, 100642. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100642>
- Dhingra, D., Michael, M., Rajput, H., y Patil, R. T. (2012). Dietary fibre in foods: A review. En *Journal of Food Science and Technology* (Vol. 49, Número 3, pp. 255-266). <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0365-5>
- Díaz de Apodaca, E. (2018). *Clean Label: de tendencia a exigencia*. TecNALIA, <https://www.tecnalia.com/blog/clean-label-tendencia-exigencia>. Último acceso: 21 de diciembre 2023.

- Dong, R., Liao, W., Xie, J., Chen, Y., Peng, G., Xie, J., Sun, N., Liu, S., Yu, C., y Yu, Q. (2022). Enrichment of yogurt with carrot soluble dietary fiber prepared by three physical modified treatments: Microstructure, rheology and storage stability. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*, 75, 102901. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102901>
- Eales, J., Lenoir-Wijnkoop, I., King, S., Wood, H., Kok, F. J., Shamir, R., Prentice, A., Edwards, M., Glanville, J., y Atkinson, R. L. (2016). Is consuming yoghurt associated with weight management outcomes? Results from a systematic review. *International Journal of Obesity*, 40(5), 731-746. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.202>
- El Khoury, D., Brown, P., Smith, G., Berengut, S., Panahi, S., Kubant, R., y Anderson, G. H. (2014). Increasing the protein to carbohydrate ratio in yogurts consumed as a snack reduces post-consumption glycemia independent of insulin. *Clinical Nutrition*, 33(1), 29-38. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2013.03.010>
- El-Kholy, W. M., Aamer, R. A., y Ali, A. N. A. (2020). Utilization of inulin extracted from chicory (*Cichorium intybus* L.) roots to improve the properties of low-fat synbiotic yoghurt. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(1), 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2020.02.002>
- Elwood, P. C., Pickering, J. E., Ian Givens, D., y Gallacher, J. E. (2010). The consumption of milk and dairy foods and the incidence of vascular disease and diabetes: An overview of the evidence. *Lipids*, 45(10), 925-939. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3412-5>
- EMR. (2024). *Visión General del Mercado de Yogur en Argentina*. <https://www.informesdeexpertos.com/informes/mercado-de-yogur-en-argentina>
- Espírito-Santo, A. P., Lagazzo, A., Sousa, A. L. O. P., Perego, P., Converti, A., y Oliveira, M. N. (2013). Rheology, spontaneous whey separation, microstructure and sensorial characteristics of probiotic yoghurts enriched with passion fruit fiber. *Food Research International*, 50(1), 224-231. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.012>
- Fabre, M., Mathieu, B., Tiollier, E., Leduc, C., Clauss, M., Marchand, A., Robineau, J., Piscione, J., Serenari, T., Brasy, J., Guerville, M., Ligneul, A., y Bigard, X. (2022). Effects of Native Whey Protein and Carbohydrate Supplement on Physical Performance and Plasma Markers of Muscle Damage and Inflammation during a Simulated Rugby Sevens Tournament: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled, Crossover Study. *Nutrients*, 14(22), 4780. <https://doi.org/10.3390/nu14224780>
- FAO/OMS. (2011a). *Codex Alimentarius - Leche y productos lácteos*. <https://www.fao.org/3/i2085s/i2085s.pdf>
- FAO/OMS. (2011b). *Dietary protein quality evaluation in human nutrition - Report of an FAO Expert Consultation*.
- Fazilah, N. F., Ariff, A. B., Khayat, M. E., Rios-Solis, L., y Halim, M. (2018). Influence of probiotics, prebiotics, synbiotics and bioactive phytochemicals on the formulation of functional yogurt. *Journal of Functional Foods*, 48, 387-399. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.07.039>
- Feng, Y., Zhao, Y., Liu, J., Huang, Z., Yang, X., Qin, P., Chen, C., Luo, X., Li, Y., Wu, Y., Li, X., Huang, H., Hu, F., Hu, D., Liu, Y., y Zhang, M. (2022). Consumption of Dairy Products

- and the Risk of Overweight or Obesity, Hypertension, and Type 2 Diabetes Mellitus: A Dose–Response Meta-Analysis and Systematic Review of Cohort Studies. *Advances in Nutrition*, 13(6), 2165-2179. <https://doi.org/10.1093/advances/nmac096>
- Fernandez-Garcia, E., y McGregor, J. U. (1994). Determination of Organic Acids During the Fermentation and Cold Storage of Yogurt. *Journal of Dairy Science*, 77(10), 2934-2939. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77234-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77234-9)
- Fernández-Macías, J. C., Ochoa-Martínez, A. C., Varela-Silva, J. A., y Pérez-Maldonado, I. N. (2019). Atherogenic Index of Plasma: Novel Predictive Biomarker for Cardiovascular Illnesses. *Archives of Medical Research*, 50(5), 285-294. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2019.08.009>
- Fisberg, M., y Machado, R. (2015). History of yogurt and current patterns of consumption. En *Nutrition Reviews* (Vol. 73, pp. 4-7). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv020>
- Fuentes, C., Morales, G., y Valenzuela, R. (2021). Dairy intake and prevention of overweight or obesity: A review of current evidence. En *Revista Chilena de Nutricion* (Vol. 48, Número 6, pp. 942-954). Sociedad Chilena de Nutricion Bromatologia y Toxicologica. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182021000600942>
- Gaiani, C., Omar, R., El-Kirat-Chatel, S., Cvetkovska, L., Alexander, M., Ray, C., Burgain, J., y Francius, G. (2021). Atomic force microscopy nanoscale analysis: Impact of storage conditions on surface properties of whey protein powders. *Food Hydrocolloids*, 118. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106801>
- Gallo, A., Pellegrino, S., Lipari, A., Pero, E., Ibba, F., Cacciatore, S., Marzetti, E., Landi, F., y Montalto, M. (2023). Lactose malabsorption and intolerance: What is the correct management in older adults? *Clinical Nutrition*, 42(12), 2540-2545. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2023.10.014>
- Garcia-Vicencio, S., Ratel, S., Gryson, C., Masgrau, A., Piponnier, E., Brasy, J., Ruyet, P. Le, Bucas, M., Barachon, N., Visseaux, V., Connan, Y., Montel, F., Lahaye, C., Boirie, Y., y Martin, V. (2018). A Moderate Supplementation of Native Whey Protein Promotes Better Muscle Training and Recovery Adaptations Than Standard Whey Protein – A 12-Week Electrical Stimulation and Plyometrics Training Study. *Frontiers in Physiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01312>
- Gaucheron, F. (2005). The minerals of milk. En *Reproduction Nutrition Development* (Vol. 45, Número 4, pp. 473-483). <https://doi.org/10.1051/rnd:2005030>
- Genovese, D. B., Lozano, J. E., y Rao, M. A. (2007). The Rheology of Colloidal and Noncolloidal Food Dispersions. *Journal of Food Science*, 72(2). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00253.x>
- Giacometti Cavalheiro, F., Parra Baptista, D., Domingues Galli, B., Negrão, F., Nogueira Eberlin, M., y Lúcia Gigante, M. (2020). High protein yogurt with addition of *Lactobacillus helveticus*: Peptide profile and angiotensin-converting enzyme ACE-inhibitory activity. *Food Chemistry*, 333. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127482>

- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., y Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. En *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 14, Número 8, pp. 491-502). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Gilbert, A., Rioux, L.-E., St-Gelais, D., y Turgeon, S. L. (2020). Studying stirred yogurt microstructure using optical microscopy: How smoothing temperature and storage time affect microgel size related to syneresis. *Journal of Dairy Science*, *103*(3), 2139-2152. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16787>
- Gilbert, A., y Turgeon, S. L. (2021). Studying stirred yogurt microstructure and its correlation to physical properties: A review. *Food Hydrocolloids*, *121*, 106970. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106970>
- Gomes da Costa, G., Pereira da Silva, L., Escobar da Silva, L., Carvalho Andraus, R. A., Nobre Costa, G., y Sifuentes dos Santos, J. (2020). Characterization of protein-enriched yogurt and its effects on the lean body weight gain and electrical activity in skeletal muscle of physically active individuals. *Research, Society and Development*, *9*(10), e8349109153. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i10.9153>
- Gomes, E. R., Barroso dos Anjos Pinto, C., Stephani, R., Fernandes de Carvalho, A., y Perrone, Í. T. (2023). Effect of adding different types of soluble fibre to high-protein yoghurts on water holding capacity, particle size distribution, apparent viscosity, and microstructure. *International Dairy Journal*, *141*, 105609. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105609>
- Gómez-Gallego, C., Gueimonde, M., y Salminen, S. (2018). The role of yogurt in food-based dietary guidelines. *Nutrition Reviews*, *76*, 29-39. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy059>
- González Cocaro, I., Rabaquino, L., y Rodríguez Muniz, G. (2017). *Uso de Optigraph para estimar capacidad coagulativa de leche de vaca en un rodeo comercial*. Universidad de la República - Facultad de Veterinaria.
- González de Llano, D., Rodríguez, A., y 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 Microbiology*, *80*(5), 570-276.
- González-Martínez, C., Becerra, M., Cháfer, M., Albors, A., Carot, J. M., y Chiralt, A. (2002). Influence of substituting milk powder for whey powder on yoghurt quality. *Trends in Food Science y Technology*, *13*, 334-340.
- Gosling, A., Stevens, G. W., Barber, A. R., Kentish, S. E., y Gras, S. L. (2010). Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food Chemistry*, *121*(2), 307-318. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.063>
- Grabherr, F., Grandner, C., Effenberger, M., Adolph, T. E., y Tilg, H. (2019). Gut Dysfunction and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Frontiers in Endocrinology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00611>

- Guénard-Lampron, V., St-Gelais, D., Villeneuve, S., y Turgeon, S. L. (2020). Short communication: Effect of stirring operations on changes in physical and rheological properties of nonfat yogurts during storage. *Journal of Dairy Science*, *103*(1), 210-214. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16434>
- Guggisberg, D., Eberhard, P., y Albrecht, B. (2007). Rheological characterization of set yoghurt produced with additives of native whey proteins. *International Dairy Journal*, *17*(11), 1353-1359. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.01.013>
- Güler, Z., y 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*, *01*(01), 1-8. <https://doi.org/10.4236/ojas.2011.11001>
- Güler-Akın, M. B., Goncu, B., y Akın, M. S. (2018). Some Properties of Bio-Yogurt Enriched with Cellulose Fiber. *Advances in Microbiology*, *08*(01), 54-64. <https://doi.org/10.4236/aim.2018.81005>
- Guo, Q., Kang, J., Bai, Y., y Xu, F. (2018). Dietary Fiber: Chemistry, Structure, and Properties. *Journal of Chemistry*, *2*, 1328797.
- Guzmán-González, M., Morais, F., y Amigo, L. (2000). Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low-fat set-type yoghurt model system. Use of caseinates, co-precipitate and blended dairy powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(4), 433-438. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0010\(200003\)80:4<433::aid-jsfa545>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0010(200003)80:4<433::aid-jsfa545>3.0.co;2-b)
- Guzmán-González, M., Morais, F., Ramos, M., y Amigo, L. (1999). Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low fat set-type yoghurt model system. I: Use of whey protein concentrates, milk protein concentrates and skimmed milk powder. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *79*(8), 1117-1122. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199906\)79:8<1117::AID-JSFA335>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199906)79:8<1117::AID-JSFA335>3.0.CO;2-F)
- Gyawali, R., y Ibrahim, S. A. (2018). Addition of pectin and whey protein concentrate minimises the generation of acid whey in Greek-style yogurt. *Journal of Dairy Research*, *85*(2), 238-242. <https://doi.org/10.1017/S0022029918000109>
- Hadjimbei, E., Botsaris, G., y Chrysostomou, S. (2022). Beneficial Effects of Yoghurts and Probiotic Fermented Milks and Their Functional Food Potential. *Foods*, *11*(17), 2691. <https://doi.org/10.3390/foods11172691>
- Hammouri, H. M., Sabo, R. T., Alsaadawi, R., y Kheirallah, K. A. (2020). Handling Skewed Data: A Comparison of Two Popular Methods. *Applied Sciences*, *10*(18), 6247. <https://doi.org/10.3390/app10186247>
- Haque, A., Richardson, R. K., y Morris, E. R. (2001). Effect of fermentation temperature on the rheology of set and stirred yogurt. *Food Hydrocolloids*, *15*(4-6), 593-602. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00090-X](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00090-X)
- Hasani, S., Sari, A. A., Heshmati, A., y Karami, M. (2017). Physicochemical and sensory attributes assessment of functional low-fat yogurt produced by incorporation of barley bran

- and *Lactobacillus acidophilus*. *Food Science y Nutrition*, 5(4), 875-880. <https://doi.org/10.1002/fsn3.470>
- Hashemi Gahruie, H., Eskandari, M. H., Mesbahi, G., y Hanifpour, M. A. (2015). Scientific and technical aspects of yogurt fortification: A review. En *Food Science and Human Wellness* (Vol. 4, Número 1, pp. 1-8). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.03.002>
- Hashim, I. B., Khalil, A. H., y Afifi, H. S. (2009). Quality characteristics and consumer acceptance of yogurt fortified with date fiber. *Journal of Dairy Science*, 92(11), 5403-5407. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2234>
- Hassan, A. N., Corredig, M., y Frank, J. F. (2002). Capsule Formation by Nonropy Starter Cultures Affects the Viscoelastic Properties of Yogurt During Structure Formation. *Journal of Dairy Science*, 85(4), 716-720. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74128-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74128-3)
- Hassan, A. N., Ipsen, R., Janzen, T., y Qvist, K. B. (2003). Microstructure and Rheology of Yogurt Made with Cultures Differing Only in Their Ability to Produce Exopolysaccharides. *Journal of Dairy Science*, 86(5), 1632-1638. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73748-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73748-5)
- Haug, A., Høstmark, A. T., y Harstad, O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition - A review. En *Lipids in Health and Disease* (Vol. 6). <https://doi.org/10.1186/1476-511X-6-25>
- He, S., Wu, Y., Wang, H., Jellicoe, M., Young, D. J., Thennadil, S., y Raston, C. L. (2024). Nutrition and stability enhancement of yoghurt fortified with encapsulated algae oil through vortex fluidic device. *LWT*, 191, 115413. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115413>
- He, Y., Wang, B., Wen, L., Wang, F., Yu, H., Chen, D., Su, X., y Zhang, C. (2022). Effects of dietary fiber on human health. *Food Science and Human Wellness*, 11(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2021.07.001>
- Heck, A. J., Schäfer, J., Nöbel, S., y Hinrichs, J. (2021). Fat-free fermented concentrated milk products as milk protein-based microgel dispersions: Particle characteristics as key drivers of textural properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, March, 1-32. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12829>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., y Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 506-514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hill, T. R. (2022). Vitamins and Minerals in Milk: Levels and Effects of Dairy Processing. En P. L. H. McSweeney, J. A. O'Mahony, y A. L. Kelly (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry* (4th ed., Vol. 3, pp. 417-456). Springer.
- Hogenkamp, P. S., y Schiöth, H. B. (2013). Effect of oral processing behaviour on food intake and satiety. *Trends in Food Science y Technology*, 34(1), 67-75. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.08.010>

- Hoppert, K., Zahn, S., Jänecke, L., Mai, R., Hoffmann, S., y Rohm, H. (2013). Consumer acceptance of regular and reduced-sugar yogurt enriched with different types of dietary fiber. *International Dairy Journal*, 28(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.08.005>
- Horiuchi, H., y Sasaki, Y. (2012). Short communication: Effect of oxygen on symbiosis between *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Dairy Science*, 95(6), 2904-2909. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5147>
- Horne, D. S. (1998). Casein Interactions: Casting Light on the Black Boxes, the Structure in Dairy Products. *International Dairy Journal*, 8(3), 171-177. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00040-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00040-5)
- Hossain, M. K., Keidel, J., Hensel, O., y Diakité, M. (2020). The impact of extruded microparticulated whey proteins in reduced-fat, plain-type stirred yogurt: Characterization of physicochemical and sensory properties. *LWT*, 134. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109976>
- Huc, D., Michon, C., Bedoussac, C., y Bosc, V. (2016). Design of a multi-scale texture study of yoghurts using rheology, and tribology mimicking the eating process and microstructure characterisation. *International Dairy Journal*, 61, 126-134. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.05.003>
- Hur, S. J., Park, G. B., y Joo, S. T. (2007). Biological activities of conjugated linoleic acid (CLA) and effects of CLA on animal products. *Livestock Science*, 110(3), 221-229. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2006.11.002>
- IDF. (1988). *IDF Standard 117A. Yogurt: Enumeration of characteristic microorganisms colony count technique at 37 °C*. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- IDF. (1997). *IDF 152A:1997. Milk and milk products — Determination of fat content — General guidance on the use of butyrometric methods*. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- IDF. (2001). *IDF 020-1/2:2001 - Milk - Determination of nitrogen content - Part 1/2: Determination of nitrogen content using the Kjeldahl method*. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- IDF. (2005). *IDF 151:2005. Yoghurt — Determination of total solid content (Reference method)*. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- IDF. (2012). *IDF 150:2012. Fermented milks - Determination of titratable acidity - Potentiometric method*. Brussels, Belgium: International Dairy Federation. .
- Imarc. (2025). <https://www.imarcgroup.com/yogurt-market>
<https://www.imarcgroup.com/yogurt-market>
- Instituto Nacional de Estadística y Censos (INDEC). (2019). *4° Encuesta Nacional de Factores de Riesgo. Resultados definitivos* (1.ª ed.). Secretaría de Gobierno de Salud de la Nación.
- Isleten, M., y Karagul-Yuceer, Y. (2006). Effects of dried dairy ingredients on physical and sensory properties of nonfat yogurt. *Journal of Dairy Science*, 89(8), 2865-2872. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72559-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72559-0)

- ISO. (2007). *ISO Standard 8589. Sensory analysis: General guidance for the design of test rooms*. Ginebra, Suiza.
- Jacques, P. F., y Wang, H. (2014). Yogurt and weight management. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99(5), 1229S-1234S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.073031>
- Jelen P. (2022). Lactose: Occurrence, Properties, Reactions, and Significance. En McSweeney P., James A., O'Mahony J., Alan L., y Kelly A. (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents* (4th ed., pp. 1-18). Springer.
- Jørgensen, C. E. (2017). *Protein fractionation by microfiltration in high-protein yogurt processing* *Bruk av mikrofiltrering for proteinfraksjonering ved produksjon av proteinrik yoghurt*. Norwegian University of Life Sciences - Faculty of Chemistry, Biotechnology and Food Science.
- Jørgensen, C. E., Abrahamsen, R. K., Rukke, E. O., Hoffmann, T. K., Johansen, A. G., y Skeie, S. B. (2019). Processing of high-protein yoghurt – A review. En *International Dairy Journal* (Vol. 88, pp. 42-59). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.08.002>
- Jørgensen, C. E., Abrahamsen, R. K., Rukke, E. O., Johansen, A. G., Schüller, R. B., y Skeie, S. B. (2015). Improving the structure and rheology of high protein, low fat yoghurt with undenatured whey proteins. *International Dairy Journal*, 47, 6-18. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.02.002>
- Karam, M. C., Gaiani, C., Hosri, C., Burgain, J., y Scher, J. (2013). Effect of dairy powders fortification on yogurt textural and sensorial properties: A review. En *Journal of Dairy Research* (Vol. 80, Número 4, pp. 400-409). <https://doi.org/10.1017/S0022029913000514>
- Karimi, R., Azizi, M. H., Ghasemlou, M., y Vaziri, M. (2015). Application of inulin in cheese as prebiotic, fat replacer and texturizer: A review. *Carbohydrate Polymers*, 119, 85-100. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.11.029>
- Kelly, P. (2018). Manufacture of whey protein products. En *Whey Proteins: From Milk to Medicine* (pp. 97-122). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812124-5.00003-5>
- Kelly, P. M. (2011). Milk protein products. Membrane-based fractionation. En J. W. Fuquay, P. F. Fox, y P. L. H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Science* (pp. 864-872). Academic Press.
- Kew, B., Holmes, M., Stieger, M., y Sarkar, A. (2020). Review on fat replacement using protein-based microparticulated powders or microgels: A textural perspective. *Trends in Food Science y Technology*, 106, 457-468. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.032>
- Khorraminezhad, L., y Rudkowska, I. (2021). Effect of Yogurt Consumption on Metabolic Syndrome Risk Factors: a Narrative Review. *Current Nutrition Reports*, 10(1), 83-92. <https://doi.org/10.1007/s13668-020-00344-y>
- Kok, C. R., y Hutkins, R. (2018). Yogurt and other fermented foods as sources of health-promoting bacteria. *Nutrition Reviews*, 76, 4-15. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy056>

- Körzendörfer, A., y Hinrichs, J. (2019). Manufacture of high-protein yogurt without generating acid whey – Impact of the final pH and the application of power ultrasound on texture properties. *International Dairy Journal*, 99. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104541>
- Körzendörfer, A., Nöbel, S., y Hinrichs, J. (2017). Particle formation induced by sonication during yogurt fermentation – Impact of exopolysaccharide-producing starter cultures on physical properties. *Food Research International*, 97, 170-177. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.04.006>
- Krzeminski, A., Grobshable, K., y Hinrichs, J. (2011). Structural properties of stirred yoghurt as influenced by whey proteins. *LWT*, 44(10), 2134-2140. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.05.018>
- Kücükçetin, A. (2008). Effect of heat treatment and casein to whey protein ratio of skim milk on graininess and roughness of stirred yoghurt. *Food Research International*, 41(2), 165-171. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.11.003>
- Kulich, K. R., Piqué, J. M., Vegazo, O., Jiménez, J., Zapardiel, J., Carlsson, J., y Wiklund, I. (2005). Validación psicométrica de la traducción al español de la escala de evaluación de síntomas gastrointestinales (GSRS) y del cuestionario de calidad de vida de reflujo y dispepsia (QOLRAD) en los pacientes con enfermedad por reflujo gastroesofágico. *Revista Clínica Española*, 205(12), 588-594. [https://doi.org/10.1016/S0014-2565\(05\)72651-5](https://doi.org/10.1016/S0014-2565(05)72651-5)
- Laiho, S., Williams, R. P. W., Poelman, A., Appelqvist, I., y Logan, A. (2017). Effect of whey protein phase volume on the tribology, rheology and sensory properties of fat-free stirred yoghurts. *Food Hydrocolloids*, 67, 166-177. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.017>
- Lal Bajya, S., Shankar Bunkar, D., Kumar Goyal, S., Kumar Singh, M., Kumar Paswan, V., Lal, S., y Dhyan, P. (2024). Foodomics-based metabolites profiling of the Greek yogurt incorporated with unripened papaya peel powder. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 8, 100199. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2024.100199>
- Lambert, J. E., Parnell, J. A., Tunnicliffe, J. M., Han, J., Sturzenegger, T., y Reimer, R. A. (2017). Consuming yellow pea fiber reduces voluntary energy intake and body fat in overweight/obese adults in a 12-week randomized controlled trial. *Clinical Nutrition*, 36(1), 126-133. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.12.016>
- Le Roy, C. I., Kurilshikov, A., Leeming, E. R., Visconti, A., Bowyer, R. C. E., Menni, C., Falchi, M., Koutnikova, H., Veiga, P., Zhernakova, A., Derrien, M., y Spector, T. D. (2022). Yoghurt consumption is associated with changes in the composition of the human gut microbiome and metabolome. *BMC Microbiology*, 22(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02364-2>
- Lee, W. J., y Lucey, J. A. (2003). Rheological properties, whey separation, and microstructure in set-style yogurt: Effects of heating temperature and incubation temperature. *Journal of Texture Studies*, 34(5-6), 515-536. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2003.tb01079.x>
- Lee, W. J., y Lucey, J. A. (2006). Impact of Gelation Conditions and Structural Breakdown on the Physical and Sensory Properties of Stirred Yogurts. *Journal of Dairy Science*, 89(7), 2374-2385. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72310-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72310-4)

- Lee, W. J., y Lucey, J. A. (2010). Formation and physical properties of Yogurt. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 23(9), 1127-1136.
- Lesme, H., Rannou, C., Famelart, M. H., Bouhallab, S., y Prost, C. (2020). Yogurts enriched with milk proteins: Texture properties, aroma release and sensory perception. En *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 98, pp. 140-149). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.006>
- Li, D., Cui, Y., Wu, X., Li, J., Min, F., Zhao, T., Zhang, J., y Zhang, J. (2024). Graduate Student Literature Review: Network of flavor compounds formation and influence factors in yogurt. *Journal of Dairy Science*, 107(11), 8874-8886. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-24875>
- Lindmark Månsson, H. (2008). Fatty acids in bovine milk fat. *Food y Nutrition Research*, 52(1), 1821. <https://doi.org/10.3402/fnr.v52i0.1821>
- Liu, C., Yang, P., Wang, H., y Song, H. (2022). Identification of odor compounds and odor-active compounds of yogurt using DHS, SPME, SAFE, and SBSE/GC-O-MS. *LWT*, 154, 112689. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112689>
- Liu, K., Tian, Y., Stieger, M., van der Linden, E., y van de Velde, F. (2016). Evidence for ball-bearing mechanism of microparticulated whey protein as fat replacer in liquid and semi-solid multi-component model foods. *Food Hydrocolloids*, 52, 403-414. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.016>
- Liu, L., Li, C., y Liu, J. (2017). Rheological and physical characteristics of non-fat set yogurt prepared with EPS-producing *Streptococcus thermophilus* and an H⁺-ATPase-defective mutant *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *International Journal of Food Properties*, 20(4), 745-753. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1180531>
- Liu, T., Lei, H., Zhen, X., Liu, J., Xie, W., Tang, Q., Gou, D., y Zhao, J. (2024). Advancements in modifying insoluble dietary fiber: Exploring the microstructure, physicochemical properties, biological activity, and applications in food industry—A review. *Food Chemistry*, 458, 140154. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140154>
- Lucey, J. A. (2002). Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels. *Journal of Dairy Science*, 85(2), 281-294. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74078-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74078-2)
- Lucey, J. A. (2004a). Cultured dairy products: an overview of their gelation and texture properties. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 77-84. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00142.x>
- Lucey, J. A. (2004b). Formation, structural properties and rheology of acid-coagulated milk gels. En P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, y T. P. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1. General Aspects* (3rd Edition, pp. 105-122). Elsevier Academic Press.
- Lucey, J. A. (2016). Acid Coagulation of Milk. En *Advanced Dairy Chemistry* (pp. 309-328). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2_12
- Lucey, J. A. (2020). Milk protein gels. En *Milk Proteins* (pp. 599-632). Academic Press.

- Lucey, J. A., y Horne, D. S. (2018). Perspectives on casein interactions. *International Dairy Journal*, 85, 56-65. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.04.010>
- Lucey, J. A., Munro, P. A., y Singh, H. (1999). Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. En *International Dairy Journal* (Vol. 9).
- Lucey, J. A., y Singh, H. (1998). Formation and physical properties of acid milk gels: a review. En *Food Research International* (Vol. 30, Número 7).
- Lucey, J. A., Tamehana, M., Singh, H., y Munro, P. A. (1998). Effect of interactions between denatured whey proteins and casein micelles on the formation and rheological properties of acid skim milk gels. *Journal of Dairy Research*, 65(4), 555-567. <https://doi.org/10.1017/S0022029998003057>
- Lucey, J. A., Teo, C. T., Munro, P. A., y Singh, H. (1998). Microstructure, permeability and appearance of acid gels made from heated skim milk. *Food Hydrocolloids*, 12(2), 159-165. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(98\)00012-5](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(98)00012-5)
- Lucey, J. A., Wilbanks, D. J., y Horne, D. S. (2022). Impact of heat treatment of milk on acid gelation. *International Dairy Journal*, 125, 105222. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105222>
- Lucey, J., Munro, P. A., y Singh, H. (1998). Whey separation in acid skim milk gels made with glucono-delta-lactone: effects of heat treatment and gelation temperature. *Journal of Texture Studies*, 29(4), 413-426. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1998.tb00813.x>
- MacGibbon A.K.H., y Taylor, M. W. (2006). *Composition and Structure of Bovine Milk Lipids* (P. F. Fox y P. L. H. McSweeney, Eds.; Vol. 2).
- Magenis, R. B., Prudêncio, E. S., Amboni, R. D. M. C., Cerqueira, N. G., Oliveira, R. V. B., Soldi, V., y Benedet, H. D. (2006). Compositional and physical properties of yogurts manufactured from milk and whey cheese concentrated by ultrafiltration. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(5), 560-568. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.01100.x>
- Major, G. C., Chaput, J. P., Ledoux, M., St-Pierre, S., Anderson, G. H., Zemel, M. B., y Tremblay, A. (2008). Recent developments in calcium-related obesity research. En *Obesity Reviews* (Vol. 9, Número 5, pp. 428-445). <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2007.00465.x>
- Mallick, H., Rahnavard, A., McIver, L. J., Ma, S., Zhang, Y., Nguyen, L. H., Tickle, T. L., Weingart, G., Ren, B., Schwager, E. H., Chatterjee, S., Thompson, K. N., Wilkinson, J. E., Subramanian, A., Lu, Y., Waldron, L., Paulson, J. N., Franzosa, E. A., Bravo, H. C., y Huttenhower, C. (2021). Multivariable association discovery in population-scale metagenomics studies. *PLOS Computational Biology*, 17(11), e1009442. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009442>
- Marafon, A. P., Sumi, A., Granato, D., Alcântara, M. R., Tamime, A. Y., y Nogueira de Oliveira, M. (2011). Effects of partially replacing skimmed milk powder with dairy ingredients on rheology, sensory profiling, and microstructure of probiotic stirred-type yogurt during cold storage. *Journal of Dairy Science*, 94(11), 5330-5340. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4366>

- Marciani, L., Gowland, P. A., Spiller, R. C., Manoj, P., Moore, R. J., Young, P., y Fillery-Travis, A. J. (2001). Effect of meal viscosity and nutrients on satiety, intragastric dilution, and emptying assessed by MRI. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(6), G1227-G1233. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.6.G1227>
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., Gänzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E. J., y Hutkins, R. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 94-102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010>
- Marini, T., Gallina, D. A., Nabeshima, E. H., Ponezi, A. N., Anaya, K., Antunes, A. E. C., y Pacheco, M. T. B. (2022). Development of probiotic yoghurts with high protein content by ultrafiltration. *NFS Journal*, 29, 16-25. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2022.09.003>
- Martin, F., Cachon, R., Pernin, K., De Coninck, J., Gervais, P., Guichard, E., y Cayot, N. (2011). Effect of oxidoreduction potential on aroma biosynthesis by lactic acid bacteria in nonfat yogurt. *Journal of Dairy Science*, 94(2), 614-622. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3372>
- Martins, A., Manera, A. P., Monteiro, R., Burkert, J., y Burkert, C. A. (2011). Lactose conversion and the synthesis of galactooligosaccharides in a simultaneous lagged bioprocess using β -galactosidases and probiotic microorganisms. *Brazilian Journal of Food Technology*, 14(02), 130-136. <https://doi.org/10.4260/BJFT2011140200017>
- Martins, A. R., Manera, A. P., de Medeiros Burkert, J. F., y Veiga Burkert, C. A. (2014). Improving Galacto-oligosaccharide content in the production of lactose-reduced yogurt. *Journal of Engineering Research and Applications*, 4(11), 84-89.
- McCann, T. H., Fabre, F., y Day, L. (2011). Microstructure, rheology and storage stability of low-fat yoghurt structured by carrot cell wall particles. *Food Research International*, 44(4), 884-892. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.045>
- McDonald, D., Jiang, Y., Balaban, M., Cantrell, K., Zhu, Q., Gonzalez, A., Morton, J. T., Nicolaou, G., Parks, D. H., Karst, S. M., Albertsen, M., Hugenholtz, P., DeSantis, T., Song, S. J., Bartko, A., Havulinna, A. S., Jousilahti, P., Cheng, S., Inouye, M., ... Knight, R. (2024). Greengenes2 unifies microbial data in a single reference tree. *Nature Biotechnology*, 42(5), 715-718. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01845-1>
- McMurdie, P. J., y Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- McSweeney, P., y Fox, P. F. (2013). *Advanced dairy chemistry. Volume 1A: Proteins: Basic Aspects* (P. McSweeney y P. Fox, Eds.; 4th ed.). Springer.
- Meletharayil, G. H., Patel, H. A., Metzger, L. E., y Huppertz, T. (2016). Acid gelation of reconstituted milk protein concentrate suspensions: Influence of lactose addition. *International Dairy Journal*, 61, 107-113. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.04.005>
- Metchnikoff, E. (1907). *The prolongation of life: optimistic studies*.
- Mezger, T. G. (2006). *The Rheology Handbook* (V. Verlag, Ed.; 2nd Edition).

- Mistry, V. V., y Hassan, H. N. (1992). Manufacture of Nonfat Yogurt from a High Milk Protein Powder. *Journal of Dairy Science*, 75(4), 947-957. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77835-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77835-7)
- Modler, H. W., y Kalab, M. (1983). Microstructure of Yogurt Stabilized with Milk Proteins. *Journal of Dairy Science*, 66(3), 430-437. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81810-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81810-4)
- Mokoonlall, A., Nöbel, S., y Hinrichs, J. (2016). Post-processing of fermented milk to stirred products: Reviewing the effects on gel structure. *Trends in Food Science y Technology*, 54, 26-36. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.05.012>
- Mordor Intelligence. (s. f.). *Análisis de tamaño y participación del mercado del yogur*. Recuperado 20 de diciembre de 2023, de <https://www.mordorintelligence.com/es/industry-reports/yogurt-market>
- Morell, P., Fizman, S., Llorca, E., y Hernando, I. (2017). Designing added-protein yogurts: Relationship between in vitro digestion behavior and structure. *Food Hydrocolloids*, 72, 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.026>
- Moussier, M., Huc-Mathis, D., Michon, C., y Bosc, V. (2019). Rational design of a versatile lab-scale stirred milk gel using a reverse engineering logic based on microstructure and textural properties. *Journal of Food Engineering*, 249, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.12.018>
- Mudgil, D. (2017). The Interaction Between Insoluble and Soluble Fiber. En *Dietary Fiber for the Prevention of Cardiovascular Disease* (pp. 35-59). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805130-6.00003-3>
- Mudgil, D., Barak, S., y Khatkar, B. S. (2017). Texture profile analysis of yogurt as influenced by partially hydrolyzed guar gum and process variables. *Journal of Food Science and Technology*, 54(12), 3810-3817. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2779-1>
- Mulet-Cabero, A.-I., y Wilde, P. J. (2021). Role of calcium on lipid digestion and serum lipids: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(6), 813-826. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1954873>
- Muñoz-Labrador, A., Kolida, S., Rastall, R. A., Methven, L., Lebrón-Aguilar, R., Quintanilla-López, J. E., Galindo-Iranzo, P., Javier Moreno, F., y Hernandez-Hernandez, O. (2024). Prebiotic potential of new sweeteners based on the simultaneous biosynthesis of galactooligosaccharides and enzymatically modified steviol glycosides. *Food Chemistry*, 436, 137761. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137761>
- Narayana, N. M. N. K., y Gupta, V. K. (2016). Quality of Plain Set Yoghurt as affected by Levels of Ultrafiltration Concentration of Milk and Inoculum of Yoghurt Culture. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 4(6), 508. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v4i6.508-514.685>
- Nastaj, M., Sołowiej, B. G., Gustaw, W., Pérez-Huertas, S., Mleko, S., y Wesołowska-Trojanowska, M. (2019). Physicochemical properties of High-Protein-Set Yoghurts

- obtained with the addition of whey protein preparations. *International Journal of Dairy Technology*, 72(3), 395-402. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12603>
- Nevara, G. A., Muhammad, S. K. S., Zawawi, N., Mustapha, N. A., y Karim, R. (2021). Dietary Fiber: Fractionation, Characterization and Potential Sources from Defatted Oilseeds. *Foods*, 10(4), 754. <https://doi.org/10.3390/foods10040754>
- Ng, S. B. X., Nguyen, P. T. M., Bhandari, B., y Prakash, S. (2018). Influence of different functional ingredients on physical properties, rheology, tribology, and oral perceptions of no fat stirred yoghurt. *Journal of Texture Studies*, 49(3), 274-285. <https://doi.org/10.1111/jtxs.12307>
- OCLA. (2023). *Observatorio de la Cadena Láctea Argentina*. <https://www.ocla.org.ar/portafolio/6/#cbp=grafico/10599589>
- OCLA. (2024). *Observatorio de la Cadena Láctea Argentina*. <https://ocla.org.ar/portafolio/46/#>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Wagner, H., y y others. (2019). *vegan: Community Ecology Package. R Package Version 2.5-6*. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Olivares, M. L., Shahrivar, K., y de Vicente, J. (2019). Soft lubrication characteristics of microparticulated whey proteins used as fat replacers in dairy systems. *Journal of Food Engineering*, 245, 157-165. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.10.015>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2024). *Obesidad y sobrepeso*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- O'Sullivan, T. A., Schmidt, K. A., y Kratz, M. (2020). Whole-Fat or Reduced-Fat Dairy Product Intake, Adiposity, and Cardiometabolic Health in Children: A Systematic Review. *Advances in Nutrition*, 11(4), 928-950. <https://doi.org/10.1093/advances/nmaa011>
- Ott, A., Fay, L. B., y Chaintreau, A. (1997). Determination and Origin of the Aroma Impact Compounds of Yogurt Flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 850-858. <https://doi.org/10.1021/jf960508e>
- Ott, A., Germond, J.-E., y Chaintreau, A. (2000). Vicinal Diketone Formation in Yogurt: ¹³C Precursors and Effect of Branched-Chain Amino Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 724-731. <https://doi.org/10.1021/jf990487z>
- Ott, A., Hugi, A., Baumgartner, M., y Chaintreau, A. (2000). Sensory Investigation of Yogurt Flavor Perception: Mutual Influence of Volatiles and Acidity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 441-450. <https://doi.org/10.1021/jf990432x>
- Ozcan, T., y Kurtuldu, O. (2014). Influence of Dietary Fiber Addition on the Properties of Probiotic Yogurt. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 5(5), 397-401. <https://doi.org/10.7763/IJCEA.2014.V5.417>
- Panahi, S., y Tremblay, A. (2016). The Potential Role of Yogurt in Weight Management and Prevention of Type 2 Diabetes. En *Journal of the American College of Nutrition* (Vol. 35, Número 8, pp. 717-731). Routledge. <https://doi.org/10.1080/07315724.2015.1102103>

- Pariza, M. (1999). Conjugated linoleic acid and the control of cancer and obesity. *Toxicological Sciences*, 52(90001), 107-110. https://doi.org/10.1093/toxsci/52.suppl_1.107
- Patel, A. R., Nicholson, R. A., y Marangoni, A. G. (2020). Applications of fat mimetics for the replacement of saturated and hydrogenated fat in food products. En *Current Opinion in Food Science* (Vol. 33, pp. 61-68). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.12.008>
- Patel, S. (2011). *Evaluating the Effect of Milk Protein Concentrates (MPC) Fortification on Rheological Properties of Nonfat Set Yogurt Using Vane Rheometry*. University of Wisconsin-Stout.
- Pedro, M. C. (2013). *Evaluación del contenido de calcio y fósforo en quesos blandos comerciales. estudio de parámetros tecnológicos que definen la concentración de los mismos en el queso*. Universidad Nacional del Litoral.
- Pellegrino, L., Masotti, F., Cattaneo, S., Hogenboom, J. A., y De Noni, I. (2013). Nutritional quality of milk proteins. En *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects, 4th Edition* (pp. 515-538). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6_16
- Peng, Y., Horne, D. S., y Lucey, J. A. (2009). Impact of preacidification of milk and fermentation time on the properties of yogurt. *Journal of Dairy Science*, 92(7), 2977-2990. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1221>
- Peng, Y., Serra, M., Horne, D. S., y Lucey, J. A. (2009). Effect of fortification with various types of milk proteins on the rheological properties and permeability of nonfat set yogurt. *Journal of Food Science*, 74(9). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01350.x>
- Peralta, G. H., Bergamini, C. V., Costabel, L., Audero, G., Ale, E. C., Binetti, A. G., Wolf, I. V., Cuatrín, A., Nieto, I., Perotti, M. C., y Hynes, E. R. (2020). Performance of *Lactobacillus paracasei* 90 as an adjunct culture in soft cheese under cold chain interruption. *International Dairy Journal*, 109, 104779. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104779>
- Pereira, D. de C., Lima, R. P. A., de Lima, R. T., Gonçalves, M. da C. R., de Moraes, L. C. S. L., Franceschini, S. do C. C., Filizola, R. G., de Moraes, R. M., Ascitti, L. S. R., y Costa, M. J. de C. (2013). Association between obesity and calcium:phosphorus ratio in the habitual diets of adults in a city of Northeastern Brazil: an epidemiological study. *Nutrition Journal*, 12(1), 90. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-12-90>
- Perotti, M. C., Wolf, I. V., Vénica, C. I., y Bergamini, C. V. (2012). Dairy Products Modified in their Lactose Content. *Current Nutrition y Food Science*, 8(1), 8-18. <https://doi.org/10.2174/157340112800269597>
- Pinto, S. M., Cemente, M. G., y de Abreu, L. R. (2009). Behaviour of volatile compounds during the shelf life of yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 62(2), 215-223. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00476.x>
- Playne, M. (2003). Galacto-oligosaccharides. En H. Roginski, J. Fuquay, y P. Fox (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Science* (pp. 1151-1158). Academic Press.
- Pontonio, E., Raho, S., Dingeo, C., Centrone, D., Carofiglio, V. E., y Rizzello, C. G. (2020). Nutritional, Functional, and Technological Characterization of a Novel Gluten- and

- Lactose-Free Yogurt-Style Snack Produced With Selected Lactic Acid Bacteria and Leguminosae Flours. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01664>
- Prajapati, D. M., Shrigod, N. M., Prajapati, R. J., y Pandit, P. D. (2016). Textural and rheological properties of yoghurt: a review. *Adv Life Sci*, 5(13), 5238-5254.
- Prasad, L. N., Sherkat, F., y Shah, N. P. (2013). Influence of Galactooligosaccharides and Modified Waxy Maize Starch on Some Attributes of Yogurt. *Journal of Food Science*, 78(1). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.03004.x>
- Purwanti, N., Peters, J. P. C. M., y van der Goot, A. J. (2013). Protein micro-structuring as a tool to texturize protein foods. *Food and Function*, 4(2), 277-282. <https://doi.org/10.1039/c2fo30158j>
- Puvanenthiran, A., Stevovitch-Rykner, C., McCann, T. H., y Day, L. (2014). Synergistic effect of milk solids and carrot cell wall particles on the rheology and texture of yoghurt gels. *Food Research International*, 62, 701-708. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.023>
- Puvanenthiran, A., Williams, R. P. W., y Augustin, M. A. (2002). Structure and visco-elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal*, 12(4), 383-391. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00033-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00033-X)
- Qi, X., Liu, D., Yuan, J., Regenstein, J. M., y Zhou, P. (2022). Effects of heating temperatures and pH of skim milk fortified with milk protein concentrate on the texture and microstructure of high-protein yoghurts. *International Dairy Journal*, 131. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105395>
- Que, F., Hou, X.-L., Wang, G.-L., Xu, Z.-S., Tan, G.-F., Li, T., Wang, Y.-H., Khadr, A., y Xiong, A.-S. (2019). Advances in research on the carrot, an important root vegetable in the Apiaceae family. *Horticulture Research*, 6(1), 69. <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0150-6>
- Ramaswamy, H. S., y Basak, S. (1991). Rheology of stirred yogurts. *Journal of Texture Studies*, 22(2), 231-241. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1991.tb00016.x>
- Ramchandran, L., y Shah, N. P. (2010). Characterization of functional, biochemical and textural properties of synbiotic low-fat yogurts during refrigerated storage. *LWT*, 43(5), 819-827. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.01.012>
- Rao, M. A. (1999). *Rheology of fluids and semisolid foods*. Aspen Publishers, Inc.
- Redondo-Useros, N., Nova, E., González-Zancada, N., Díaz, L. E., Gómez-Martínez, S., y Marcos, A. (2020). Microbiota and lifestyle: A special focus on diet. En *Nutrients* (Vol. 12, Número 6, pp. 1-54). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu12061776>
- Remeuf, F., Mohammed, S., Sodini, I., y Tissier, J. P. (2003). Preliminary observations on the effects of milk fortification and heating on microstructure and physical properties of stirred yogurt. *International Dairy Journal*, 13(9), 773-782. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00092-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00092-X)

- Ribes, S., Peña, N., Fuentes, A., Talens, P., y Barat, J. M. (2021). Chia (*Salvia hispanica* L.) seed mucilage as a fat replacer in yogurts: Effect on their nutritional, technological, and sensory properties. *Journal of Dairy Science*, *104*(3), 2822-2833. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19240>
- Robinson, R. K., Lucey, J. A., y Tamime, A. Y. (2006). Manufacture of Yoghurt. En *Fermented Milks* (pp. 53-75). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470995501.ch3>
- Roefs, S. P. F. M., De Groot-Mostert, A. E. A., y Van Vliet, T. (1990). Structure of acid casein gels 1. Formation and model of gel network. *Colloids and Surfaces*, *50*, 141-159. [https://doi.org/10.1016/0166-6622\(90\)80259-7](https://doi.org/10.1016/0166-6622(90)80259-7)
- Rosdi, M. H. H., Ahad, N. A., y Shahdan, D. (2022). Comparison on oil and water absorption ability of various natural fiber. *Journal of Physics: Conference Series*, *2169*(1), 012021. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/2169/1/012021>
- Routray, W., y Mishra, H. N. (2011). Scientific and Technical Aspects of Yogurt Aroma and Taste: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *10*(4), 208-220. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00151.x>
- Saffon, M., Richard, V., Jiménez-Flores, R., Gauthier, S. F., Britten, M., y Pouliot, Y. (2013). Behavior of heat-denatured whey:Buttermilk protein aggregates during the yogurt-making process and their influence on set-type yogurt properties. *Foods*, *2*(4), 444-459. <https://doi.org/10.3390/foods2040444>
- Salaün, F., Mietton, B., y Gaucheron, F. (2005). Buffering capacity of dairy products. En *International Dairy Journal* (Vol. 15, Número 2, pp. 95-109). <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.06.007>
- Salman, K. H., Mehany, T., Zaki, K. G., y Al-Doury, M. K. W. (2024). Development of functional probiotic yogurt from buffalo milk supplemented with red beetroot (*Beta vulgaris* L.) as an antioxidant, natural colorant, and starter growth stimulant. *Food Chemistry Advances*, *5*, 100776. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100776>
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., Aguirre-Mandujano, E., y Vernon-Carter, E. J. (2004). Microstructure and texture of yogurt as influenced by fat replacers. *International Dairy Journal*, *14*(2), 151-159. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00166-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00166-3)
- Sanz, T., Salvador, A., Jiménez, A., y Fiszman, S. M. (2008). Yogurt enrichment with functional asparagus fibre. Effect of fibre extraction method on rheological properties, colour, and sensory acceptance. *European Food Research and Technology*, *227*(5), 1515-1521. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0874-2>
- Saulnier, G. E., Castro, J. C., y Cook, C. B. (2014). Statistical transformation and the interpretation of inpatient glucose control data. *Endocrine Practice*, *20*(3), 207-212.
- Savaiano, D. A., y Hutkins, R. W. (2021). Yogurt, cultured fermented milk, and health: A systematic review. *Nutrition Reviews*, *79*(5), 599-614. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa013>
- Sbodio, O. (2004). *Minerales en Alimentos*.

- Schlichtherle-Cerny, H., Oberholzer, D., y Zehntner, U. (2010). Odorants in mild and traditional acidic yoghurts as determined by SPME-CG/O/MS. *Expression of Multidisciplinary Flavour Science*, 371-374.
- Seijo, M., Bonanno, M. S., Vénica, C. I., Marotte, C., Pita Martín de Portela, M. L., Bergamini, C. V., Wolf, I. V., Perotti, M. C., y Zeni, S. N. (2022). A yoghurt containing galactooligosaccharides and having low-lactose level improves calcium absorption and retention during growth: experimental study. *International Journal of Food Science y Technology*, 57(1), 48-56. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15212>
- Serra, M., Trujillo, A. J., Quevedo, J. M., Guamis, B., y Ferragut, V. (2007). Acid coagulation properties and suitability for yogurt production of cows' milk treated by high-pressure homogenisation. *International Dairy Journal*, 17(7), 782-790. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.10.001>
- Settachaimongkon, S., Nout, M. J. R., Antunes Fernandes, E. C., Hettinga, K. A., Vervoort, J. M., van Hooijdonk, T. C. M., Zwietering, M. H., Smid, E. J., y van Valenberg, H. J. F. (2014). Influence of different proteolytic strains of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the metabolite profile of set-yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.008>
- Shah, K., Salunke, P., y Metzger, L. (2022). High Protein Powders Fortification of Nonfat Yoghurt: Impact of Protein Source, Protein to Total Solids Ratio, Storage, and Seasonality on the Functionality of Nonfat Yoghurt Made Using Glucono- δ -Lactone (GDL). *Journal of Food Processing y Technology*, 13(8). <https://doi.org/10.35248/2157-7110.22.13.946>
- Sharp, E., D'Cunha, N. M., Ranadheera, C. S., Vasiljevic, T., Panagiotakos, D. B., y Naumovski, N. (2021). Effects of lactose-free and low-lactose dairy on symptoms of gastrointestinal health: A systematic review. *International Dairy Journal*, 114, 104936. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104936>
- Shi, D., Li, C., Stone, A. K., Guldiken, B., y Nickerson, M. T. (2023). Recent Developments in Processing, Functionality, and Food Applications of Microparticulated Proteins. En *Food Reviews International* (Vol. 39, Número 3, pp. 1309-1332). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1933515>
- Shin, N.-R., Whon, T. W., y Bae, J.-W. (2015). Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in Biotechnology*, 33(9), 496-503. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>
- Sieber, R., Bütikofer, U., y Bosset, J. O. (1995). Benzoic acid as a natural compound in cultured dairy products and cheese. *International Dairy Journal*, 5(3), 227-246. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(94\)00005-A](https://doi.org/10.1016/0958-6946(94)00005-A)
- Silva, J. V. C., y O'Mahony, J. A. (2018). Microparticulated whey protein addition modulates rheological and microstructural properties of high-protein acid milk gels. *International Dairy Journal*, 78, 145-151. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.11.013>

- Singh, G., y Muthukumarappan, K. (2008). Influence of calcium fortification on sensory, physical and rheological characteristics of fruit yogurt. *LWT*, *41*(7), 1145-1152. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.08.027>
- Siroli, L., Burns, P., Borgo, F., Puntillo, M., Drago, S., Forzani, L., D' Alessandro, M. E., Reinheimer, J., Perotti, C., y Vinderola, G. (2021). Sex-dependent effects of a yoghurt enriched with proteins in a mouse model of diet-induced obesity. *International Dairy Journal*, *114*, 104914. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104914>
- Skriver, A., y Karychev, R. (2007). *Modifying yoghurt texture by exopolysaccharide producing lactic acid bacteria*. Chr. Hansen.
- Sobti, B., Ayyash, M., Mbye, M., Ranasinghe, M., Nazir, A., Kamleh, R., Abu-Jdayil, B., y Kamal-Eldin, A. (2024). Effects of ultrafiltration followed by heat or high-pressure treatment on camel and bovine yogurts. *NFS Journal*, *35*, 100181. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2024.100181>
- Sodini, I., Montella, J., y Tong, P. S. (2005). Physical properties of yogurt fortified with various commercial whey protein concentrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *85*(5), 853-859. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2037>
- Sodini, I., Remeuf, F., Haddad, S., y Corrieu, G. (2004). The Relative Effect of Milk Base, Starter, and Process on Yogurt Texture: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *44*(2), 113-137. <https://doi.org/10.1080/10408690490424793>
- Souza Olegario, L., González-Mohino, A., Estévez, M., Madruga, M. S., y Ventanas, S. (2022). Impact of absence of lactose on the dynamic sensory profile of yogurt: A multiple-intake TDS approach. *LWT*, *162*, 113430. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113430>
- Staffolo, M. D., Bertola, N., Martino, M., y Bevilacqua, y A. (2004). Influence of dietary fiber addition on sensory and rheological properties of yogurt. *International Dairy Journal*, *14*(3), 263-268. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.08.004>
- Stribițaia, E., Blundell, J., You, K.-M., Finlayson, G., Gibbons, C., y Sarkar, A. (2022). Viscosity of food influences perceived satiety: A video based online survey. *Food Quality and Preference*, *99*, 104565. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2022.104565>
- Stribițaia, E., Evans, C. E. L., Gibbons, C., Blundell, J., y Sarkar, A. (2020). Food texture influences on satiety: systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, *10*(1), 12929. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69504-y>
- Stribling, P., y Ibrahim, F. (2023). Dietary fibre definition revisited - The case of low molecular weight carbohydrates. *Clinical Nutrition ESPEN*, *55*, 340-356. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2023.04.014>
- Tamime, A. (2002). Fermented milks: a historical food with modern applications—a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, *56*(S4), S2-S15. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601657>
- Tamime, A. Y. (2009). *Dairy powders and concentrated milk products* (A. Y. Tamime, Ed.). Wiley Blackwell Publishing.

- Tamime, A. Y., Hickey, M., y Muir, D. D. (2014). Strained fermented milks - A review of existing legislative provisions, survey of nutritional labelling of commercial products in selected markets and terminology of products in some selected countries. *International Journal of Dairy Technology*, 67(3), 305-333. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12147>
- Tamime, A. Y., y Robinson, R. K. (2000). *Yogurt Science and Technology*. CRC Press Woodhead.
- Tarrega, A., Marcano, J., y Fiszman, S. (2016). Yogurt viscosity and fruit pieces affect satiating capacity expectations. *Food Research International*, 89, 574-581. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.011>
- Thomas, D. T., Wideman, L., y Lovelady, C. A. (2011). Effects of a Dairy Supplement and Resistance Training on Lean Mass and Insulin-Like Growth Factor in Women. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 21(3), 181-188. <https://doi.org/10.1123/ijsnem.21.3.181>
- Toba, T., Arihara, K., y Adachi, S. (1986). Quantitative Changes in Oligosaccharides During Fermentation and Storage of Yogurt Inoculated Simultaneously with Starter Culture and β -Galactosidase Preparation. *Journal of Dairy Science*, 69(5), 1241-1245. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(86\)80529-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(86)80529-X)
- Tomaschunas, M., Hinrichs, J., Köhn, E., y Busch-Stockfisch, M. (2012). Effects of casein-to-whey protein ratio, fat and protein content on sensory properties of stirred yoghurt. *International Dairy Journal*, 26(1), 31-35. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.04.005>
- Tormo, M., y Izco, J. M. (2004). Alternative reversed-phase high-performance liquid chromatography method to analyse organic acids in dairy products. *Journal of Chromatography A*, 1033(2), 305-310. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.01.043>
- Toro-Sierra, J., Schumann, J., y Kulozik, U. (2013). Impact of spray-drying conditions on the particle size of microparticulated whey protein fractions. *Dairy Science and Technology*, 93(4-5), 487-503. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0124-7>
- Torres, I. C., Amigo, J. M., Knudsen, J. C., Tolkach, A., Mikkelsen, B. Ø., y Ipsen, R. (2018). Rheology and microstructure of low-fat yoghurt produced with whey protein microparticles as fat replacer. *International Dairy Journal*, 81, 62-71. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.01.004>
- Torres, I. C., Janhøj, T., Mikkelsen, B. Ø., y Ipsen, R. (2011). Effect of microparticulated whey protein with varying content of denatured protein on the rheological and sensory characteristics of low-fat yoghurt. *International Dairy Journal*, 21(9), 645-655. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.12.013>
- Torres, I. C., Mutaf, G., Larsen, F. H., y Ipsen, R. (2016). Effect of hydration of microparticulated whey protein ingredients on their gelling behaviour in a non-fat milk system. *Journal of Food Engineering*, 184, 31-37. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.03.018>
- Uduwerella, G., Chandrapala, J., y Vasiljevic, T. (2018). Preconcentration of yoghurt base by ultrafiltration for reduction in acid whey generation during Greek yoghurt manufacturing.

- International Journal of Dairy Technology*, 71(1), 71-80. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12393>
- University of Oxford. (2014). *HOMA2 model*. Available from www.OCDem.ox.ac.uk or from J.C.L. or D.R.M. The Website also specifies commonly used conversion factors.
- Vagenas, G., y Roussis, I. G. (2012). Fat-Derived Volatiles of Various Products of Cows', Ewes', and Goats' Milk. *International Journal of Food Properties*, 15(3), 665-682. <https://doi.org/10.1080/10942912.2010.498542>
- Valencia, A. P., Doyen, A., Benoit, S., Margni, M., y Pouliot, Y. (2018). Effect of ultrafiltration of milk prior to fermentation on mass balance and process efficiency in Greek-style yogurt manufacture. *Foods*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/foods7090144>
- van Dijk, H. J. M., y Walstra, P. (1986). Syneresis of curd. II. One-dimensional syneresis of rennet curd in constant conditions. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 40(1), 3-30.
- Van Marle, M. E. (1998). *Structure and rheological properties of yoghurt gels and stirred yoghurts*. University of Twente.
- van Mierlo, L. A. J., Arends, L. R., Streppel, M. T., Zeegers, M. P. A., Kok, F. J., Grobbee, D. E., y Geleijnse, J. M. (2006). Blood pressure response to calcium supplementation: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Human Hypertension*, 20(8), 571-580. <https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1002038>
- Vénica, C. I., Bergamini, C. V., Wolf, I. V., y Perotti, M. C. (2020a). Funcionalización de leches fermentadas -Yogur reducido en lactosa e incrementado en galactooligosacáridos prebióticos. En *Avances y tendencias en la industria láctea* (Reinheimer, J., pp. 29-43). Universidad Nacional del Litoral.
- Vénica, C. I., Bergamini, C. V., Rebecchi, S. R., y Perotti, M. C. (2015). Galacto-oligosaccharides formation during manufacture of different varieties of yogurt. Stability through storage. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 198-205. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.02.032>
- Vénica, C. I., Bergamini, C. V., Zalazar, C. A., y Perotti, M. C. (2013). Effect of Lactose Hydrolysis during Manufacture and Storage of Drinkable Yogurt. *Journal of Food y Nutritional Disorders*, 02(04). <https://doi.org/10.4172/2324-9323.1000125>
- Vénica, C. I., Perotti, M. C., y Bergamini, C. V. (2014). Organic acids profiles in lactose-hydrolyzed yogurt with different matrix composition. *Dairy Science and Technology*, 94(6), 561-580. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0180-7>
- Vénica, C. I., Solís, M. A., Senovieski, M. L., Vélez, M. A., Spotti, M. J., Giménez, P., Rebecchi, S. R., Vinderola, G., y Perotti, M. C. (2024). Combining Strategies for the Development of a Potentially Functional Yogurt: Structural, Physicochemical, and Microbiological Characterization. *Food and Bioprocess Technology*. <https://doi.org/10.1007/s11947-024-03674-9>
- Vénica, C. I., Spotti, M. J., Pavón, Y. L., Molli, J. S., y Perotti, M. C. (2020b). Influence of carrot fibre powder addition on rheological, microstructure and sensory characteristics of stirred-

- type yogurt. *International Journal of Food Science and Technology*, 55(5), 1916-1923. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14415>
- Vénica, C. I., Wolf, I. V., Spotti, M. J., Capra, M. L., Mercanti, D. J., y Perotti, M. C. (2023b). Impact of protein-providing milk ingredients on volatile compounds, microstructure, microbiology and physicochemical characteristics of yogurts. *Food Bioscience*, 53. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102588>
- Vénica, C. I., Wolf, I. V., Beret, M. V., Bergamini, C. V., Burns, P., Binetti, A., y Perotti, M. C. (2023a). Influence of commercial starter culture on fermentation dynamics and quality characteristics of yogurts obtained with different formulations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 103(2), 569-575. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12168>
- Vénica, C. I., Wolf, I. V., Bergamini, C. V., y Perotti, M. C. (2016). Influence of lactose hydrolysis on galacto-oligosaccharides, lactose, volatile profile and physicochemical parameters of different yogurt varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(15), 4929-4939. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7870>
- Vilcanqui-Pérez, F., y Vílchez-Perales, C. (2017). Fibra dietaria: nuevas definiciones, propiedades funcionales y beneficios para la salud. *Revisión Arch. Latinoam. Nutr.*, 67(2).
- Vinderola, C. G., Bailo, N., y Reinheimer, J. A. (2000). *Survival of probiotic micro-ora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage*. www.elsevier.com/locate/foodres
- Vinderola, C. G., Costa, G. A., Regenhardt, S., y Reinheimer, J. A. (2002). Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. En *International Dairy Journal* (Vol. 12).
- Wang, J., Xin, Y., Li, Q., Li, L., Zhang, H., Wang, H., Min, J., y Wang, F. (2021). Associations Between Yogurt Consumption and Obesity Risk: A Systematic Review and Meta-analysis of Observational Studies. *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 9(1), 16. <https://doi.org/10.11648/j.jfns.20210901.13>
- Watanabe, D., Kuranuki, S., Sunto, A., Matsumoto, N., y Nakamura, T. (2018). Daily Yogurt Consumption Improves Glucose Metabolism and Insulin Sensitivity in Young Nondiabetic Japanese Subjects with Type-2 Diabetes Risk Alleles. *Nutrients*, 10(12), 1834. <https://doi.org/10.3390/nu10121834>
- Wherry, B., Barbano, D. M., y Drake, M. A. (2019). Use of acid whey protein concentrate as an ingredient in nonfat cup set-style yogurt. *Journal of Dairy Science*, 102(10), 8768-8784. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16247>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- Wilbanks, D. J., Lee, M. R., Rahimi, Y. S., y Lucey, J. A. (2023). Comparison of micellar casein isolate and nonfat dry milk for use in the production of high-protein cultured milk products. *Journal of Dairy Science*, 106(1), 61-74. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22400>
- Wilbanks, D. J., Yazdi, S. R., y Lucey, J. A. (2022). Effects of varying casein and pectin concentrations on the rheology of high-protein cultured milk beverages stored at ambient

- temperature. *Journal of Dairy Science*, 105(1), 72-82. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20597>
- Wilson, B., y Whelan, K. (2017). Prebiotic inulin-type fructans and galacto-oligosaccharides: definition, specificity, function, and application in gastrointestinal disorders. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 32(S1), 64-68. <https://doi.org/10.1111/jgh.13700>
- Wolf, I. V., y Heer, L. (2015). Productos lácteos: aporte nutricional de Ca y P. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, 86, 48-53.
- Wolf, I. V., Vénica, C. I., y Perotti, M. C. (2015). Effect of reduction of lactose in yogurts by addition of β -galactosidase enzyme on volatile compound profile and quality parameters. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(5), 1076-1082. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12745>
- Xia, Y., De Mingo, N., Mendez Martín, J., Bodeau, J., Perret, M., Zhong, F., y O'Mahony, M. (2021). Is the absolute scaling model the basis for the 9-point hedonic scale? Evidence from Poulton's Stimulus Range Equalizing Bias. *Food Quality and Preference*, 89, 104153. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.104153>
- Yanni, A. E., Konstantopoulos, P., Kartsioti, K., Binou, P., Karathanos, V. T., Chatzigeorgiou, A., y Kokkinos, A. (2021). Effects of 12-week, non-energy-restricted dietary intervention with conventional yogurt on appetite hormone responses of type 2 diabetic patients. *Food Science y Nutrition*, 9(12), 6610-6616. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2606>
- Yegin, S., Kopec, A., Kitts, D. D., y Zawistowski, J. (2020). Dietary fiber: a functional food ingredient with physiological benefits. En *Dietary Sugar, Salt and Fat in Human Health* (pp. 531-555). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816918-6.00024-X>
- Yildiz, E., y Ozcan, T. (2019). Functional and textural properties of vegetable-fibre enriched yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 72(2), 199-207. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12566>
- Zemel, M. B. (2005). The Role of Dairy Foods in Weight Management. *Journal of the American College of Nutrition*, 24(sup6), 537S-546S. <https://doi.org/10.1080/07315724.2005.10719502>
- Zemel, M. B. (2009). Proposed Role of Calcium and Dairy Food Components in Weight Management and Metabolic Health. *The Physician and Sportsmedicine*, 37(2), 29-39. <https://doi.org/10.3810/psm.2009.06.1707>
- Zemel, M. B., Richards, J., Mathis, S., Milstead, A., Gebhardt, L., y Silva, E. (2005). Dairy augmentation of total and central fat loss in obese subjects. *International Journal of Obesity*, 29(4), 391-397. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802880>
- Zeppa, G., Conterno, L., y Gerbi, V. (2001). Determination of Organic Acids, Sugars, Diacetyl, and Acetoin in Cheese by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2722-2726. <https://doi.org/10.1021/jf0009403>
- Zhang, L., Mi, S., Liu, R., Sang, Y., y Wang, X. (2020). Evaluation of Volatile Compounds in Milks Fermented Using Traditional Starter Cultures and Probiotics Based on Odor Activity

- Value and Chemometric Techniques. *Molecules*, 25(5), 1129. <https://doi.org/10.3390/molecules25051129>
- Zhang, W., Al-Wraikata, M., Shu, Q., Hu, J., Li, L., y Liu, Y. (2024). Enhancement effect of kale fiber on physicochemical, rheological and digestive properties of goat yogurt. *LWT*, 207, 116649. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116649>
- Zhao, L. L., Wang, X. L., Tian, Q., y Mao, X. Y. (2016a). Effect of casein to whey protein ratios on the protein interactions and coagulation properties of low-fat yogurt. *Journal of Dairy Science*, 99(10), 7768-7775. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10794>
- Zhao, L. L., Wang, X. L., Tian, Q., y Mao, X. Y. (2016b). Effect of casein to whey protein ratios on the protein interactions and coagulation properties of low-fat yogurt. *Journal of Dairy Science*, 99(10), 7768-7775. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10794>
- Zijlstra, N., Mars, M., de Wijk, R. A., Westerterp-Plantenga, M. S., y de Graaf, C. (2008). The effect of viscosity on ad libitum food intake. *International Journal of Obesity*, 32(4), 676-683. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803776>

Anexos

Anexo 6.1.

Protocolo de investigación clínica: Estudio del efecto de la administración de un yogur enriquecido con proteínas en la composición de la microbiota intestinal y parámetros metabólicos en adultos con sobrepeso.

Lugar de realización: Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL- CONICET), Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santiago del Estero 2829 y Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria, Santa Fe.

Composición del grupo de trabajo:

Nombre y apellido	Institución	Rol
Dr. Gabriel Vinderola	INLAIN (UNL-CONICET)	Investigador responsable
Dra. Andrea Quiberoni	INLAIN (UNL-CONICET)	Investigadora
Dra. Cristina Perotti	INLAIN (UNL-CONICET)	Investigadora
Dra. Ana Binetti	INLAIN (UNL-CONICET)	Investigadora
Dra. Claudia Vénica	INLAIN (UNL-CONICET)	Investigadora
Dra. Luz Rodeles	FCM-UNL	Investigadora asesora
Dra. Ruth Aragón	FCM-UNL	Investigadora
Dr. Fabio Nachman	Fundación Favaloro	Investigador asesor
Ing. Guillermo George	INLAIN (UNL-CONICET)	Responsable de planta piloto
Lic. Victoria Beret	INLAIN (UNL-CONICET)	Becaria doctoral
Lic. Melisa Puntillo	INLAIN (UNL-CONICET)	Becaria posdoctoral
Alan Cavalcante	FCM-UNL	Becario de grado

Introducción

Los alimentos fermentados se definen como alimentos obtenidos mediante el crecimiento microbiano deseado y las conversiones enzimáticas de los componentes alimentarios (Marco et al., 2021). Dentro de los alimentos fermentados, el yogur es uno de los más consumidos (Brodziak et al., 2020). En Argentina, la comercialización de yogur representó el 15% del total en 2021 (OCLA, 2021). El yogur se obtiene por la fermentación controlada de la leche con dos bacterias específicas que se desarrollan de forma simbiótica: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. La incorporación de yogur en la dieta provee numerosos nutrientes, entre ellos, proteínas de alto valor biológico y minerales como calcio y fósforo, además del aporte de microorganismos viables que puede tener efectos benéficos en la composición y función de la microbiota y en la fisiología del consumidor (Marco et al., 2017; Melini et al., 2019).

La microbiota humana es el conjunto de microorganismos (bacterias, levaduras, mohos, arqueas, virus y protozoarios) que colonizan las superficies externas (piel, ojos) e internas (tracto gastrointestinal, vagina, árbol respiratorio). En particular la microbiota intestinal es la más relevante en términos de diversidad y abundancia de especies microbianas, y por las funciones que ejerce sobre el organismo. Constituye una primera barrera física de defensa contra antígenos y patógenos alimentarios, pero además se encuentra en íntimo contacto con el sistema inmunológico intestinal, donde residen más del 70% de las células con función inmunológica de nuestro cuerpo.

En los últimos años ha cobrado relevancia el aumento del contenido proteico en yogur (ej. yogur estilo Griego) y su utilización como matriz para vehicular compuestos bioactivos y microorganismos con efectos benéficos para la salud (Corbo et al., 2014). Particularmente, las proteínas lácteas han demostrado la capacidad de inducir saciedad al consumidor, lo cual en combinación con una reducción del contenido graso y de carbohidratos, resulta apropiado en la formulación de productos con baja densidad energética y alto poder saciante (Tremblay et al., 2015). Además, las proteínas lácteas tienen la capacidad de aumentar la cantidad y variedad de aminoácidos plasmáticos y de desencadenar la síntesis de proteínas musculares (Jorgensen et al., 2019). Por su parte, se ha reportado que aproximadamente el 70% de la población mundial presenta dificultades para digerir y absorber la lactosa (azúcar de la leche), por lo que el consumo de yogur reducido en este azúcar resultaría beneficioso para contrarrestar los inconvenientes que presentan los intolerantes a la lactosa (distensión abdominal, problemas gastrointestinales, etc.) (Vénica et al., 2016). Debe tenerse en cuenta que los productos lácteos como el yogur son una fuente importante de calcio y fósforo, contribuyendo mayoritariamente a la ingesta diaria recomendada. Existe evidencia de una asociación inversa entre la ingesta de calcio con la

obesidad, el colesterol total y la presión sanguínea (Barba y Russo, 2006; van Mierlo et al., 2006; Torres et al., 2011).

Según la Organización Mundial de la Salud, el sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. La causa fundamental de ambas condiciones es un desequilibrio energético entre las calorías consumidas y las gastadas, desencadenado por un aumento en la ingesta de alimentos de alto contenido calórico ricos en grasa y un descenso en la actividad física vinculado a los patrones laborales actuales, el acceso a los medios de transporte y la urbanización. Las múltiples consecuencias de estas condiciones representan un importante factor de riesgo de enfermedades no transmisibles como enfermedades cardiovasculares, diabetes, trastornos del sistema locomotor y algunos tipos de cáncer (OMS, 2021). En Argentina, según datos de la Encuesta Nacional de Factores de Riesgo realizada en 2013, el porcentaje de población que presentaba sobrepeso y obesidad alcanzaba el 57,9%, mostrando un aumento del 8,8% desde el 2005 hasta el 2013 (Braga, 2018).

En este contexto, el desarrollo de un yogur incrementado en proteínas lácteas, con el consecuente aporte de calcio, reducido en contenido graso y en carbohidratos (deslactosado, sin azúcares agregados) y endulzado con edulcorante natural, stevia, podría ampliar la oferta de alimentos funcionales que contribuyan a la reducción del sobrepeso y la obesidad y enfermedades asociadas. La verificación de sus propiedades benéficas a través de datos obtenidos mediante un estudio clínico en humanos resulta de suma relevancia dada la evidencia experimental que permite establecer relaciones entre los componentes de un alimento funcional y la salud (AbuMweis et al., 2010).

Referencias

AbuMweis, S.S., Jew, S. y Jones, P.J. (2010) Optimizing clinical trial design for assessing the efficacy of functional foods. *Nutrition Reviews*. 68(8):485-99. doi: 10.1111/j.1753-4887.2010.00308x.

Barba, G., y Russo, P. (2006). Dairy foods, dietary calcium and obesity: A short review of the evidence. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 16(6), 445–451. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2006.04.004>

Braga, F. (2018). El gigante invisibilizado Diagnóstico de la situación nutricional y propuesta de política pública para combatir la obesidad en Argentina. Universidad de San Andrés. Argentina.

Brodziak, A., Król, J., Barłowska, J., Teter, A., y Florek, M. (2020). Changes in the physicochemical parameters of yoghurts with added whey protein in relation to the starter bacteria strains and storage time. *Animals*, 10(8), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ani10081350>

Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Petrucci, L., Casanova, F. P., y Sinigaglia, M. (2014). *Functional Beverages: The Emerging Side of Functional Foods: Commercial Trends, Research,*

and Health Implications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(6), 1192–1206. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12109>

Jørgensen, C. E., Abrahamsen, R. K., Rukke, E. O.; Hoffmann, T. K., Johansen, A. G., Skeie, S. B. (2019). Processing of high-protein yoghurt – A review. *International Dairy Journal*, 88, 42–59. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.08.002>

Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., Gänzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E. J., y Hutkins, R. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010>

Marco, M. L., Sanders, M. E., Gänzle, M., Arrieta, M. C., Cotter, P. D., de Vuyst, L., Hill, C., Holzapfel, W., Lebeer, S., Merenstein, D., Reid, G., Wolfe, B. E., y Hutkins,

R. (2021). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 18(3), 196–208. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00390-5>

Melini, F., Melini, V., Luziatelli, F., Ficca, A. G., y Ruzzi, M. (2019). Health-promoting components in fermented foods: An up-to-date systematic review. *Nutrients*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/nu11051189>

Observatorio de la cadena láctea argentina (OCLA) (2021) Ventas de Productos Lácteos en el Mercado Interno – septiembre 2021. Recuperado de: <https://www.ocla.org.ar/contents/news/details/21017997-ventas-de-productos-lacteos-en-el-mercado-interno-septiembre-2021#:~:text=La%20variación%20mensual%20de%20ventas,que%20septiembre%20del%20año%20pasado> (último acceso: 18/03/22)

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2021) Obesidad y sobrepeso. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (último acceso: 18/03/22)

Torres, M. R. S. G., da Silva Ferreira, T., Carvalho, D. C., y Sanjuliani, A. F. (2011). Dietary calcium intake and its relationship with adiposity and metabolic profile in hypertensive patients. *Nutrition*, 27(6), 666–671. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.07.012>

Tremblay, A., Doyon, C., y Sanchez, M. (2015). Impact of yogurt on appetite control, energy balance, and body composition. *Nutrition Reviews*, 73, 23–27. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv015>

van Mierlo, L. A. J., Arends, L. R., Streppel, M. T., Zeegers, M. P. A., Kok, F. J., Grobbee, D. E., y Geleijnse, J. M. (2006). Blood pressure response to calcium supplementation: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Human Hypertension*, 20(8), 571–580. <https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1002038>

Vénica, C. I., Wolf, I. V., Bergamini, C. V. y Perotti, M. C. (2016). Influence of lactose hydrolysis on galacto-oligosaccharides, lactose, volatile profile and physicochemical parameters of different yogurt varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 4929-4939.

Código del protocolo	
Título del protocolo	Estudio del efecto de la administración de un yogur enriquecido con proteínas en la composición de la microbiota intestinal y parámetros metabólicos en adultos con sobrepeso
Objetivos del estudio	<p>Primario: estudiar el impacto del consumo del producto sobre la composición de la microbiota intestinal en humanos.</p> <p>Secundarios: estudiar el efecto del consumo del producto sobre parámetros sanguíneos relacionados a desórdenes metabólicos en cuadros de sobrepeso. determinar el impacto del producto en el disconfort abdominal según una encuesta validada en español (escala de evaluación de síntomas gastrointestinales, GSRS, por sus siglas en inglés).</p>
Diseño del estudio	<p>Este estudio es una investigación prospectiva, aleatorizada, de una rama, longitudinal, de 30 días de duración, con evaluador ciego de la eficacia. Las mediciones se realizarán al inicio y al final del estudio. Los 45 sujetos en total serán voluntarios seleccionados en función de los criterios indicados a continuación:</p> <p>El alimento en estudio (yogur enriquecido en proteínas, reducido en grasas y en lactosa, natural, endulzado con el edulcorante natural stevia), será elaborado en la planta piloto de la Escuela Técnica N° 298 Don Miguel Manfredi (Franck, Santa Fe), la cual cuenta con la habilitación sanitaria de la ASSAL. Será trasladado al INLAIN en un transporte refrigerado habilitado para el traslado de alimentos y se mantendrá en condiciones de refrigeración hasta su consumo.</p> <p>El alimento en estudio (120-150g) se consumirá una vez por día (de lunes a viernes) y se suministrará en el INLAIN.</p> <p>En el día 0 y 30 se analizarán los parámetros sanguíneos y la composición de la microbiota intestinal, semanalmente se evaluarán los síntomas digestivos (la primera vez acompañado de un médico del equipo y las 4 veces restantes mediante un formulario on line de Google forms enviado por whatsapp).</p>
Criterios de elegibilidad	<p>Sujetos de 18 a 65 años de edad de ambos sexos. Deben presentar IMC de 25-29,9 (sobrepeso grado I y II). Deben ser omnívoros. Deben consumir lácteos regularmente.</p> <p>Criterios de exclusión Tratamientos con fármacos antimicrobianos en los últimos 30 días previos al estudio. Dieta vegana o vegetariana. Intolerancias alimentarias (incluida intolerancia a la lactosa), restricciones o reacciones adversas a los productos lácteos. Enfermedades crónicas (diabetes mellitus, hipo/hipertiroidismo,</p>

	<p>enfermedades autoinmunes u oncológicas) y otras enfermedades o condiciones que por criterio médico, se considere que puedan afectar la función gastrointestinal e intervenir como factores potencialmente confundidores en la evaluación de los objetivos del estudio.</p> <p>Infecciones agudas o crónicas en curso.</p> <p>Historial de anemia (menos de 10 de Hb) en los últimos 6 meses previos al comienzo del estudio.</p> <p>Actividad física intensa (más de 6 horas por semana).</p> <p>Consumo de suplementos nutricionales regularmente.</p> <p>Embarazo o lactancia en curso.</p> <p>Hábito enolista de jerarquía: no más de 10 g de alcohol por día para mujeres y 20 g por día para hombres (más o menos el equivalente a 1 vaso de cerveza, 1 copa de vino).</p>
Criterios de evaluación	<p>Consideraciones bioéticas: el protocolo y el documento de consentimiento informado serán evaluados por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNL y por el comité de ética del CCT-CONICET Santa Fe. Se invitará a participar a sujetos que, a priori, reúnan los criterios de inclusión. Se les informará en qué consiste el estudio y en caso de aceptar participar, se procederá a la obtención del consentimiento informado. Luego, del consentimiento, se continuarán los exámenes clínicos para asegurarse de descartar que ninguno de los criterios de exclusión esté presente y la persona sea realmente elegible.</p> <p>Evaluaciones preliminares</p> <p>Se concretará una consulta inicial con las personas interesadas en participar, a cargo de los profesionales de salud del equipo. Se realizará una entrevista nutricional, anamnesis clínica general y examen físico con determinación de medidas antropométricas (circunferencia de cintura, peso y talla) orientados a la detección de posibles causales de exclusión.</p> <p>Selección de participantes: una vez seleccionados, los participantes serán convocados y se les explicará cómo se llevará adelante el estudio, explicando detalladamente de qué manera deben proceder. Esta tarea será llevada a cabo por el equipo de investigación.</p> <p>Evaluaciones durante el estudio</p> <p>Durante las visitas para el suministro del yogur, se le preguntará a los participantes sobre aparición de algún efecto indeseable (náuseas, vómitos, diarrea, constipación, disconfort o distensión abdominal) para su registro y eventualmente, control clínico en el caso de requerirlo y exclusión del estudio si fuera necesario. Se preguntará sobre la aparición de cualquier cambio o evento que haya notado o sentido desde la anterior visita (eventos adversos o no), y sobre efectos favorables según su percepción.</p>

	<p>Evaluaciones primarias sobre muestras sanguíneas y de materia fecal</p> <p>Al inicio y finalización del estudio, a partir de una muestra de sangre venosa entera (10 mL):</p> <p>Hemograma Glucemia en ayunas Insulinemia en ayunas Colesterol total Colesterol HDL Triglicéridos en ayunas Proteína C reactiva cuantitativa</p> <p>Con estos datos se procederá a calcular el LDLc y con la insulinemia, el HOMA-IR, de acuerdo a las fórmulas correspondientes. Estos análisis se realizarán en un laboratorio de análisis clínicos habilitado de la ciudad de Santa Fe. Los análisis serán indicados por el profesional de salud del equipo en una visita donde se analizarán los criterios de inclusión/exclusión. Ni la visita médica ni los análisis tendrán costo para los participantes.</p> <p>Al inicio y finalización del estudio se solicitará una muestra de materia fecal (que se conservará a -70°C hasta el momento del análisis) para el estudio de la composición de la microbiota intestinal por secuenciación masiva del gen 16s rADN. Estos análisis se realizarán en la Unidad de Genómica del INTA de Castelar (Buenos Aires); las muestras de ADN serán trasladadas bajo refrigeración. El análisis no tendrá costo para los participantes.</p> <p>Evaluación de la aparición de síntomas digestivos de disconfort abdominal: semanalmente los participantes deberán responder el cuestionario GSRS sobre síntomas digestivos provisto por el evaluador ciego de eficacia (la primera vez acompañado de un médico del equipo y las 4 veces restantes mediante un formulario on line de Google forms enviado por whatsapp).</p>
Tamaño de muestra	<p>Dado que se trata de un primer trabajo de carácter exploratorio, el tamaño de la muestra (máximos de 45 personas) se estimó de acuerdo a trabajos previos y a las posibilidades operativas y económicas del grupo de investigación.</p> <p>En trabajos previos, la cantidad de personas que participaron por grupo fueron:</p> <p>24 (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32994487/) 30 (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29453751/) 14 (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28558854/) 11 (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27133564/) 15 (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18077045/) 11 (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17927751/)</p>

Tratamiento del estudio	Yogur enriquecido en proteínas, reducido en grasas y en lactosa, natural, endulzado con stevia, elaborado en el marco de un Proyecto de Unidades Ejecutoras- CONICET (N°22920160100023, Res. N° D4119/2016); 120-150 g/día, de lunes a viernes, durante 4 semanas.
Número de sujetos	45 sujetos seleccionados de manera no probabilística, por conveniencia, de ambos sexos, de entre 18 y 65 años.
Duración de la participación de los pacientes	Hasta un máximo de 8 semanas: 2 semanas de selección seguidas de un período de tratamiento de 4 semanas y un seguimiento (telefónico, virtual) posterior de 2 semanas.

Composición detallada del producto en estudio:

Proteínas	6,8 %
Grasa	1-1,5%
Hidratos de Carbono	3-4,5%
Lactosa	1-1,5%
Glucosa + Galactosa	2-3%

La elaboración del yogur consistirá de los siguientes pasos:

- Preparación de la leche base: adición, a la leche fluida parcialmente descremada estandarizada (1,5% de materia grasa), de los ingredientes lácteos en polvo: leche en polvo descremada, concentrados de proteínas de suero (WPC 40), y pectina (en polvo), Tratamiento térmico (85 °C durante 20 min),
- Enfriamiento hasta 42 °C,
- Agregado de la enzima β -galactosidasa e inoculación con el fermento de yogur (dosis recomendada por el fabricante, para alcanzar 10^6 UFC/mL de leche),
- Mantenimiento de la mezcla a $42 \pm 0,5^\circ\text{C}$, hasta alcanzar un pH 4,75 (5 h, aproximadamente),
- Enfriamiento bajo suave agitación, hasta alcanzar una temperatura de 25 °C, y adición del edulcorante natural,
- Envasado en potes (100-120 g) y sellado hermético con tapa de aluminio termosellable, Almacenamiento refrigerado ($< 10^\circ\text{C}$).

Consideraciones de bioseguridad: las muestras de yogur serán envasadas inmediatamente después de su elaboración, en el lugar de elaboración (Escuela Técnica N° 298 Don Miguel Manfredi, Franck, Santa Fe) en envases para yogur grado alimentario, selladas herméticamente con tapa de aluminio y mantenidas en cámara fría (6°C) hasta su traslado a la ciudad de Santa Fe. La Escuela posee la habilitación de la ASSAL (Agencia Santafesina de Seguridad Alimentaria) como planta elaboradora de alimentos. Las muestras serán trasladadas al INLAIN mediante un transporte habilitado para el transporte de productos lácteos (refrigerado). Las mismas se almacenarán (6°C) en dependencias del INLAIN en una heladera vertical (tipo visor) destinada exclusivamente para este estudio.

Metodología de visita médica: la visita médica de screening se realizará en una sala-consultorio asignada por la Facultad de Ciencias Médicas de la UNL. La misma estará equipada con balanza, cinta métrica y tensiómetro. Se determinarán las medidas antropométricas: peso

corporal (kg) y talla (cm) utilizando balanza de pesas corredizas con altímetro para adultos (capacidad de 5 a 150 kg). Con los datos obtenidos se calculará el IMC (peso en kg/talla en cm²) y se clasificarán los participantes en dos grupos: normal ($18.5 \leq \text{IMC} < 25$) y sobrepeso (≥ 25 y ≤ 30). La circunferencia de cintura se determinará empleando una cinta métrica plástica flexible e inextensible (1 mm de precisión).

Muestras de sangre: se tomarán en un laboratorio de análisis clínicos certificados con estándares de calidad de la ciudad de Santa Fe a determinar (opciones Analytica, Alkemy), según los procedimientos validados en el laboratorio. Cabe destacar que las muestras se tomarán en sitios acondicionados para la extracción, en ayunas, a través de venopunción, colocándose en tubos estériles (con heparina sódica o EDTA 10% según corresponda). Se separará parte de la muestra para hemograma y una segunda alícuota será destinada a las determinaciones séricas/plasmáticas. Para ello, las muestras serán centrifugadas a 2500-3000 rpm durante 5 a 10 minutos, permitiendo la extracción del suero/plasma de la muestra. Se conservarán en freezer de -20 °C hasta su procesamiento en el mismo laboratorio, no siendo el mismo más allá de un período de 24 horas desde su obtención.

Muestra de materia fecal: se le solicitará al participante que realice en su domicilio una toma de muestra de materia fecal el día antes de comenzar a consumir el yogur y el día después de la última toma. Se les proveerá un vaso colector estéril, conteniendo buffer de transporte y la indicación de cantidad a tomar. Se solicitará su transporte al INLAIN en el mismo día de la toma. Las muestras se conservarán en el INLAIN en un freezer a -70°C. El ADN total bacteriano se extraerá utilizando el kit de extracción QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN purificado será enviado a la Unidad de Genómica del INTA de Castelar para la secuenciación masiva del gen 16s ADN. El tratamiento bioinformático de los datos (curvas de rarefacción, identificación de especies, tratamiento estadístico de datos) se realizará en colaboración con el Dr. Ariel Amadio del INTA Rafaela.

Bioética: el presente proyecto se realizará cumpliendo las pautas establecidas en las disposiciones de ANMAT correspondiente a la Guía de buenas prácticas en investigación clínica en seres humanos (1490/2007), así como las Guías de Buenas Prácticas Clínicas ICH GCP 6 vigentes en su segunda adenda. A nivel provincial, se enmarcará bajo lo previsto en la Ley 13.937 del Poder Legislativo de Santa Fe, para investigaciones en salud que involucren seres humanos como sujetos de las mismas.

Se enmarca así bajo las declaraciones y/o principios éticos para la investigación con seres humanos establecidos en el Código de Nüremberg, el Informe Belmont, y la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial.

Se solicitará aval del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLy del Comité de ética y seguridad del CCT-CONICET Santa Fe. Posteriormente, se procederá a registrar el estudio en el Comité de Bioética de la Provincia de Santa Fe.

Cabe destacar que todo sujeto que sea potencial de participar en el estudio se le informará respecto a los objetivos, intervenciones, requerimientos así como los riesgos de participar en el mismo. Posteriormente, se procederá a una lectura conjunta del mismo con el profesional de salud y en caso de que la persona acepte participar, se realizará la firma del documento. Luego, se le entregará una copia escrita del consentimiento informado. Sólo participaran del estudio aquellas personas que manifiesten su voluntad de participar libremente en el estudio y accedan al mismo mediante firma correspondiente del consentimiento informado. Todos los procedimientos específicos del estudio se realizarán posteriormente a la firma del consentimiento informado. Con anterioridad al mismo, únicamente podrá consultarse a las personas por datos generales que permitan una primera aproximación para estimar los criterios de inclusión/exclusión.

Consideraciones de manejo de datos personales: las bases de datos se diseñarán y completarán asegurando la codificación de cada paciente de manera que salvaguardar la confidencialidad de sus datos personales, así como del resto de la información clínica y epidemiológica. Sólo tendrán acceso a la información de la codificación los profesionales de la salud a cargo del seguimiento de los pacientes y las personas miembro del equipo de investigación específicamente autorizadas para contribuir con la carga de datos, con la capacitación requerida. Estos mismos recaudos serán tomados para el manejo de las muestras biológicas correspondientes a cada paciente.

Análisis estadístico: La base datos se configurará en planilla de cálculo de Microsoft Excel, generando gráficos y análisis estadísticos requeridos con GraphPad 5.03(GraphPad Software, EE. UU.). La distribución de las variables cuantitativas se evaluará mediante histograma de distribución de frecuencias y las pruebas de Schapiro Wilks o Kolmogorov Smirnov, según el tamaño muestral. Las variables continuas distribuidas de forma paramétrica se expresarán como media y desvío estándar (\pm DE). Para comparación de medias provenientes de muestras independientes, se empleará la prueba T de Student para muestras no apareadas o ANOVA de una vía según el caso, seguido de prueba post hoc para identificar la diferencia intragrupos. Para las variables con distribución no paramétrica, los valores se expresaron como mediana e intervalo intercuartil (p25-p75). Para realizar comparaciones entre grupos, se emplearán las pruebas U de Mann Whitney Kruskall Wallis según correspondiere al número de categorías. En el caso de emplear Kruskall Wallis, se utilizará el post test de Dunn para comparaciones múltiples entre grupos seleccionados. Se determinará el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman y R2 ajustado para estimar la asociación entre dos variables cuantitativas. Se utilizarán porcentajes y

recuentos absolutos para la cuantificación de frecuencia en categorías y pruebas χ^2 o exacta de Fisher para analizar la relación entre dos variables categóricas (pruebas de independencia), incorporándose coeficientes de contingencia cuando se trate de más de dos categorías en alguna de las variables. Se considerará un nivel α de 0.05 para todas las pruebas estadísticas a dos colas.

Financiamiento: todos los gastos derivados de este protocolo serán cubiertos por el Proyecto de Unidades Ejecutoras (PUE) de CONICET. Título: “Desarrollo de una bebida láctea fermentada multifuncional para contribuir a las estrategias contra la globesidad”, N° °: 22920160100023, Res. D4119/2016.

**CUESTIONARIO PARA LA EVALUACIÓN DE SÍNTOMAS
GASTROINTESTINALES (GSRS)**

Este cuestionario se refiere a cómo se ha encontrado Ud. durante **la última semana**

	<i>Ninguna molestia en absoluto</i>	<i>Molestias insignificantes</i>	<i>Molestias ligeras</i>	<i>Molestias moderadas</i>	<i>Molestias bastante fuertes</i>	<i>Molestias fuertes</i>	<i>Molestias muy fuertes</i>
1-¿Ha tenido dolor o malestar en la parte alta del abdomen o en la boca del estómago?	0	1	2	3	4	5	6
2-¿Ha tenido ardor de estómago? (sensación desagradable de quemazón en el pecho)	0	1	2	3	4	5	6
3-¿Ha tenido reflujo ácido? (subida de pequeñas cantidades de ácido desde el estómago a la garganta)	0	1	2	3	4	5	6
4-¿Ha tenido sensación de hambre? (Necesidad de comer entre comidas)	0	1	2	3	4	5	6
5-¿Ha tenido náuseas? (sensación previa a las arcadas y a los vómitos)	0	1	2	3	4	5	6
6-¿Le han estado molestando los ruidos en el estómago? (vibraciones o sonidos en su estómago)	0	1	2	3	4	5	6
7-¿Ha sentido el estómago hinchado?(gases en el estómago)	0	1	2	3	4	5	6
8-¿Ha tenido ERUCTOS? (Expulsión de aire por la boca, que se asocia a menudo con una sensación de alivio)	0	1	2	3	4	5	6
9-¿Ha tenido FLATULENCIAS? (Necesidad de soltar gases, que se asocia con una sensación de	0	1	2	3	4	5	6

alivio)							
10-¿Ha estado CONSTIPADO? (ir de cuerpo con menor frecuencia que lo habitual)	0	1	2	3	4	5	6
11-¿Ha tenido DIARREA? (Aumento excesivo en la frecuencia de las heces líquidas)	0	1	2	3	4	5	6
12-¿Ha tenido deposiciones blandas? (Molestias que haya podido sentir a causa de las deposiciones blandas)	0	1	2	3	4	5	6
13-¿Ha tenido deposiciones duras? (Molestias que haya podido sentir a causa de las deposiciones duras)	0	1	2	3	4	5	6
14-¿Ha tenido una necesidad urgente de ir de cuerpo? (necesidad repentina de ir al baño, con sensación de “no poder aguantar más”)	0	1	2	3	4	5	6
15-Al evacuar ¿Ha tenido la sensación de no haber terminado completamente de ir de cuerpo? (esto a pesar de haberse esforzado)	0	1	2	3	4	5	6

Anexo 6.2

ESTUDIO DE INVESTIGACION

TITULO: *Estudio del efecto de la administración de un yogur enriquecido con proteínas en la composición de la microbiota intestinal y parámetros metabólicos en adultos con sobrepeso.*

INFORMACION PARA EL PARTICIPANTE

Introducción

La microbiota intestinal, antes denominada flora intestinal, es el conjunto de microorganismos que se hospedan en nuestro intestino, y desde donde llevan a cabo numerosas funciones importantes para nuestra salud, como la digestión de la fibra de los alimentos, la producción de vitaminas y neurotransmisores, la estimulación del sistema inmune, la prevención de infecciones intestinales y la regulación de numerosas funciones metabólicas, entre otras.

El yogur es un alimento fermentado milenario, producido actualmente mediante la fermentación de la leche con dos bacterias específicas, denominadas *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. Estudios previos llevados adelante en otros lugares del mundo sugieren que el consumo sostenido de yogur podría tener un impacto positivo en la composición de la microbiota intestinal (aumento de la diversidad microbiana, aumento de especies bacterianas intestinales benéficas, disminución de microorganismos potencialmente patógenos) y en parámetros sanguíneos indicadores del metabolismo (glucemia, insulinemia, colesterol, triglicéridos, proteína C reactiva). Sin embargo, los estudios de los efectos del consumo de yogur sobre la microbiota intestinal y los parámetros sanguíneos de personas con sobrepeso son aún escasos. Por otro lado, la composición de la microbiota intestinal varía según la región geográfica que se considere, debido a los diferentes patrones alimentarios que se siguen en las diferentes partes del mundo, por lo que se carece de datos de cómo es la composición de la microbiota intestinal en personas con sobrepeso en Argentina, y cuál es el efecto del consumo de yogur en esta población.

En este contexto, se lo invita a Ud. a participar de manera totalmente **voluntaria** en el estudio de investigación denominado *Estudio del efecto de la administración de un yogur enriquecido con proteínas en la composición de la microbiota intestinal y parámetros metabólicos en adultos con sobrepeso.*

Este trabajo tiene tres objetivos:

Estudiar el efecto del consumo de yogur en la composición de la microbiota intestinal de personas con sobrepeso.

Estudiar el efecto del consumo de yogur en parámetros sanguíneos relacionados al metabolismo de personas con sobrepeso.

Estudiar el efecto del consumo de yogur en síntomas digestivos de personas con sobrepeso.

¿De qué se trata el estudio?

El estudio tiene por objetivo determinar el efecto del consumo, durante 4 semanas, de un yogur enriquecido en proteínas lácteas en la composición de la microbiota intestinal (flora intestinal), en parámetros sanguíneos (glucemia, insulinemia, colesterol, triglicéridos, proteína C reactiva) y en síntomas digestivos de personas con sobrepeso que residen en la ciudad de Santa Fe. Por tanto, sería muy valioso poder contar con su participación en nuestro estudio para el avance de la ciencia en este tema. La participación es totalmente voluntaria y desinteresada, esto quiere decir que Ud. no tiene ninguna obligación de participar, solo debe hacerlo si así lo desea, y no recibirá ningún tipo de compensación económica por hacerlo.

El yogur que se utilizará en este estudio será elaborado en la planta piloto de la Escuela Técnica N° 298 Don Miguel Manfredi de Franck (Santa Fe) y consistirá en un yogur natural (sin agregado de colorantes ni saborizantes), parcialmente descremado, endulzado con stevia (edulcorante natural) y enriquecido con proteínas lácteas (50% más de proteínas que un yogur estándar, para favorecer la saciedad) y reducido en lactosa (azúcar naturalmente presente en la leche). La planta cuenta con la habilitación sanitaria para la producción de alimentos de la ASSAL (Agencia Santafesina de Seguridad Alimentaria).

El protocolo de este estudio fue analizado y aprobado por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional del Litoral.

¿En qué consistirá mi participación en el estudio?

Su participación consistirá, en una primera instancia, en una entrevista personal de 45 minutos (máximo) con un profesional de salud en la ciudad de Santa Fe (médico parte del equipo de investigadores), en una sala en la Facultad de Ciencias Médicas (UNL) de la Ciudad Universitaria de Santa Fe, donde se registrará su peso y altura, entre otros datos. Esta entrevista será privada, y se le pedirá que conteste con sinceridad preguntas relacionadas al tema de estudio.

Si es seleccionado para participar, y al aceptar participar, se le solicitará que consuma una porción de 120-150 g de yogur por día, de lunes a viernes, como colación a media mañana,

durante 4 semanas consecutivas. Se le requerirán dos muestras de sangre y dos muestras de materia fecal, una antes de comenzar a consumir el yogur y otra luego del último consumo, es decir, con diferencia de 4 semanas entre muestras. También se le solicitará que complete un cuestionario de síntomas gastrointestinales al finalizar cada semana. En todas las instancias, y siempre que lo considere necesario, será asesorado por los integrantes del grupo de investigación.

La toma de muestras para efectuar el análisis de sangre para evaluar los parámetros mencionados anteriormente se realizará en un laboratorio de análisis clínico habilitado, dentro de la ciudad de Santa Fe. Estos estudios no tendrán ningún costo para Ud. (totalmente gratuito).

A todos los participantes se les solicitará el compromiso de no consumir ningún otro alimento fermentado (yogur, queso, kéfir, kombucha, kimchi, embutidos, pan de masa madre) o suplementos probióticos o prebióticos, durante 4 semanas consecutivas. Se le invitará a que concurra al Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, CONICET-UNL), ubicado en la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral (Santiago del Estero 2829, Santa Fe) una vez por semana, en días y horarios que serán acordados oportunamente, durante 4 semanas consecutivas, para retirar las porciones de yogur que consumirá a lo largo de la semana (5 porciones de 120-150 g de yogur envasado y refrigerado). Se le solicitará también una pequeña porción de materia fecal, tomada por Ud. en su domicilio en un recipiente colector estéril que se le entregará con las instrucciones para realizarlo, tanto al inicio como al final del estudio. Las muestras de materia fecal deberán ser entregadas en el INLAIN lo más pronto posible luego de la recolección. En dichas muestras se analizará la composición de la microbiota intestinal.

¿Qué sucederá luego con la información recolectada?

Toda la información recolectada será absolutamente confidencial, esto quiere decir que solo el médico que realizó la entrevista podrá acceder a ella y que no se utilizará información personal que pueda identificarlo (ya que los registros se hacen de forma anónima). La información se guardará en lugar seguro y luego será destruida al cabo de 3 años de finalizado el estudio. En pos de la difusión de los resultados de esta investigación, es posible que al terminar el estudio los resultados se presenten en Congresos y que sean publicados en revistas científicas. Sin embargo, estas comunicaciones no incluyen en ningún caso datos personales de los participantes, sino que son datos anónimos. Todos los datos personales de las personas que participan serán guardados en forma confidencial y su nombre no será revelado nunca. Inclusive en las bases de datos la información se carga y procesa en forma codificada, sin identificación de nombre y apellido.

¿Qué sucede si no quiero participar en el estudio?

La participación en esta investigación es totalmente VOLUNTARIA. Si decide participar, tiene libertad para retirar su consentimiento y dejar de participar en cualquier momento, sin dar explicación alguna y sin perjuicio alguno.

¿A quién puedo recurrir en caso de dudas?

Podrá contarse con el profesional médico que le realizó la entrevista para su inclusión en este estudio (los datos de contacto les serán facilitados en esa instancia) o al investigador responsable (Dr. Gabriel Vinderola, Email: gvinde@fiq.unl.edu.ar, teléfono de línea y whatsapp: 3426311943. Incluso antes de dar su consentimiento, puede contactarse para evacuar dudas que le permitan tomar una decisión respecto a su participación.

Si deseo participar, ¿tendrá algún costo para mi colaborar en este estudio?

No, su participación es gratuita. Ud. no deberá pagar nada por participar en el estudio. Solo se le solicitará que tenga a bien hacerse cargo de los gastos de traslado a los diferentes lugares necesarios para su participación en el estudio, todos dentro de la ciudad de Santa Fe, a saber: consultorio del médico donde se hará la entrevista, laboratorio de análisis de sangre, INLAIN, para el retiro de muestras.

¿Qué beneficio puedo obtener por participar del estudio?

Es posible que no se obtenga ningún beneficio directo inmediato percible de la participación en este estudio, ya que la misma es necesaria en primera instancia para recolectar información. De todos modos, podrá tener acceso a los resultados de sus análisis de sangre. Los resultados de la composición de la microbiota se analizan y se informan como grupo (a tiempo cero y luego de 4 semanas), y no a manera individual, por las características del análisis a realizar, y Ud. contará con dicha información. La participación en este tipo de estudios tiene una gran componente altruista (procura de un bien común de forma desinteresada), y se espera que sea una experiencia enriquecedora para el participante y reconfortante por el hecho de contribuir al avance de la ciencia. Además, su participación en el estudio podría resultar beneficiosa para la comunidad, al ayudar a entender mejor el efecto del consumo de yogur en la microbiota intestinal, en los parámetros intestinales y síntomas digestivos de personas con sobrepeso, además de la satisfacción de saberse partícipe de un estudio pionero en la región.

¿Cuáles son los riesgos de participar en el estudio?

Los efectos adversos de la extracción de sangre venosa por venopunción, si se realiza correctamente y bajo todas las normas de bioseguridad, son prácticamente inexistentes, siendo el más común la posterior presencia de un hematoma (moretón) en el sitio de punción que se resuelve habitualmente sólo. El consumo de un yogur puede ocasionar eventualmente algún grado de discomfort abdominal (hinchazón, diarrea, distensión abdominal, gases). Ante la aparición de cualquier síntoma de discomfort que usted relacione a su participación en el estudio, puede contactarse inmediatamente con el médico responsable de este estudio. Si por algún motivo Ud. (o su médico de cabecera) decide que prefiere interrumpirlo, Ud. podrá comunicarse para informar su decisión sobre el cese de su participación en el mismo en cualquier momento

Muchas gracias por considerar participar!!!

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo,....., D.N.I..... manifiesto que he sido informado de

*lo expresado más arriba y doy mi consentimiento de participar voluntariamente en la investigación titulada **Estudio del efecto de la administración de un yogur enriquecido con proteínas en la composición de la microbiota intestinal y parámetros metabólicos en adultos con sobrepeso** a través de permitir la asignación al grupo de estudio, así como la utilización de las muestras extraídas (sangre y materia fecal) con fines exclusivamente científicos.*

Sé que mis datos personales serán resguardados y que se puede dejar de participar en cualquier momento del estudio.

Declaración de consentimiento del paciente:

- 1) El médico del estudio o un miembro designado del personal del estudio cuya firma aparece más abajo me han informado de palabra y por escrito de los objetivos, los procedimientos del estudio, los posibles beneficios y los posibles riesgos relacionados con mi participación en este estudio de investigación.
- 2) He tenido la oportunidad suficiente para considerar si quiero participar en este

estudio de investigación.

- 3) Me han respondido satisfactoriamente las preguntas que tenía sobre mi participación en este estudio. Voy a recibir una copia de mi consentimiento informado firmado.
- 4) He comprendido que los resultados del estudio al cual accedo a realizarme permiten una mejor comprensión del efecto del consumo de yogur sobre la composición de la microbiota intestinal, los parámetros sanguíneos y los síntomas digestivos de personas con sobrepeso.
- 5) He comprendido que un código numérico exclusivo identificará mi resultado, y mi nombre no se utilizará en ninguna información o actividad de difusión. Cuando termine el estudio, es posible que los resultados del estudio se utilicen con fines de formación académica (presentación a congresos o revistas científicas).
- 6) Los estudios que se realizarán son completamente gratuitos y no debo abonar ningún costo relacionado al mismo, a excepción de costear los gastos derivados a los desplazamientos dentro de la ciudad de Santa Fe con objeto de la toma/entrega de muestras (sangre, materiafecal) y para acceder al producto yogur.
- 7) Entiendo que al participar del estudio se me van a realizar: una entrevista personal, dos extracciones de sangre por venopunción, dos entregas de muestra de material fecal, y responder en cinco oportunidades un cuestionario sobre síntomas digestivos (la primera vez acompañado de un médico del equipo y las 4 veces restantes mediante un formulario *on line* de Google forms enviado por whatsapp), y el consumo (o no) de un yogur por día, de lunes a viernes, durante 4 semanas consecutivas. Los efectos adversos de dicha extracción de sangre venosa, si se realiza correctamente y bajo todas las normas de bioseguridad, son prácticamente inexistentes, siendo el más común la posterior presencia de un hematoma (moretón) en el sitio de punción que se resuelve habitualmente sólo.
- 8) Comprendo que los profesionales de salud se contactarán conmigo notificando el resultado del análisis de sangre.
- 9) En ningún momento mis datos personales serán comunicados a terceros. La persona en conocimiento del resultado de mi prueba será sólo el profesional médico que me ha atendido. Mis datos personales se tratarán de manera confidencial durante todo este estudio de investigación en forma de datos anonimizados (codificados) para los fines de la investigación.
- 10) Accedo a permitir a los expertos responsables asignados por el investigador principal del estudio, a las autoridades y al comité ético que examinen mis datos

(codificados) con fines de comprobación y de control.

- 11) He comprendido que todos los procedimientos para garantizar mi confidencialidad cumplen la legislación, la normativa y los reglamentos internacionales y nacionales.
- 12) Con mi firma confirmo que mi participación en este estudio de investigación es totalmente voluntaria. Puedo retirar mi consentimiento para participar en este estudio de investigación en cualquier momento, sin expresar la razón de tal decisión.

.....

Firma y aclaración

DNI:

.....

Firma del Investigador

Datos de contacto del investigador responsable:

Dr. Gabriel Vinderola
Instituto de Lactología Industrial (CONICET-UNL)
Facultad de Ingeniería Química
Universidad Nacional del Litoral
Santiago del Estero 2829, Santa Fe