

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Proyecto Final de Graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos
para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos

**“Efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre parámetros de inocuidad, calidad y
control de proceso en la elaboración de yogurt griego”**

Daniela Kopper Valerio

Carné A83350

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

Abril, 2019

TRIBUNAL EXAMINADOR

Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.

Elaborado por:

Daniela Kopper Valerio

Aprobado por:



Ph. D. Natalia Barboza Vargas

Presidente del Tribunal



Ph.D. Eric Wong González

Director del Proyecto



Ph.D. Marianela Cortés Muñoz

Asesora del Proyecto



Licda. Diana Víquez Barrantes

Asesora del Proyecto



Ph. D. Jessie Usaga Barrientos

Profesor designado

DEDICATORIA

A Dios, por su infinito amor y chineos para mí. Toda la Gloria para Él.

A mi [†] papá, por dejarme cumplir un sueño sin importar lo que costara.

A Sara, porque con amor tuvo que aguantar a su mamá en la U.

Y a mí, por la tenacidad para llegar aquí. Y querer más.

AGRADECIMIENTOS

A Dios. Por permitirme ser instrumento de su amor aquí en la Tierra. Por los favores concedidos, por hacerme caminar con fe (casi) inquebrantable y cuando me faltaban fuerzas, llevarme en brazos como niña consentida. Sin Él no soy nada y sin su misericordia y gracia hoy no sería tan feliz.

Gracias por siempre a [†]papi y a mami. Porque a pesar de mis errores y malas decisiones, me dieron amor y todos los recursos necesarios (y más) para estudiar tranquila y ser quien yo quería. Que desde el cielo mi *Gato Flaco* se regocije de ver lo que alcancé, gracias a él. ¡Te amo pa ♥!

Un emotivo gracias a la más sacrificada, mi Sarita. Por sus nobles “*sí mami, yo comprendo*”. Por no renegar de su mamá universitaria y más bien reírse de mí y conmigo. Mi muñeca, mi motor.

A Guillermo y a Edwin, porque siempre sentí que estaban orgullosos de su hermana y eso me daba seguridad; mis alcahuetes lindos, gracias por su cariño.

A Keka, Fayi y Lulú, por querer tanto a Sara y ser mamás postizas cuando yo no podía estar con ella. También a todas mis tías, por sus brazos amorosos para mí y mi muñeca a lo largo del camino.

A mi novio amado y valiente, mi Fabián Romero. Por creer en mí como nadie lo había hecho. Por tanto amor, jalones de orejas y motivaciones constantes. Mi despertador y *post-it* personal, compañero de pruebas y trasnochadas, mi bastón y pañuelo, a pesar de las dificultades que la vida nos puso y logramos juntos superar. ¡Qué va a hacer un cáncer contra el amor...! ♥

A Pame y a Cris, que atendieron siempre mis llamados. Por las risas, los chocolates y cafés. Gracias por estar pendientes de mí y enseñarme lo bonito que es tener amigas (hermanas) de verdad.

Gracias infinitas a doña Cristina Astúa, el ángel que Dios puso en mi camino en la figura de mi jefe.

Al personal de laboratorios del CITA y la escuela de TA, a don Juan Carlos, Camacho y Alonso por la paciencia para preparar los equipos. A Ara y Eu por ayudarme en las últimas tareas cuando la vida no me dejó encargarme yo. A doña Elba por sus lindas palabras de apoyo y a su hermano don Francisco por facilitarme muy amable la leche. Gracias también a don Jorge Salazar (LANAMME) y a doña Marielos Mora (CIBCM) por dejarme hacer uso de los equipos para enriquecer la investigación.

Y por supuesto un especial y profundo agradecimiento al comité de lujo que hizo posible este proyecto: a mi director, el profesor Eric Wong, por haberme confiado la investigación, porque a pesar de que me costó mucho arrancar (y ni qué decir de terminar) siempre tuvo la más amable y santa paciencia y comprensión. A mis asesoras, las profesoras Marianela Cortés y Diana Viquez, ¡mil gracias! Por tanta paciencia, disposición y guía durante el trabajo. A los tres, gracias por compartir su invaluable conocimiento conmigo e inspirarme a actuar como la profesional que quiero ser.

Porque sin ustedes no lo hubiera logrado.

A todos, ¡muchas gracias!

ÍNDICE GENERAL

TRIBUNAL EXAMINADOR.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE CUADROS	xii
ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	xiv
1. JUSTIFICACIÓN	15
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo General	22
2.2. Objetivos Específicos	22
3. MARCO TEÓRICO.....	23
3.1. La leche	23
3.1.1. Definición	23
3.1.2. Composición	23
3.1.3. Las proteínas de la leche	23
3.1.4. Aprovechamiento y consumo de la leche y los lácteos	24
3.2. Aseguramiento de la inocuidad de la leche y los productos lácteos	24
3.2.1. Vulnerabilidad de la leche y los lácteos	24
3.2.2. Patógenos asociados con la leche y los lácteos	25
3.2.3. Leche cruda como fuente potencial de brotes y enfermedades	25
3.2.4. <i>Escherichia coli</i> como parámetro de inocuidad.....	26
3.2.5. Tratamientos térmicos para el aseguramiento de la inocuidad de la leche y los lácteos.....	27
3.3. Productos lácteos fermentados: el yogurt.....	28
3.3.1. Historia del yogurt	28
3.3.2. Definición de yogurt.....	29
3.3.3. Clasificación y tipos de yogurt	30
3.4. Etapas principales en el proceso de elaboración de yogurt	31

3.4.2.	Efecto del tratamiento térmico sobre las proteínas del yogurt	35
3.4.3.	Formación del gel.....	36
3.4.4.	Tendencias de consumo: el yogurt griego (<i>Greek Yogurt</i>)	37
3.5.	Nuevas tecnologías para el tratamiento de lácteos	39
3.5.1.	Demandas del consumidor.....	39
3.5.2.	Necesidad de innovación	39
3.6.	Ultrasonido en la industria de alimentos.....	40
3.6.1.	Definición de ultrasonido	40
3.6.2.	Principio de acción	41
3.6.3.	Aplicación del ultrasonido.....	42
3.6.4.	Combinación de ultrasonido con otras técnicas.....	43
3.6.5.	Mecanismo de la inactivación microbiana	44
3.6.6.	Necesidad de investigación de ultrasonido en lácteos	45
3.7.	Parámetros de control para la elaboración de yogurt.....	47
3.7.1.	Mediciones fisicoquímicas.....	47
3.7.2.	Pruebas sensoriales como parámetro de calidad	50
3.7.3.	Distribución de tamaño de partícula de los glóbulos de grasa.....	53
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	56
4.1.	Localización del proyecto.....	56
4.2.	Materia prima.....	56
4.2.1.	Leche	56
4.2.2.	Ingredientes.....	56
4.3.	Manejo del inóculo de <i>Escherichia coli</i>	57
4.3.1.	Preparación del inóculo	57
4.3.2.	Inoculación de la muestra de leche cruda.....	58
4.4.	Sonicación de la muestra	59
4.4.1.	Proceso de sonicación.....	59
4.4.2.	Equipo	59
4.5.	Elaboración de yogurt griego	60
4.5.1.	Formulación.....	60
4.5.2.	Diagrama de flujo de proceso.....	61

4.5.3.	Descripción de las etapas	62
4.6.	Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre la reducción de <i>Escherichia coli</i> en la elaboración de yogurt griego.....	63
4.6.1.	Diseño Experimental	63
4.6.2.	Procedimiento	64
4.6.3.	Análisis estadístico	64
4.7.	Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre la textura del yogurt griego	64
4.7.1.	Diseño experimental	64
4.7.2.	Procedimiento	64
4.7.3.	Análisis estadístico	65
4.8.	Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre el índice de sinéresis del yogurt griego.....	66
4.8.1.	Diseño experimental	66
4.8.2.	Procedimiento	66
4.8.3.	Análisis estadístico	66
4.9.	Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre la capacidad de retención de agua del yogurt griego.....	66
4.9.1.	Diseño experimental	66
4.9.2.	Procedimiento	67
4.9.3.	Análisis estadístico	67
4.10.	Determinación del efecto del tiempo de sonicación de la leche cruda sobre el color del yogurt griego y el suero exudado	67
4.10.1.	Diseño experimental	67
4.10.2.	Procedimiento	67
4.10.3.	Análisis estadístico	68
4.11.	Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre el rendimiento de elaboración de yogurt griego.....	68
4.11.1.	Diseño experimental	68
4.11.2.	Procedimiento	68
4.11.3.	Análisis estadístico	69
4.12.	Determinación del efecto del tiempo de sonicación sobre el tiempo de fermentación del yogurt griego.....	69

4.12.1.	Determinación preliminar del tiempo requerido para la acidificación en la elaboración de yogurt griego a partir de leche cruda sonicada	69
4.12.2.	Diseño experimental	70
4.12.3.	Procedimiento	70
4.12.4.	Análisis estadístico	71
4.13.	Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche sobre el agrado general del consumidor hacia el yogurt griego.....	71
4.13.1.	Diseño experimental	71
4.13.2.	Procedimiento	72
4.13.3.	Análisis estadístico	72
4.14.	Observación del efecto del tiempo de sonicación sobre la distribución del tamaño de partícula de los glóbulos de grasa de la leche y el yogurt griego	73
4.14.1.	Diseño experimental	73
4.14.2.	Procedimiento	73
4.14.3.	Análisis de datos	74
4.15.	Métodos de análisis	74
4.15.1.	Recuento de <i>Escherichia coli</i>	74
4.15.2.	Medición de textura.....	75
4.15.3.	Índice de sinéresis.....	76
4.15.4.	Capacidad de retención de agua	77
4.15.5.	Medición de pH.....	77
4.15.6.	Agrado general del consumidor.....	77
4.15.7.	Distribución del tamaño de partícula de los glóbulos de grasa.....	78
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	80
5.1.	Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre la reducción de <i>Escherichia coli</i> en la elaboración de yogurt griego.....	80
5.2.	Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre la textura del yogurt griego	85
5.3.	Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre el rendimiento de elaboración de yogurt griego, su capacidad de retención de agua y el índice de sinéresis....	90
5.4.	Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre el color del yogurt griego	99

5.5.	Determinación del efecto del tiempo de sonicación sobre el tiempo de fermentación del yogurt griego	102
5.6.	Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche sobre el agrado general del consumidor.....	105
5.7.	Exploración del efecto del tiempo de sonicación sobre distribución del tamaño de partícula de los glóbulos de grasa del yogurt griego	111
5.7.1.	Distribución del tamaño de partícula.....	112
5.7.2.	Microscopía óptica.....	115
6.	CONCLUSIONES.....	118
7.	RECOMENDACIONES.....	119
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo para el proceso de manufactura de yogurt batido y yogurt aplanado (Adaptado de Lee & Lucey, 2010).	33
Figura 2. Ilustración del fenómeno de cavitación ultrasónica (tomado de Tiwari & Mason, 2012). 42	
Figura 3. Ejemplo de una escala hedónica de nueve puntos (tomado de Azofeifa, 2016).	51
Figura 4. Ejemplo de un árbol jerárquico con niveles o dendograma (tomado de Gan, 2011).	52
Figura 5. Diagrama de fenómeno de dispersión de luz utilizado por el equipo Horiba LA-300 para realizar la medición de la distribución del tamaño de partícula (adaptado de Horiba (2012)).	55
Figura 6. Diagrama del sistema continuo de sonicación (Wong, 2008).	60
Figura 7. Diagrama de flujo para la elaboración de yogurt griego con leche sonicada.	61
Figura 8. Reducción logarítmica promedio de <i>E. coli</i> en yogurt griego en función del tiempo de sonicación de la leche empleada para su elaboración.	80
Figura 9. Medida promedio de firmeza y cohesividad asociados con la textura del yogurt griego en función del tiempo de sonicación de la leche empleada para su elaboración.	86
Figura 10. Medida promedio de consistencia e índice de viscosidad asociados con la textura del yogurt griego en función del tiempo de sonicación de la leche empleada para su elaboración.	87
Figura 11. Promedio de dos parámetros asociados con la textura: a) Consistencia y b) Firmeza para yogurt griego pasteurizado, no pasteurizado y con leche sonicada para su elaboración.	90
Figura 12. Porcentaje del rendimiento promedio del proceso de elaboración de yogurt griego en función del tiempo de sonicación de la leche cruda usado como materia prima.	91
Figura 13. Promedio de la capacidad de retención de agua del yogurt griego en función del tiempo de sonicación de la leche usada para su elaboración.	93
Figura 14. Fotografías de la capa de grasa observada durante la elaboración de yogurt griego según el tiempo de sonicación: a) 0 min, b) 15 min, c) 30 min, d) 45 min, e) 60 min.	94
Figura 15. Promedio del porcentaje de sinéresis en yogurt griego en función del tiempo de sonicación de la leche usada para su elaboración.	95
Figura 16. Fotografía que ejemplifica la sinéresis observada en una muestra de yogurt griego elaborado con leche tratada térmicamente.	96
Figura 17. Promedio del porcentaje de a) Capacidad de retención de agua y b) Sinéresis para yogurt griego pasteurizado, no pasteurizado y con leche sonicada para su elaboración.	97
Figura 18. Promedio del cambio de los parámetros de color a) L^* , b) a^* , c) b^* y d) ΔE del yogurt griego y el suero exudado en función del tiempo de sonicación de la leche.	99
Figura 19. Suero recolectado durante el desuerado en la elaboración de yogurt griego según el tiempo de sonicación de la leche.	101
Figura 20. Promedio del tiempo de fermentación de yogurt griego en función del tiempo de sonicación de la leche usada como materia prima.	102
Figura 21. Curvas de acidificación en la elaboración de yogurt griego con leche a distintos tiempos de sonicación como materia prima.	103
Figura 22. Dendograma (<i>Joining Tree Clustering</i>) generado a partir de la prueba de agrado general con n=100 consumidores de yogurt griego.	106
Figura 23. Conformación de los grupos respecto al género de los participantes.	107

Figura 24. Conformación de los grupos respecto a la edad de los participantes.....	108
Figura 25. Conformación de los grupos respecto a la frecuencia de consumo de yogurt griego de los participantes.....	109
Figura 26. Agrado promedio de las muestras de yogurt griego elaborado con leche a distintos tiempos de sonicación para cada uno de los grupos del análisis de agrupamiento.....	109
Figura 27. Distribución del tamaño de partícula de los glóbulos de grasa de leche cruda entera de vaca con diferentes tiempos de sonicación.	112
Figura 28. Distribución del tamaño de partícula de los glóbulos de grasa de leche cruda entera de vaca y leche con homogenización comercial.	114
Figura 29. Distribución del tamaño de partícula de muestras de yogurt griego elaborado con leche a distintos tiempos de sonicación.....	114
Figura 30. Micrografías obtenidas por microscopía óptica a 100x para cinco muestras de leche entera tratada a diferentes tiempos de sonicación: a) 0 min, b) 15 min, c) 30 min, d) 45 min, e) 60 min.	116
Figura 31. Micrografías obtenidas por microscopía óptica a 100x para cinco muestras de yogurt griego elaborado con leche entera con distintos tiempos de sonicación: a) 0 min, b) 15 min, c) 30 min, d) 45 min, e) 60 min.	117

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Combinación de tiempo y temperatura para la pasteurización de la leche.	28
Cuadro 2. Composición nutricional promedio de diferentes variedades de yogurt (por 100 g).	38
Cuadro 3. Aplicaciones y beneficios del ultrasonido de alta intensidad en la industria láctea.	46
Cuadro 4. Características de los aditivos utilizados en la elaboración de yogurt griego.	57
Cuadro 5. Información técnica de los equipos del sistema de sonicación.	59
Cuadro 6. Formulación utilizada para la elaboración de yogurt griego.	60
Cuadro 7. Parámetros de ajuste utilizados en el texturómetro TA.XT Plus para la medición de textura de yogurt griego.	65
Cuadro 8. Descripción del objetivo, variables de estudio y resultados de la prueba preliminar.	70
Cuadro 9. Parámetros de ajuste utilizados en el equipo de dispersión láser Horiba LA-300 para la exploración de la distribución del tamaño de partícula de los glóbulos de grasa en leche y yogurt griego.	79
Cuadro 10. Reducción logarítmica promedio de <i>E. coli</i> en yogurt griego en función del tiempo de sonicación de la leche cruda usada para su elaboración.	81

ABREVIATURAS

ANDEVA	Análisis de varianza
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
CIBCM	Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular
CITA	Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos
CRA	Capacidad de retención de agua
ETA	Escuela de Tecnología de Alimentos
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)
g	Gramos
K	Grados Kelvin
kcal	Kilocalorías
kg	Kilogramos
kHz	Kilohertz
LANAMME	Laboratorio Nacional de Materiales y Métodos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MPa	Mega Pascales
NMP	Número más probable
ppm	Partes por millón
pps	Partes por segundo
rpm	Revoluciones por minuto
RTCA	Reglamento Técnico Centroamericano
UFC	Unidades formadoras de colonia
UHT	Ultra High Temperature (Ultra Alta Temperatura)
US	Ultrasonido / Sonicación
USDA	United States Department of Agriculture (Departamento de Agricultura de EEUU)
TPA	Texture Profile Analysis
W	Watts
x g	Gravedades en centrífuga
µm	Micrómetros

RESUMEN

La investigación procura dar continuidad a los hallazgos de Lara (2015) sobre el efecto del tiempo de ultrasonido (US) en el procesamiento de lácteos evaluando inocuidad, características sensoriales y de calidad del yogurt griego con el objetivo de valorar su potencial para obtener una materia prima de mayor calidad nutricional y atractivo valor agregado. Se evaluaron cinco tiempos de US (0, 15, 30, 45 y 60 min) a un flujo de 2,25 mL/s, $f=20$ kHz, $E=50$ W y $A=40\%$.

Se estudió el efecto del US antes de la adición del cultivo iniciador para evaluar si conducía a una reducción de la carga de *Escherichia coli*. Conforme aumenta el tiempo de sonicación, la reducción logarítmica de *E. coli* aumentó ($p = 0,0015$). La mayor reducción promedio fue de $0,4 \log_{10}$ UFC/g, por lo que se presume que si el US no logró una reducción relevante para un microorganismo indicador, tampoco lo conseguirá para uno de referencia a condiciones factibles para la industria.

Se han reportado efectos del US sobre las proteínas y la formación del gel debido a cambios estructurales con la cavitación. Se determinó que el tiempo de US no tuvo efecto significativo sobre el rendimiento de elaboración de yogurt griego ($1-\beta=0,87$) ni los tiempos de fermentación ($1-\beta=0,1143$). Se cree que la cavitación no fue suficiente para formar la capa de caseínas y proteínas séricas sobre la grasa, lo que pudo provocar que se observara un aumento del suero exudado con una disminución de la turbidez. Se observó diferencia significativa ($p=0,0357$) en el cambio de color del suero. No se encontró efecto significativo sobre el porcentaje de la capacidad de retención de agua (%CRA) del yogurt ($1-\beta=0,1778$) ni el porcentaje de sinéresis ($1-\beta=0,2175$).

Los atributos sensoriales tienen gran influencia en la aceptación del consumidor, quien prefiere los yogures de textura firme y densa. Se realizó un panel de agrado general con 100 consumidores en el que se logró determinar con 95% de confianza que sí hubo efecto significativo del tiempo de US sobre el agrado general del yogurt griego ($p<0,0001$) en donde conforme aumenta el tiempo de US, disminuye el agrado, a pesar de no encontrar diferencia significativa en la textura para firmeza ($1-\beta=0,8203$), cohesividad ($1-\beta=0,7807$), consistencia ($1-\beta=0,4536$) y viscosidad ($1-\beta=0,3088$). El tiempo máximo de US para obtener un producto aceptado por el consumidor fue de 15 minutos. Se recalca la importancia de la pasteurización térmica para lograr características importantes de calidad en la formación del gel y no solamente por inocuidad.

Utilizando un equipo de difracción láser fue posible explorar la distribución del tamaño de los glóbulos de grasa. Conforme aumenta el tiempo de US se observó una mayor fragmentación y frecuencia, pasando de $3 \mu\text{m}$ a $0,2 \mu\text{m}$ de diámetro, observándose un desplazamiento de las curvas hacia la izquierda. Se tomaron micrografías de las muestras como respaldo gráfico de dicho efecto.

Se concluye que el US por sí solo no genera a la industria un yogurt con los requisitos de calidad característicos del producto y que satisfaga las necesidades del consumidor. Se debe desarrollar más pruebas usando US como ayudante de proceso, como en la termosonicación, para evaluar si se consiguen los efectos de interés industrial para inocuidad, calidad y control de proceso.

1. JUSTIFICACIÓN

La leche es una peculiar emulsión de grasa, proteínas, carbohidratos y sales minerales en agua, que produce una sensación suave en la boca, con un especial sabor entre dulce y salado. Es uno de los alimentos más antiguos utilizados por el hombre, cuando en el período mesolítico hace cinco mil años, descubrió el ordeño al dedicarse al cultivo agrícola y la cría de ganado, constituyendo entonces una parte importante en su dieta habitual. Así, a lo largo de la historia, la recolección y transformación de la leche ha ido adaptándose a la demanda de alimentos cada vez más saludables (Aranceta & Serra, 2004).

No es fácil encontrar materias primas de las que se obtengan tantos y tan diferentes productos como lo permite la leche. En Costa Rica, la producción lechera ha crecido en un 242,3% desde 1989 hasta 2013, con un crecimiento anual promedio del 7% (Madriz, 2013), lo que implica un aumento en el consumo de productos lácteos, el cual hacia el 2016 alcanzaba los 217 kg per cápita anuales (Cámara Nacional de Productores de Leche, 2017). Los productos lácteos en el país representan 5,7% del aporte calórico de la canasta básica (Muñoz & Zamora, 2013), teniéndose que 62% de la leche producida se comercializa como leche fluida, mientras que 18% se destina para elaboración de quesos, 8% para leches en polvo, 4% para helados, 3% en cremas ácidas y otro 3% para productos como mantequilla y yogurt (González, 2012).

Debido a su calidad nutricional, la leche es un medio idóneo para el crecimiento de microorganismos de deterioro y patógenos. Las bacterias que la contaminan pueden multiplicarse rápidamente y hacerla no apta para la elaboración de productos ni para el consumo humano, por lo que la industria ha prestado especial atención a su calidad microbiológica, tanto por inocuidad como por calidad de sus derivados (Walstra *et al.*, 2006). Debido a que el consumo de leche cruda ha sido asociado con brotes causados por microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium tuberculosis*, entre otros (Walstra *et al.*, 2006), se han desarrollado métodos para garantizar la inocuidad de la leche y sus derivados, tales como la pasteurización, ultrapasteurización, microfiltración y ultra alta presión (Boor & Murphy, 2002; Pereda *et al.*, 2007). Los tratamientos térmicos son los más utilizados a nivel mundial (Walstra *et al.*, 2006).

La pasteurización es un tratamiento térmico cuyo objetivo principal es la destrucción de microorganismos patógenos presentes en la leche, principalmente *Mycobacterium tuberculosis* y

Coxiella burnettii. Este último es el patógeno esporulado más resistente al calor, por lo que el *Codex Alimentarius* sugiere diseñar sistemas de pasteurización que logren una reducción de al menos 5 logaritmos en leche entera (Anon, 2004).

El Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA, 2009) clasifica a la leche fluida y todos sus derivados como alimentos de riesgo tipo A, ya que por su naturaleza, composición, proceso, manipulación y población a la que va dirigida, podría tener una alta probabilidad de causar daño a la salud. Debido a que *E. coli* ha sido asociada con brotes por consumo de leche (Walstra *et al.*, 2006), este reglamento dicta un límite máximo permitido de <3 NMP/mL para este patógeno en leche y de <3 NMP/g en derivados lácteos, como el yogurt.

La bacteria *E. coli* es un bacilo Gram negativo que forma parte de la familia Enterobacteriaceae, en su mayoría cepas mesófilas con la capacidad de fermentar lactosa a 44 °C, diferenciándose así de otros microorganismos como *Shigella* sp y *Salmonella* sp (Papademas & Aspri, 2015). Ha sido ampliamente utilizada como microorganismo indicador, evidenciando la posibilidad de presencia de otros patógenos similares y de prácticas higiénicas deficientes, inclusive contaminación fecal (Busta *et al.*, 2013).

A pesar de la efectividad de los tratamientos térmicos en cuanto a inocuidad, se ha demostrado que éstos tienen efectos no deseados en la calidad sensorial y nutricional de la leche, lo que repercute directamente en la calidad de los productos (Walstra *et al.*, 2006; Shanmugam *et al.*, 2012). La esterilización convencional y la esterilización UHT de la leche cruda producen pérdidas de vitamina B1, B6, B12 y vitamina C (Shelly & Larriga, 2004), además de la desnaturalización de enzimas y modificación de proteínas, desbalance de minerales y cambios indeseables en el sabor y color producto de la reacción de Maillard (Walstra *et al.*, 2006).

Estas desventajas han provocado la búsqueda de nuevas tecnologías que permitan reemplazar a los tratamientos térmicos, como por ejemplo la aplicación de ultrasonido, campos eléctricos pulsados, microondas, luz ultravioleta y altas presiones (Shanmugam *et al.*, 2012; Chemat *et al.*, 2011; Bermúdez *et al.*, 2009). La utilización de ultrasonido en los procesos alimentarios ha sido objeto de estudios recientes ya que es amigable con el ambiente y no es tóxico, colocándolo en ventaja frente a otros tratamientos como el calentamiento óhmico, rayos gamma y pulsaciones eléctricas, los cuales han ganado cierto rechazo por los consumidores (Shanmugam *et al.*, 2012) por temor a sus efectos sobre la salud.

El ultrasonido es una de las tecnologías emergentes desarrolladas para minimizar el procesamiento, maximizar la calidad y asegurar la inocuidad de los alimentos (Awad *et al.*, 2012). El ultrasonido se refiere a las ondas sonoras más allá del rango de frecuencias audibles, por lo general superiores a los 20 kHz. Al pasar a través de un medio líquido, la interacción entre las ondas ultrasónicas, el líquido y el gas disuelto, conduce a un fenómeno de excitación conocido como cavitación acústica, el cual consiste en la oscilación de los núcleos de gases disueltos bajo la influencia del campo acústico debido a los cambios de presión alrededor de ellos. Cuando alcanzan el tamaño máximo dentro del ciclo acústico, colapsan violentamente generando una elevación de la temperatura entre 2.000 y 10.000 K. La cavitación acústica además genera fuerzas físicas violentas, incluyendo fuerzas de cizalla, ondas de choque y turbulencia (Chandrapala *et al.*, 2012).

Es sabido que las mediciones acústicas ofrecen características únicas para la caracterización de alimentos líquidos en su estado intacto, sin destrucción de la muestra. En sistemas alimentarios, la generación de variaciones controladas de la viscosidad por ultrasonido es uno de los procesos más promisorios que se ha desarrollado, ya que no requiere químicos ni aditivos, el proceso es simple y rápido, lo que significa que es rentable y no provoca grandes cambios en la estructura química. Los efectos físicos inducidos del ultrasonido tienen varias aplicaciones tales como la mejora de la ultrafiltración del suero, homogenización de glóbulos de grasa, cristalización de lactosa, manufactura de yogurts con propiedades reológicas superiores, reducción del tiempo de fermentación total del yogurt y corte de bloques de queso (Chandrapala *et al.*, 2012).

Algunas industrias procesadoras de lácteos han utilizado la homogenización por ultrasonido como paso clave para el procesamiento de leche, yogurt y helados ya que mejora la estabilidad frente a la formación de crema durante el almacenamiento. Se ha demostrado que la homogenización de leche por ultrasonido a 400 W y 24 kHz a 63 °C por 30 minutos causa la desintegración de la membrana de los glóbulos de grasa, reduciendo el diámetro del glóbulo a menos de 1 μm (las dimensiones de un glóbulo nativo son de 4,3 μm). Además, los incrementos en la amplitud y tiempo de sonicación producen influencia significativa en el grado de homogenización de la leche (Chandrapala *et al.*, 2012).

En la industria quesera, reportes indican que la aplicación de ultrasonido redujo los desechos, el consumo de energía y produjo quesos de textura más suave, además de mejorar la acción del *lactobacilli* cerca del 50% provocando un efecto dulce en yogurt sin aumentar el contenido

calórico (Wu *et al.*, 2001). Otros reportes indican que tratamientos de ultrasonido con alta amplitud (hasta de 450 W a 20 kHz) no sólo homogenizan efectivamente la leche, sino que también mejoran significativamente la viscosidad y la capacidad de retención de agua, reduciendo la sinéresis en yogurt. Estos efectos están directamente relacionados con la estructura del yogurt, la cual se basa en cadenas o grupos de micelas de caseína que interaccionan físicamente entre sí y con otras proteínas del suero desnaturalizadas. Además, el ultrasonido puede causar cambios cualitativos en la membrana de los glóbulos de grasa, modificando su capacidad para interaccionar entre ellos mismos y/o con las micelas de caseína, mejorando las propiedades de gelificación (Chandrapala *et al.*, 2012).

El ultrasonido no sólo resulta atractivo interés para la industria de alimentos por sus efectos positivos para el procesamiento, sino también más recientemente por sus efectos promisorios para la preservación. Elevar la temperatura debilita la membrana bacteriana, potenciando el efecto de la cavitación, conocido como pasteurización ultrasónica a 50 °C, la cual tiene además el potencial de preservar la calidad en términos de propiedades fisicoquímicas, color y sabor comparado a técnicas tradicionales de pasteurización a temperaturas mucho más elevadas (Patist & Bates, 2008).

En los últimos años, se ha observado un creciente interés en los productos lácteos fermentados debido a su valor nutricional y agradable sabor. De éstos, el yogurt es el más conocido alrededor del mundo, pues no sólo ofrece altos niveles de calcio, fósforo, magnesio, vitamina A y riboflavina, sino que también posee un alto contenido de cultivos lácticos vivos, los cuales traen múltiples beneficios a la salud (Wu *et al.*, 2001).

El yogurt griego es uno de los fermentados más antiguos originario del Medio Oriente y Asia. Se elabora con la técnica centenaria de colar la mezcla hasta crear un yogurt grueso y cremoso sin la necesidad de agregar gomas para dar cuerpo. Este método de colado hace el yogurt griego no sólo más denso, sino que también le provee dos veces más proteína, menor contenido de lactosa y menos carbohidratos que un yogurt convencional (Desai *et al.*, 2013). Así, es posible consumirlo tanto como *snack* saludable o como ingrediente de múltiples preparaciones, ya sea en salsas saladas, productos horneados y de repostería o como sustituto de cremas de alto contenido graso, como natilla, queso crema y mantequilla. Además, presenta un alto valor nutricional al ser fuente importante de calcio, vitamina D y tener un importante contenido natural de proteína de

excelente calidad. Por todas estas razones, el yogurt griego es una tendencia evidente en el mercado mundial (La República, 2013; American Culinary Federation, sf).

En Estados Unidos, el yogurt griego ocupa 50% del mercado del yogurt (Fox News, 2015) al mismo tiempo que las ventas minoristas crecieron considerablemente en los últimos dos años, con un porcentaje de crecimiento del 9,2% a diciembre del 2015 (Food Navigator, 2015). En América Latina, aunque no se cuenta con los datos concretos, la tendencia de consumo de yogurt griego va en notable crecimiento (La República, 2013). Sin embargo, los consumidores exigen al mercado nuevas maneras de disfrutar el nutritivo producto, por lo que la industria láctea debe responder con procesos tecnológicos innovadores para ofrecer productos de calidad.

Existen múltiples definiciones para el concepto de calidad, la mayoría están relacionadas con la percepción y expectativas del consumidor. Los conceptos más modernos se orientan a las necesidades del cliente (Monge, 2010). De acuerdo con la norma ISO 9001:2015, calidad es “el grado en que un conjunto de características inherentes cumple con los requisitos”. Algunas características que se esperan de un yogurt son su textura firme, brillante y cremosa, un deseable sabor fresco, limpio y ligeramente ácido con las notas características de acetaldehído, sin que haya una post-acidificación causada por la actividad continua de los cultivos iniciadores (MacBean, 2009).

Algunos factores pueden afectar las propiedades físicas del yogurt, tales como el tipo y número de interacciones de las proteínas, el tamaño y forma de la red de proteínas y la distribución de las proteínas de suero y caseínas en la red del gel. Todos ellos influenciados por aplicaciones técnicas como los tratamientos térmicos, temperatura de incubación, pH, tipo de cultivo iniciador, métodos de fabricación y tipo de leche (Özer & Kirmaci, 2009).

La textura es uno de los atributos de gran importancia que determinan la calidad de un yogurt y por lo general se mide en términos de viscosidad (Rojas, 2005). En los alimentos, las características de textura están asociadas con el comportamiento reológico de los mismos (Arce, 2011). Uno de los principales problemas que afecta la apariencia y textura del yogurt durante el almacenamiento es la sinéresis o desuerado. Uno de los parámetros tecnológicos más importantes que determina la estabilidad física de la red del gel en el yogurt es el contenido de sólidos totales, ya que si éste es insuficiente la textura será débil provocando la salida del suero (Özer, 2009). La post-

acidificación también puede generar problemas de sinéresis, por lo que es importante verificar el pH del producto (MacBean, 2009).

Las pruebas analíticas de medición de viscosidad y sinéresis proveen datos científicos acerca de la calidad de un yogurt. Sin embargo, los métodos instrumentales no reproducen de forma satisfactoria la sensación que experimenta el consumidor en la boca. Por esto es importante complementar las pruebas instrumentales con el análisis sensorial. Las pruebas de aceptación se utilizan cuando se pretende conocer el nivel de agrado de un producto, empleando escalas conocidas como hedónicas, que van desde “me disgusta muchísimo” hasta “me gusta muchísimo” (Sancho *et al.*, 1999).

Dada la importancia de los alimentos funcionales, o simplemente ricos en determinados nutrientes, no es descartable que en el futuro la leche cruda, naturalmente rica en nutrientes y micronutrientes, sea especialmente apreciada para la elaboración de determinados productos lácteos con características sensoriales por encima de las que en la actualidad se consideran como típicas (Shelly & Larriga, 2004).

Bajo ciertas condiciones, constituiría una ventaja el aplicar a la leche tratamientos que eliminen microorganismos patógenos y de deterioro. Por ello, se sugiere realizar investigaciones en esa dirección, con miras a determinar si es posible aplicar algún método que permita conservar la leche sin aplicar calor para su posterior utilización como materia prima. El ultrasonido se ha convertido recientemente en una herramienta eficiente para las aplicaciones comerciales. Sin embargo, como todas las metodologías innovadoras de procesamiento de alimentos, necesita ser desarrollada más ampliamente para ser escalada a cada aplicación.

El ultrasonido no sólo ha atraído considerable interés en la industria de alimentos debido a sus efectos positivos en el procesamiento, sino también a sus efectos promisorios en la preservación de alimentos que recientemente se le ha atribuido, ya que generalmente la mayoría de los microorganismos muestra gran sensibilidad a la sonicación a temperaturas cercanas a los 50 °C por debilitamiento de la membrana bacteriana, lo cual mejora el efecto de la cavitación producida durante el tratamiento de ultrasonido (Patist & Bates, 2008).

Pese a los estudios realizados, es necesario generar más evidencia sobre los efectos de la sonicación en productos lácteos. Por lo anterior, para el presente trabajo final de graduación se

propone determinar el efecto del tiempo de aplicación de ultrasonido a leche cruda sobre diferentes parámetros reológicos y sobre la calidad e inocuidad en la elaboración de yogurt griego, puesto que para mantener la tendencia al crecimiento del mercado del yogurt, es necesario buscar la innovación en la aplicación de técnicas de proceso, empaque y sabor.

Se ha encontrado que tratamientos con ultrasonido con alta amplitud han resultado con un buen efecto homogeneizador, comparado contra la homogenización convencional, mejorando el efecto conforme se aumenta el tiempo de exposición. Además, tratamientos de sonicación en yogurt después de la adición del cultivo iniciador, reducen el tiempo de fermentación en 0,5 horas con un aumento en la capacidad de retención de agua y viscosidad (Wu *et al.*, 2001). Otros autores (Patist & Bates, 2008) reportan aplicaciones del ultrasonido tanto para aumentar como para disminuir la viscosidad de ciertos productos y, dependiendo de la intensidad, dichos efectos pueden ser temporales o definitivos.

En esta investigación se evaluó el efecto de la sonicación de la leche antes de la adición del cultivo iniciador en la elaboración de yogurt griego para determinar si conduce a una potencial sustitución viable del tratamiento térmico, en conjunto con la evaluación de la calidad del yogurt griego resultante según los beneficios antes descritos.

Se ha seleccionado *Escherichia coli* como microorganismo indicador, pertinente en esta investigación para dar continuidad a los hallazgos de Lara (2015), ya que la cepa de *E. coli* ATCC 25922 ha sido utilizada anteriormente por otros autores como indicador de higiene en evaluaciones de resistencia microbiana, pues funciona mejor entre los Gram negativos (San Martín *et al.*, 2005), además de servir de referencia para modelar cinéticas de inactivación en diferentes tipos de sonicación (Lee *et al.*, 2009).

De lograrse una reducción importante del indicador *E. coli* y un producto final de características sensoriales y de calidad satisfactorias, se tendría una tecnología innovadora para el tratamiento previo de la leche con potencial para obtener una materia prima de mayor calidad nutricional libre de alteraciones que ofrezca al consumidor un yogurt griego con un interesante valor agregado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Determinar el efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre parámetros de inocuidad, calidad y de control de proceso en la elaboración de yogurt griego.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar el efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre la reducción de *Escherichia coli* en la elaboración de yogurt griego.
- Determinar el efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre las características de textura, color, sinéresis y capacidad de retención de agua de yogurt griego.
- Determinar el efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre el rendimiento de elaboración de yogurt griego y sobre el tiempo de fermentación mediante la elaboración de curvas de acidificación.
- Determinar el efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre el agrado general del yogurt griego elaborado respecto a una muestra de yogurt griego sin tratamiento de ultrasonido.
- Observar el efecto del tiempo de sonicación sobre la distribución del tamaño de partícula de los glóbulos de grasa de la leche cruda y sonicada así como del yogurt griego obtenido.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. La leche

3.1.1. Definición

La leche es el producto obtenido al ordeñar las glándulas mamarias de los mamíferos, cuya función primordial es nutrir a las crías recién nacidas (Belitz *et al.*, 2009; Chacón, 2004). Se define además como una emulsión que consiste en una fase dispersa de grasa y una fase acuosa continua. Puede ser considerada también como una suspensión coloidal de proteínas, en la que se encuentran disueltas la lactosa, vitaminas y minerales (Medeiros *et al.*, 2009).

3.1.2. Composición

La leche completa de consumo habitual está constituida por un elevado porcentaje de agua (87,1%) en la cual se encuentran disueltos lípidos (3,5%), proteínas y otras sustancias nitrogenadas (3,2%), carbohidratos (5,1%) y sales (0,9%) (Aranceta & Serra, 2004; Lu & Wang, 2017). La composición química de la leche determina en gran medida su alto valor nutricional y varía según la especie de la que provenga, comúnmente vaca, cabra, oveja (Lu & Wang, 2017).

La caseína es la principal y más abundante proteína de la leche. Ésta es de elevado valor biológico por su gran riqueza en aminoácidos, entre ellos los ocho esenciales y destaca la riqueza en ácido glutámico e hidroxiglutámico. La leche y sus derivados son la principal fuente de calcio que se puede incorporar a la dieta, además de su riqueza de sales minerales como potasio, magnesio, azufre, cobre, zinc y yodo. Igualmente, figura entre los alimentos que contienen la variedad más completa de vitaminas, como la A, D y aquellas del complejo B (Rosselló, 2011).

3.1.3. Las proteínas de la leche

Las proteínas de la leche pueden clasificarse en dos grupos: 1) caseínas, que representan el 82% del total de proteínas de la leche y 2) proteínas del suero. Las caseínas se subdividen en cinco grupos: α_{s1} , α_{s2} , β , γ y κ . Estas subunidades se unen por puentes de fosfato de calcio con otras subunidades formando agregados llamados micelas. Las proteínas del suero forman el 18% restante e incluyen β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, albúmina de suero, inmunoglobulinas y otras menores. Las proteínas de la leche son de alto valor nutricional para la salud humana, ya que

proveen los ocho aminoácidos esenciales, participando en la formación de tejido muscular y mejorando los niveles de insulina y acelerando el metabolismo de lípidos (Lu & Wang, 2017).

3.1.4. Aprovechamiento y consumo de la leche y los lácteos

La industria de la leche ha sufrido muchos cambios desde el siglo pasado. La adulteración y contaminación de la leche era desenfrenada antes de la aprobación y el cumplimiento de la Ley de Alimentos y Medicamentos Puros en 1906 en Estados Unidos. La introducción y certificación de la pasteurización de leche, ha proveído a los consumidores de un producto consistentemente seguro. La homogenización y avances en empaque y transporte fueron mejorando gradualmente el abastecimiento del valioso líquido. Otros avances incluyen la concentración de la leche, el aprovechamiento del suero, reducción de lactosa, la popularización del yogurt y sus beneficios, helados bajos en grasa y la diversificación del queso, tecnologías que han contribuido a aumentar la demanda de productos lácteos (Tunick, 2009).

Este producto es aprovechado para consumo humano, ya sea en su forma más simple o en una amplia gama de productos. Para el 2012 en Costa Rica se estimó un consumo *per cápita* anual de lácteos de 195 kg (equivalentes de leche fluida) por habitante, subiendo a 217 kg para el 2017. Dicho consumo estaría compuesto por 35% queso, 27,5% leche fluida, 19,1% natilla y yogurt y 12,7% leche en polvo (Solano, 2003; Vargas *et al.*, 2007; CNPL & SIECA, 2009; CNPL, 2017).

3.2. Aseguramiento de la inocuidad de la leche y los productos lácteos

3.2.1. Vulnerabilidad de la leche y los lácteos

La leche y los productos lácteos proveen condiciones únicas para el crecimiento de microorganismos debido a su composición bioquímica compleja y alto valor de actividad de agua (a_w). La calidad de la leche está determinada por aspectos de composición e higiene. Las bacterias predominantes varían ampliamente dependiendo del tipo de producto, método de procesamiento, temperatura de almacenamiento, pH, concentración de oxígeno, y la fuente de contaminación (Lu & Wang, 2017). Controlar efectivamente este crecimiento es todo un reto para la industria, ya que los microorganismos son adquiridos normalmente en los lugares de ordeño y recolección de la leche, produciendo tanto efectos indeseables en el producto como enfermedades transmitidas por alimentos. Las manos sucias del trabajador, mala calidad de la leche, condiciones antihigiénicas de la unidad de fabricación, calidad inferior de las materias

primas utilizadas y el agua suministrada para el lavado de los utensilios, son fuente potencial de la aceleración de la contaminación de productos lácteos (Soomro *et al.*, 2002).

3.2.2. Patógenos asociados con la leche y los lácteos

Se ha reportado la presencia de ciertos patógenos en leche cruda, entre ellos *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* y *L. innocua* (Rea *et al.*, 1992).

El concepto original de pasteurización se basó en la relación tiempo-temperatura para inactivar el microorganismo patógeno de la leche más termorresistente, *Mycobacterium tuberculosis*. Sin embargo, más de 30 años después, esta relación cambió por el descubrimiento de una nueva bacteria transmitida a humanos por ingestión de leche generando fiebre Q, *Coxiella burnetii* (Pelczar & Reid, 1972). Debido a que *C. burnetii* es el patógeno no esporulado más termorresistente mayormente presente en leche, la pasteurización comercial de la misma ha sido diseñada para alcanzar al menos una reducción de 5 logaritmos de *Coxiella burnetii* en leche entera (4% de grasa) (CODEX, 2004).

El ganado lechero es el reservorio primario de *Coxiella burnetii*, microorganismo causante de la fiebre Q. Desde los primeros reportes por investigadores australianos y americanos en 1935, la fiebre Q ha sido encontrada en todo el mundo, a excepción de Nueva Zelanda. El útero y las glándulas mamarias son los sitios principales de infección en la fase crónica, por lo que el esparcimiento de *C. burnetii* en leche por animales infectados ha sido ampliamente reportado (Maurin & Raoult, 1999; Guk Kim *et al.*, 2005).

3.2.3. Leche cruda como fuente potencial de brotes y enfermedades

Existe una tendencia actual inclinada hacia el consumo de alimentos crudos y artesanales. La manufactura de estos alimentos se base en métodos tradicionales, muchas veces sin tener en cuenta la calidad de la materia prima utilizada, y bajo tales condiciones muchos microorganismos pueden tener acceso a productos lácteos. *Escherichia coli* es un microorganismo frecuentemente contaminante y es un indicador confiable de contaminación fecal, generalmente por condiciones insalubres de agua, alimentos, leche y otros productos lácteos (Soomro *et al.*, 2002).

La leche cruda y los productos elaborados con ella pueden ser fuente importante de bacterias potencialmente dañinas para el ser humano, y a pesar de haberse reportado incluso muertes, su comercialización y consumo existen ampliamente en varios países (Ombarak *et al.*, 2016), incluido Costa Rica, en donde la leche cruda se consume especialmente en zonas rurales.

Martin *et al.* (1986) reportaron dos casos de Síndrome Urémico Hemolítico que proporciona evidencia de que la leche cruda puede ser un vehículo de transmisión de *E. coli* O157:H7; ambas personas afectadas consumieron leche cruda. Los aislados de *E. coli* en alimentos es indicativo de la posible presencia de microorganismos enteropatógenos y toxigénicos que representan riesgo para la salud pública. En 1971 se presentó un brote de intoxicación alimentaria en Estados Unidos en el que 387 personas se vieron infectadas por *E. coli* enteropatógena por consumo de queso francés importado (Marrier, 1973).

En la brucelosis humana, la transmisión ocurre por dos mecanismos: por contagio directo mediante contacto, inoculación, o inhalación, o por vía indirecta a través de la ingesta de productos lácteos contaminados, principalmente aquellos no pasteurizados. El agente más frecuente es *Brucella abortus*. A nivel mundial esta sigue siendo la infección más frecuente a pesar de la vacunación masiva. Las zonas de mayor prevalencia animal corresponden a la región del mediterráneo, Asia occidental y algunas partes de África y América Latina, principalmente México, Brasil y Colombia. La presencia de brucelosis podría asociarse con la procedencia de la leche cruda (Vergara *et al.*, 2006).

3.2.4. *Escherichia coli* como parámetro de inocuidad

Es posible que la leche y los productos lácteos puedan contaminarse con una variedad de microorganismos de diferentes fuentes. El Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA, 2009) en su título de Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de los Alimentos 67.04.50:08 establece como límite máximo permitido < 3 NMP/g de *Escherichia coli* en yogurt.

Escherichia coli es un habitante normal del intestino grueso en animales y humanos. La fuente principal de *E. coli* en leche cruda y productos lácteos es la contaminación fecal durante el proceso de ordeño junto con prácticas higiénicas deficientes, por lo que *E. coli* generalmente se utiliza como indicador confiable de contaminación fecal directa o indirecta, y la posible presencia de patógenos entéricos (Ombarak *et al.*, 2016; McConnel *et al.*, 2016).

El Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria de los Estados Unidos (USDA, 2011) estipula que para el procesamiento y producción de alimentos fermentados, se debe obtener una reducción bacteriana mínima de 5 log en la matriz alimentaria. Estas regulaciones han conducido a la necesidad de estudiar la inactivación de *E. coli* en productos fermentados (Holck *et al.*; 2011). Si algún producto lácteo fermentado presenta *E. coli* patógena con genes virulentos, se convierte en un producto potencialmente peligroso para los consumidores.

Algunas cepas de *E. coli* tienen la capacidad de producir la toxina Shiga o verotoxina, causante de graves enfermedades como colitis enterohemorrágica con diarrea sanguinolenta y deficiencia renal (Síndrome Urémico Hemolítico). La cepa de *E. coli* enterohemorrágica más comúnmente causante de estas enfermedades es el serotipo *E. coli* O157:H7, con la capacidad de causar incluso la muerte. Este serotipo ha sido responsable de varios brotes alimentarios involucrando carne, pollo, productos lácteos, jugos y cidras de manzana, vegetales, mayonesa y agua. Otros serotipos de *E. coli*, como O26, O111, O113, O121 y O145 también han sido reportados como responsables de enfermedades en humanos (Holck *et al.*, 2011; McConnel *et al.*, 2016).

3.2.5. Tratamientos térmicos para el aseguramiento de la inocuidad de la leche y los lácteos

Los tratamientos térmicos convencionales para la inocuidad de la leche incluyen la pasteurización baja, donde se aplica 63 °C durante 30 minutos, y la pasteurización alta a 72 °C por 20 segundos (Aranceta & Serra, 2004). Sin embargo, para la elaboración comercial de yogurt las combinaciones de tiempo y temperatura van desde los 85 °C por 30 minutos hasta 95 °C por 5 minutos (Weerathilake *et al.*, 2014). Las combinaciones de tiempo y temperatura alternativas se resumen en el Cuadro 1.

A pesar del tipo de pasteurización empleada, es imprescindible cumplir con el requisito mínimo de destruir el patógeno de la leche actualmente reconocido como más resistente al calor, *Coxiella burnetii*, causante de la fiebre Q en humanos (Weerathilake *et al.*, 2014). Para ello, el Codex Alimentarius (2004) establece, de acuerdo con validaciones realizadas en leche entera, que las condiciones mínimas de pasteurización son aquellas que tienen efectos bactericidas equivalentes al calentamiento de cada partícula de leche a 72 °C por 15 segundos o 63 °C por 30 minutos.

Cuadro 1. Combinación de tiempo y temperatura para la pasteurización de la leche.

Tipo de pasteurización	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo de retención
Baja Temperatura Largo Tiempo (LTLT)	Batch	62,8	30 minutos
Alta Temperatura Corto Tiempo (HTST)	Continuo	71,7	15 segundos
Temperatura más alta Tiempo más corto (HHST)	Continuo	88,3	1 segundo
Ultra Pasteurización	Continuo	137,8	2 segundos
Ultra Alta Temperatura (UHT)	Aséptico	135 – 150	4-15 segundos

Fuente: Food and Drug Administration, 2011.

A pesar de la efectividad de los tratamientos térmicos en cuanto a inocuidad, se ha demostrado que éstos provocan efectos negativos en la calidad sensorial y nutricional de la leche, lo que repercute directamente en la calidad de los productos (Walstra *et al.*, 2006; Shanmugam *et al.*, 2012). La esterilización UHT de la leche nativa produce pérdidas de vitamina B1 del orden del 10% y del 40% durante la esterilización convencional, la cual a su vez produce una reducción del 50% de vitamina B6. La esterilización UHT y la convencional determinan pérdidas del 10 y 90% respectivamente de vitamina B12. Respecto a la vitamina C, la pasteurización y UHT provocan pérdidas del orden de 10-25%, mientras que la convencional puede reducir hasta el 50% (Shelly & Larriga, 2004), además de la desnaturalización de enzimas y modificación de proteínas, desbalance de minerales y cambios indeseables en el sabor y color producto de la reacción de Maillard (Walstra *et al.*, 2006).

3.3. Productos lácteos fermentados: el yogurt

3.3.1. Historia del yogurt

La fermentación de la leche es uno de los métodos más antiguos practicados por el ser humano para conservarla y extender su vida útil. El origen del yogurt data desde cuando los pobladores neolíticos en Asia Central pasaron de ser cazadores y recolectores a productores de alimentos, iniciando las prácticas de ordeño. Se dice que los productos fermentados, incluyendo el yogurt,

fueron descubiertos por accidente cuando solían almacenar la leche en sacos de piel de oveja (Weerathilake *et al.*, 2014; Fisberg & Machado, 2015.).

El yogurt fue toda una curiosidad en Estados Unidos cuando en 1900, Ilya Metchnikoff aisló cultivos para su manufactura. En 1920, Isaac Carosso perfeccionó e industrializó el proceso fundando la primera compañía, Danone. El producto ganó popularidad cuando se le añadió fruta a inicios de los años 50 (Tunick, 2009). Las ventas anuales aumentan el 20%, ya que es uno de los lácteos fermentados más populares con amplia aceptación a nivel mundial gracias a sus beneficios nutricionales debido a las bacterias vivas que contiene (Salvador *et al.*, 2005; Weerathilake *et al.*, 2014; Fisberg & Machado, 2015).

3.3.2. Definición de yogurt

De acuerdo con el Código de Regulaciones Federales de FDA (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés), el yogurt se define como “el alimento producido mediante la inoculación de uno o más de los ingredientes lácteos opcionales (crema, leche, leche parcialmente descremada y leche descremada) con un cultivo bacteriano característico que contiene bacterias productoras de ácido láctico, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.” La misma entidad establece además que “el yogurt, antes de la adición de sabores voluminosos, contiene no menos de 3,25% de grasa de la leche y no menos de 8,25% de sólidos no grasos de leche, con una acidez titulable no inferior a 0,9% expresada como ácido láctico. Puede ser tratado térmicamente después de la fermentación para destruir microorganismos viables y aumentar la vida útil del producto.” (FDA, 1996).

Se han propuesto además ciertos requisitos estándar para el yogurt: (i) un nivel mínimo de 10^7 unidades formadoras de colonias activas por gramo, (ii) pH de 4,6 o inferior, (iii) un nivel mínimo de 51% de ingredientes lácteos totales, (iv) homogenizado y pasteurizado antes de la inoculación, (v) permite el uso de leche reconstituida y concentrados de proteína de suero como “ingredientes lácteos estándar” (vi) permite el uso de cualquier ingrediente derivado de leche como ingrediente lácteo opcional, (vii) permite el uso de endulzantes, emulsificantes y preservantes seguros y adecuados, y (viii) permite el uso opcional de cualquier ingrediente seguro y adecuado añadido con propósito nutricional o funcional (Lucey, 2002).

3.3.3. Clasificación y tipos de yogurt

Weerathilake *et al.* (2014) clasifican el yogurt en diferentes categorías según el tipo de cultivo, la composición química y naturaleza física, además del sabor y características según su origen.

3.3.3.1. Tipo de cultivo

- a) Cultivo estándar: Aquellos elaborados con *L. bulgaricus* y *S. termophilus*. Se dice que estas bacterias no habitan en el intestino, sin embargo, son capaces de estimular la microflora ya presente en él, ayudando a mantener una buena salud gastrointestinal (Dowden, 2013; Weerathilake *et al.*, 2014).
- b) Cultivos probióticos: Son elaborados por inoculación de cultivos típicamente de las cepas probióticas de Bifidobacteria y *L. acidophilus*. Estas bacterias declaran más beneficios específicos para la salud y representan la microbiota presente en el intestino. Sin embargo, las cepas probióticas deben permanecer vivas en números adecuados (10^7 UFC/g para refrigerados y 10^6 para congelados) para afirmar el efecto beneficioso (Dairy UK, 2009; National Yogurt Association, 2013; Weerathilake *et al.*, 2014).

3.3.3.2. Composición química

- a) Regular: Producido con leche entera con al menos 3,5% de grasa (USDA, 2001; FDA, 2013).
- b) Bajo en grasa: Producido con leche baja en grasa o leche parcialmente descremada (0,5 – 2% grasa).
- c) Descremado: Producido con leche descremada (<0,5% grasa) (Weerathilake *et al.*, 2014).

3.3.3.3. Naturaleza física

- a) Sólido: También llamado aflanado por su textura firme y gelatinosa. Es incubado y enfriado en el envase individual final.
- b) Semisólido: También llamado yogurt batido. Se produce incubando la mezcla en un tanque seguido por el rompimiento con agitación antes de enfriar y envasar. De textura cremosa.
- c) Fluido: Conocido como yogurt líquido o bebible. La agitación para romper el coágulo es más vigorosa (Weerathilake *et al.*, 2014).

3.3.3.4. Sabor

- a) Natural: El producto de la fermentación de la leche sin azúcar añadida, ni sabores o colores, con la textura y sabor característicos del yogurt puro.
- b) Con frutas: Se agregan frutas en compotas para dar valor agregado al yogurt. Puede ser mezclado en el producto o como complemento de un yogurt natural.
- c) Saborizado: Se puede agregar una amplia variedad de sabores al yogurt durante su producción no sólo para ampliar la oferta, sino también para aumentar la dulzura, ya sean frutales, cereales o de golosinas (Weerathilake *et al.*,2014).

3.3.3.5. Tipos de yogurt

- a) Yogurt griego: También conocido como estilo Mediterráneo. Elaborado por filtración del suero del yogurt natural para hacerlo más espeso y cremoso.
- b) Yogurt estilo balcánico: De textura espesa característica. Se prepara en lotes pequeños e individuales en los que se vierte la mezcla cultivada tibia a incubación sin agitación por 12 horas o más.
- c) Yogurt estilo europeo: También conocido como yogurt batido, con textura cremosa y suave elaborado por incubación en tinas con posterior enfriamiento y agitación. Con frecuencia se añaden frutas y sabores.
- d) Yogurt estilo francés: También conocido como yogurt aflanado, elaborado por incubación directa en recipientes individuales con obtención de un producto con textura tipo flan o *pudding* (Weerathilake *et al.*,2014).

3.4. Etapas principales en el proceso de elaboración de yogurt

La elaboración de yogurt es una técnica ancestral que data de miles de años atrás, sin embargo, durante las décadas anteriores su fabricación se volvió más racional gracias a las mejoras en los ámbitos de microbiología, bioquímica e ingeniería de alimentos, las cuales han combinado arte y ciencia.

El proceso general de elaboración de yogurt se resume en la modificación de la composición original de la leche, pasteurización de la mixtura, fermentación a temperaturas termofílicas (40-45 °C), enfriamiento y adición de sabores. El diagrama de proceso de la elaboración de diferentes tipos de yogurt se muestra en la Figura 1.

3.4.1.1. Materias primas

El yogurt se elabora con una variedad de materias primas que van desde la leche, estabilizantes, frutas, sabores y cultivos bacterianos. El tipo de leche dependerá de la variedad de yogurt que se desea elaborar, ya sea entera, descremada o parcialmente descremada. Se puede adicionar crema de leche para ajustar los contenidos de grasa, concentrado de proteína de suero para elevar el contenido de sólidos totales, estabilizantes son agregados comúnmente para ayudar al cuerpo y la textura del yogurt, orientados a aumentar la firmeza, prevenir la separación del suero o sinéresis además de su contribución a la homogeneidad de los ingredientes. Por último, se utilizan también azúcares o endulzantes para aumentar el sabor y agrado del consumidor.

3.4.1.2. Estandarización

De acuerdo con la Comisión del Codex Alimentarius (2010), el yogurt debe tener como mínimo 2,7% de proteína y máximo 15% de grasa. En respuesta, los estándares de FAO especifican que la leche debe estandarizarse a un mínimo de sólidos no grasos y grasa láctea de 8,2% y 3% respectivamente. La leche bovina, en promedio, se compone de 4,5% de lactosa, 3,3% de proteína, 3,5% de grasa y 0,7% materia mineral (Weerathilake *et al.*, 2014).

3.4.1.3. Homogenización

Típicamente la homogenización se realiza mediante el uso de un homogenizador donde la leche es forzada a través de pequeñas aberturas a una alta presión (de 10 a 20 MPa en la primera etapa y 5 Mpa en la segunda, por alrededor de 10 minutos) en la que los glóbulos de grasa se rompen debido a la fuerza de cizalla, con lo que se reduce el diámetro a menos de 1µm asegurando su distribución uniforme. En consecuencia, se logra eliminar la formación de una capa superficial cremosa, mejorando la consistencia del yogurt (Weerathilake *et al.*, 2014).

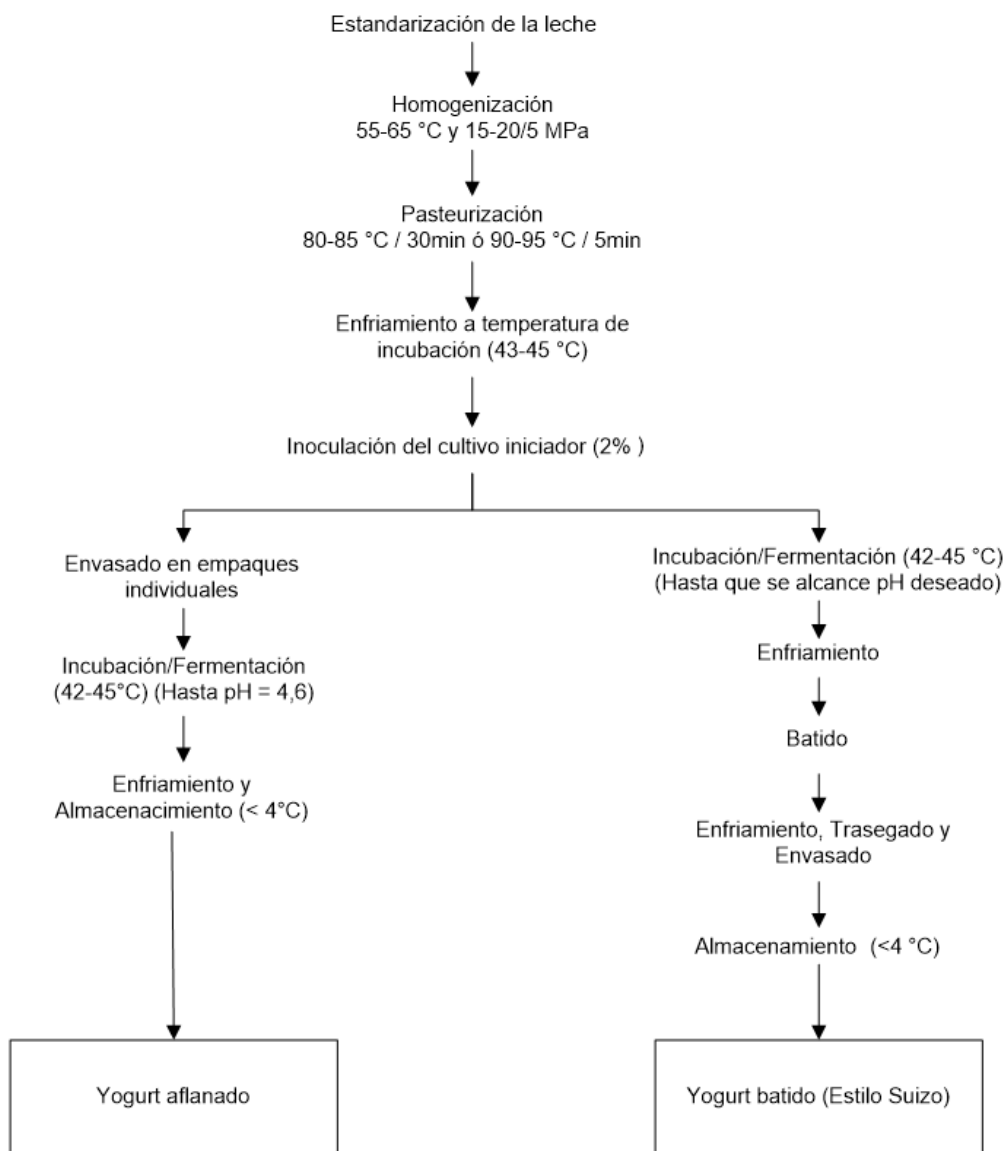


Figura 1. Diagrama de flujo para el proceso de manufactura de yogurt batido y yogurt aflanado (Adaptado de Lee & Lucey, 2010).

3.4.1.4. Tratamiento térmico

Se considera que el tratamiento térmico de la leche es un paso esencial en el proceso de manufactura del yogurt que influye en gran medida en la microestructura y las propiedades físicas del yogurt. Con el tratamiento térmico no sólo se destruyen los microorganismos que pueden interferir con la fermentación controlada, sino que contribuye al cuerpo y la textura final (Weerathilake *et al.*, 2014).

La mixtura de yogurt normalmente es calentada a temperaturas mayores y por más tiempo que una pasteurización normal. Los tratamientos empleados en la elaboración de yogurt comercial van de 85 °C por 30 minutos hasta 90-95 °C por 5 a 10 minutos, para ayudar a mejorar la consistencia del producto a través de la desnaturalización de la proteína del suero de leche (Tamine & Robinson, 1999). El tratamiento térmico además ayuda a algunos ingredientes a lograr el estado requerido para la formación del gel y enrejado proteico, necesario para la textura y viscosidad final (Weerathilake *et al.*, 2014).

3.4.1.5. Inoculación y fermentación

Después del tratamiento térmico, la mixtura se enfría hasta 43 °C para la adición del cultivo iniciador. Esta inoculación usualmente tiene lugar en recipientes de acero inoxidable higiénicos y sellados para el yogurt batido, mientras que para yogurt firme o aflanado la fermentación se da en recipientes individuales, tal como lo presenta el diagrama de flujo de la Figura A. La temperatura de incubación es monitoreada al nivel óptimo durante todo el proceso de fermentación, hasta que el pH alcance el valor deseado. Durante la fermentación, debido a la actividad metabólica de la bacterias ácido-lácticas, la lactosa se convierte en ácido láctico que coagula las proteínas de la leche junto con la producción de ciertos compuestos volátiles que le confieren al yogurt su aroma y sabor característicos (Weerathilake *et al.*, 2014).

Las especies de bacterias lácticas más utilizadas como cultivo iniciador en la industria del yogurt son *Streptococcus thermophilus* (homofermentativa, termófila) y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (homofermentativa, termófila) (Romero del Castillo & Lagarriga, 2004).

Los cultivos iniciadores pueden presentarse en forma líquida, congelada o liofilizada. Los líquidos son los menos utilizados debido a su delicada conservación, ya que pueden contaminarse fácilmente, contienen 10^9 UFC/mL. Los cultivos congelados son los más utilizados por la industria grande y mediana, contienen 10^{14} UFC/mL y se obtienen por bactocentrifugación de un cultivo suficientemente grande para aumentar su concentración, con la adición de crioprotectores para ser ultracongelados en nitrógeno líquido a -196 °C. Finalmente, los cultivos liofilizados son los más caros, pero también los de menor requerimiento para su conservación y menor riesgo de contaminación; éstos se comercializan en sobres con la dosis para una determinada cantidad de leche, conteniendo del orden de 10^{11} UFC/mL y preparados de la misma forma que los congelados

con una liofilización final. Pueden conservarse tanto congelados como en refrigeración de 2 a 5 °C (Romero del Castillo & Lagarriga, 2004).

Los microorganismos seleccionados para un cultivo iniciador, además de las propiedades deseadas en el producto a fabricar y de las inherentes a su crecimiento, deben ser capaces de resistir el proceso de elaboración para su distribución comercial (Romero del Castillo & Lagarriga, 2004).

3.4.1.6. Enfriamiento

Una vez que el yogurt ha alcanzado el pH requerido (4,6), se enfría a temperaturas de refrigeración (<10 °C) para detener el proceso de fermentación. En la manufactura del yogurt aflanado, los recipientes individuales se transfieren directamente a la cámara de enfriamiento o se enfrían en túneles de refrigeración, mientras que en el yogurt batido el enfriamiento se realiza primero agitando el coágulo en el tanque de fermentación con el objetivo de obtener un producto suave y cremoso antes de ser envasado en los recipientes (Weerathilake *et al.*, 2014).

De acuerdo con las especificaciones del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 2001), después de los pasos finales de manufactura y empaque, el yogurt debe ser enfriado y almacenado a temperaturas menores a 7,2 °C.

3.4.2. Efecto del tratamiento térmico sobre las proteínas del yogurt

Las proteínas del suero que participan en la agregación de la caseína en el yogurt son α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina. Aunque las caseínas son termo estables, las proteínas del suero sufren desnaturalización a partir de 65 °C. Durante el tratamiento térmico hay dos posibles eventos dependiendo de la intensidad del calor. Los tratamientos térmicos severos, por encima de 80 °C, inducen tanto a la α -lactoalbúmina como a la β -lactoglobulina a participar de la agregación proteica junto a κ -caseína de la micela, lo que conduce a la formación de un coágulo firme y un yogurt menos vulnerable a sinéresis, como consecuencia del aumento de las propiedades hidrofílicas debido al aumento de tamaño de las micelas de caseína formando una matriz reticular, la cual determina una distribución continua de la proteína en toda la masa del yogurt, con la fracción acuosa retenida en la red formada (Romero del Castillo & Lagarriga, 2004). Un tratamiento térmico más bajo en cambio causa la participación de la β -lactoglobulina en lugar de la α -lactoalbúmina, ya que un 80 a 90% de α -lactoalbúmina desnaturalizada es reversible después del calentamiento (Lucey, 2002).

El tratamiento térmico además destruye las aglutininas, proteínas responsables de la agregación de los glóbulos de grasa y su consecuente separación del resto de la leche, con lo que disminuye el espesor de la capa de grasa que se forma en la superficie (Romero del Castillo & Lagarriga, 2004).

3.4.3. Formación del gel

En la elaboración de yogurt, las bacterias ácido-lácticas convierten la lactosa en ácido láctico, dando como resultado el descenso del pH. Éste, más que la cantidad de ácido determina los cambios en la conformación de las proteínas (Weerathilake *et al.*, 2014). Las micelas de caseína son los bloques formadores en los geles de leches fermentadas, por lo que la naturaleza y el tipo de las interacciones de caseína son muy importantes para las propiedades de estos tipos de gel. La integridad de las micelas de caseína es controlada por un balance localizado entre interacciones hidrofóbicas y repulsión electrostática (Lucey, 2002).

La producción de ácido láctico durante la fermentación conduce a la desestabilización del sistema micelar, lo que resulta en la gelatinización de las proteínas. Al alcanzar el punto isoelectrico de las proteínas de suero (pH 5,2) y caseínas desnaturalizadas (pH 4,6), se forman progresivamente enlaces de baja energía entre las proteínas, principalmente hidrofóbicos. La adición de coloides hidrofílicos ayuda a enlazar el agua y en consecuencia se aumenta la viscosidad del yogurt, ayudando también a prevenir la separación de suero, problema conocido como sinéresis (Weerathilake *et al.*, 2014).

Durante la fermentación se forma el gel. La producción de ácido láctico solubiliza el fosfato de calcio y el citrato asociados a la micela, desestabilizando la caseína y formando complejos con las proteínas del lactosuero desnaturalizadas. Al pH de 4,6 (punto isoelectrico de las caseínas) el tamaño de las micelas decrece gradualmente. Las cargas negativas de las micelas se van neutralizando, con lo que se aproximan y coalescen. A este punto, las caseínas junto con las proteínas del lactosuero desnaturalizadas forman el gel, constituido por una red de estructura regular que encierra en el interior a los componentes de la leche junto con el agua (Romero del Castillo & Lagarriga, 2004).

3.4.4. Tendencias de consumo: el yogurt griego (*Greek Yogurt*)

3.4.4.1. Generalidades del yogurt griego

El yogurt griego, también conocido como *Labneh*, es un producto lácteo fermentado originario del Medio Oriente, pero ampliamente conocido alrededor del mundo por sus múltiples beneficios nutricionales. Se elabora por concentración del yogurt tradicional mediante la reducción de su contenido de humedad. El yogurt ya fermentado y coagulado, se filtra o cuela por una manta para eliminar el suero líquido y parte de la lactosa. El resultado es un producto cremoso, espeso y con más proteína por porción que el yogurt tradicional, ya que debe contener al menos un 5,6% frente al 2,7% mínimo del yogurt sin colar (Atamian *et al.*, 2014; El-Abbadi *et al.*, 2014).

Existen muchas variedades de yogurt griego dependiendo del país y área. En el Mediterráneo, es especialmente grueso y casi salado, no utilizado en contexto dulce, mientras que en países americanos el yogurt griego es mayormente encontrado como un snack dulce con la adición de frutas y sabores. Puede utilizarse además para elaborar una amplia variedad de salsas, como sustituto de la natilla o crema ácida, queso crema y mantequilla, aportando cremosidad a *dips*, productos horneados y rellenos de pastelería, ya que mantiene su cuerpo gracias a su resistencia al calor (American Culinary Federation, s.f.).

3.4.4.2. Valor nutricional

El yogurt es considerado alimento saludable debido a su alta digestibilidad y biodisponibilidad de más de diez nutrientes esenciales, incluyendo el calcio, colaborador en la salud ósea y el potasio, que ayuda a controlar la presión arterial. Es muy recomendado para las personas con desórdenes gastrointestinales, (síndrome de intestino irritado/inflamado), intolerancia a la lactosa y es bien conocido su aporte a la función inmune y al control del peso (Nagendra, 2007; Weerathilake *et al.*, 2014).

La composición nutricional del yogurt puede variar de acuerdo con el tipo de cultivo iniciador, tipo y especie de origen de la leche, así como de los ingredientes utilizados en su elaboración, como los sólidos lácteos, sólidos no grasos, endulzantes y/o frutas agregadas (Weerathilake *et al.*, 2014). La composición nutricional promedio de diferentes variedades de yogurt se muestra en el Cuadro 2.

Los yogures con cultivos vivos son más favorables para la salud. Numerosos beneficios han sido declarados para las bacterias probióticas como *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. y *L. casei*, los cuales incluyen efectos antimutagénicos, propiedades anticancerígenas, reducción del colesterol y estimulación del sistema inmunológico, por lo que su incorporación en los productos lácteos, particularmente yogurt, ha incrementado en los últimos años (Nagendra, 2007).

Cuadro 2. Composición nutricional promedio de diferentes variedades de yogurt (por 100 g).

Componente	Yogurt con leche entera	Yogurt bajo en grasa	Yogurt descremado	Yogurt griego	Yogurt líquido
Energía (kcal)	79	56	54	133	62
Proteína (g)	5.7	4.8	5.4	5.7	3.1
Carbohidratos (g)	7.8	7.4	8.2	4.8	13.1
Grasa (g)	3.0	1.0	0.2	10.2	Trazas
Tiamina (mg)	0.06	0.12	0.04	0.12	0.03
Riboflavina (mg)	0.27	0.22	0.29	0.13	0.16
Niacina (mg)	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
Vitamina B6 (mg)	0.10	0.01	0.07	0.01	0.05
Vitamina B12 (mg)	0.2	0.3	0.2	0.02	0.2
Folato (µm)	18	18	8	6	12
Caroteno (µm)	21	Trazas	Trazas	Trazas	Trazas
Vitamina D	0	0.1	Trazas	0.1	Trazas
Potasio (mg)	280	228	247	184	130
Calcio (mg)	200	162	160	126	100
Fósforo (mg)	170	143	151	138	81

Fuente: The Dairy Council, 2013.

Los productos lácteos son la fuente más importante de ácido linoleico conjugado (CLA) el cual posee un efecto protector contra el cáncer de seno. El yogurt griego contiene 0,128-1,501 gramos de CLA por cada 100 gramos de grasa (Serafeimidou *et al.* 2012). Las proteínas del yogurt son de alta calidad debido a su alto valor biológico al proveer la mayoría de los aminoácidos esenciales, por su alto contenido de prolina y glicina. El yogurt griego, al ser rico en proteína, contribuye a la formación y reparación de los músculos (Weerathilake *et al.*, 2014).

Gracias a todas estas bondades nutricionales asociadas con la ingesta de yogurt griego, existe una tendencia creciente de consumo, haciendo que sea la categoría de lácteos de mayor crecimiento en el mercado (Weerathilake *et al.*, 2014).

3.5. Nuevas tecnologías para el tratamiento de lácteos

3.5.1. Demandas del consumidor

Productos que promuevan la salud y el bienestar son las tendencias de los años venideros, con características sensoriales únicas, calidad incuestionable e inocuidad para su consumo, sin dejar de lado la obtención con procesos limpios, con menos consumo de energía y mínimo impacto ambiental, son las demandas del mercado mundial actual (Monteiro *et al.*, 2018).

En el último siglo los consumidores han disfrutado los beneficios de los avances en productos lácteos: nuevas y más convenientes formas de empaque, productos deslactosados, bajos en grasa, y con propiedades funcionales. Estas tendencias y situaciones actuales, incluida la creciente popularidad de los productos orgánicos, artesanales junto al consumo de leche cruda y de vacas de pastoreo, conducen y dan forma al futuro de la leche y los productos lácteos (Tunick, 2009).

Dadas las exigencias del consumidor actual sobre calidad de los alimentos y productos que conserven sus características de valor nutricional, las tendencias actuales de consumo se inclinan hacia la demanda de mayor variedad de productos convenientes y funcionales con larga vida útil (Akdemir, 2015).

A pesar de la indiscutible efectividad de los tratamientos térmicos para la inactivación de microorganismos patógenos y de deterioro de los productos lácteos, existe una creciente aversión hacia la aplicación de calor para la conservación de los alimentos por las consecuentes modificaciones de color, sabor y aporte nutricional. En respuesta a dichas peticiones y para satisfacer las necesidades del consumidor, se han desarrollado tecnologías alternativas que permitan la obtención de productos inocuos y de alta calidad (Akdemir, 2015).

3.5.2. Necesidad de innovación

La gran demanda del mercado global por nuevos productos que reúnan las expectativas y necesidades de los consumidores modernos ha llevado a varios sectores industriales a invertir en innovación en sus productos y procesos (Monteiro *et al.* 2018). La aplicación de altas presiones,

irradiación con luz ultravioleta, campos eléctricos pulsantes, ultrasonificación e irradiación gamma son algunas tecnologías innovadoras estudiadas para el procesamiento no térmico de productos lácteos, sin embargo, no han logrado equiparar la eficiencia y efectividad de la aplicación de calor debido a la necesidad de altas intensidades del tratamiento, con repercusiones negativas en la calidad sensorial, o a la inexistente aprobación legal.

Esto conduce a la necesidad de investigaciones que potencien la aplicación y combinación de dichas tecnologías para lograr un “efecto barrera” u obtención de efectos antimicrobianos sinérgicos con mínimo impacto sensorial y nutricional para complacer las necesidades y demandas del consumidor (Álvarez & Ji, 2003; Pereira & Vicente, 2010, Akdemir, 2015).

En este sentido, el uso de tecnologías emergentes no térmicas, como el ultrasonido, ha sido evaluado en los diferentes segmentos productivos en miras del establecimiento de nuevos procesos y productos que reúnan por completo los deseos del consumidor moderno (Monteiro *et al.*, 2018).

3.6. Ultrasonido en la industria de alimentos

3.6.1. Definición de ultrasonido

El ultrasonido se refiere a ondas sonoras de presión mecánica a una frecuencia mayor al umbral del oído humano por lo general superiores a los 20 kHz. Se divide en tres rangos de frecuencia: ultrasonido de poder (16 a 100 kHz), ultrasonido de alta frecuencia (100 kHz a 1 MHz) y ultrasonido de diagnóstico (1 a 10 MHz) (Patist & Bates, 2008).

Las ondas ultrasónicas se generan por el principio de transformación electroestrictiva, en el cual se da la polarización de las moléculas transmitiendo una corriente alterna al material a través de dos electrodos. Una vez que la energía es convertida en oscilación mecánica, las ondas se transmiten al medio a través de un amplificador y una sonda, resultando en un movimiento continuo en forma de ondas longitudinales que crean compresión (zonas de alta presión) y rarefacción o expansión (zonas de baja presión) de las moléculas del medio (Knorr *et al.*, 2004). La presión acústica es una onda senoidal que depende del tiempo, la frecuencia y la máxima amplitud de presión de la onda, directamente proporcional a la energía generada por el transductor (Patist & Bates, 2008).

3.6.2. Principio de acción

Cuando el ultrasonido pasa a través de un medio líquido, la interacción entre las ondas ultrasónicas, el líquido y el gas disuelto, conduce a un fenómeno de excitación conocido como cavitación acústica. Este fenómeno consiste en la oscilación de los núcleos de gases disueltos bajo la influencia del campo acústico debido a los cambios de presión alrededor de ellos. Durante estas oscilaciones, el gas disuelto y el vapor se difunden adentro y afuera de las burbujas, en donde la cantidad de gas/vapor que se difunde durante la fase de expansión es mayor que la cantidad que se difunde fuera de la burbuja en la fase de compresión durante la oscilación, lo que conduce al crecimiento de las burbujas hacia un intervalo de resonancia (Patist & Bates, 2008; Chandrapala *et al.*, 2012).

Este proceso de compresión y rarefacción (o expansión) de las partículas del medio y el consecuente colapso de las burbujas comprende el conocido fenómeno de cavitación, el efecto más importante del ultrasonido de alta potencia (Condón *et al.*, 2005; Patist & Bates, 2008). La cavitación puede clasificarse en acústica, hidrodinámica, óptica y de partícula, basado en el modo de generación (Gogate *et al.*, 2006). Sólo la acústica y la hidrodinámica pueden generar las intensidades requeridas para inducir cambios químicos y físicos en los sistemas de carbohidratos, proteínas, lípidos, etc. (Awad *et al.*, 2012).

Cuando la presión negativa del ciclo de rarefacción excede las fuerzas de atracción entre las moléculas del líquido, se forma un vacío. Este vacío o agujero absorbe una pequeña cantidad de vapor de la solución que, al comprimirlo, no colapsa totalmente, sino que continúa creciendo en tamaño en ciclos sucesivos para formar una burbuja de cavitación acústica. Este fenómeno se ilustra en la Figura 2.

Se forman muchos miles de estas burbujas en el líquido, algunas son relativamente estables, pero otras pueden expandirse aún más a tamaños inestables y someterse a colapsos violentos que generan temperaturas por encima a los 5000 K (4700 °C) y presiones del orden de los 50 MPa (Condón *et al.*, 2005; Tiwari & Mason, 2012).

El uso de ultrasonido en procesos industriales tiene dos requerimientos principales: un medio líquido, incluso si forma sólo el 5% de todo el medio, y una fuente de vibraciones de alta energía (el ultrasonido). La fuente de energía vibracional es llamada transductor, el cual transfiere la

vibración (después de la amplificación) al llamado sonotrodo o sonda, la cual está en contacto directo con el medio de procesamiento (Patist & Bates, 2008).

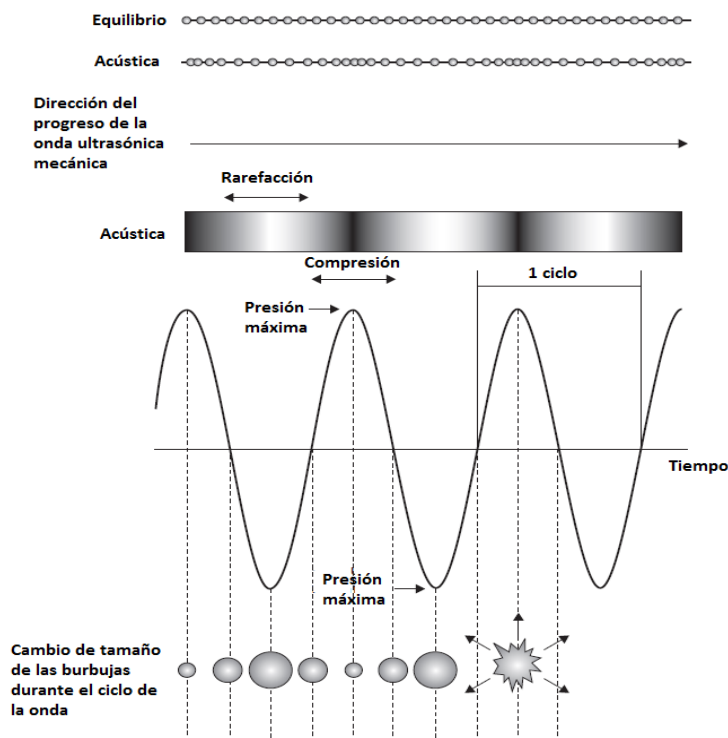


Figura 2. Ilustración del fenómeno de cavitación ultrasónica (tomado de Tiwari & Mason, 2012).

3.6.3. Aplicación del ultrasonido

El uso de ultrasonido en la industria de alimentos ha sido sujeto de estudio e investigación por varios años y puede dividirse en dos aplicaciones principales: Análisis de Alimentos y Procesamiento de Alimentos. El ultrasonido de bajo poder o baja intensidad utilizan alta frecuencia en rangos de 5 a 10 MHz. Es utilizado para monitorear la composición y propiedades fisicoquímicas de los compuestos alimentarios y productos durante el procesamiento y almacenamiento, lo que es crucial para controlar las propiedades de los alimentos y mejorar su calidad. Son técnicas no destructivas que utilizan tiempo de vuelo y absorción del sonido para obtener información de la textura, composición, viscosidad y/o concentración sin causar alteración física o química de las propiedades del material (Awad *et al.*, 2012; Tiwari & Mason, 2012).

Ultrasonido de baja intensidad ha sido utilizado en programas no invasivos de apoyo al mejoramiento genético de ganado y en la evaluación de la composición de productos cárnicos crudos y fermentados, así como en carne de pollo y pescado. También ha sido utilizado para el control de calidad de vegetales y frutas tanto antes como después de la cosecha, durante el procesamiento de queso, aceites comerciales de cocina, pan, cereales, productos con grasa emulsificada, geles, alimentos en aerosol y congelados. Otras aplicaciones incluyen la detección de adulteración de miel, estado de agregación, tamaño y tipo de proteínas (Awad *et al.*, 2012).

Por otra parte, el ultrasonido de alto poder o alta intensidad utiliza frecuencias bajas en rangos de 20 a 100 kHz. Produce cambios mecánicos, físicos, químicos y bioquímicos a través de la cavitación, la cual apoya varias operaciones de procesamiento de alimentos como extracción, congelación, secado, emulsificación, reducción de tiempos de reacción, aumento en el rendimiento e inactivación bacteriana (Awad *et al.*, 2012), además para limpieza y corte. Si es aplicado en líquidos, el término que se utiliza es “sonicación”, y puede aportar cambios importantes en el material debido a los efectos de la cavitación acústica. Entre los efectos más prometedores se encuentra el procesamiento no térmico para la conservación y preservación de los alimentos. (Awad *et al.*, 2012; Tiwari & Mason, 2012).

3.6.4. Combinación de ultrasonido con otras técnicas

Para la esterilización de alimentos líquidos se emplean energías acústicas mucho más altas y los enfoques son principalmente sonicación por sí sola, manosonicación (presión y ultrasonido), termosonicación (calor y ultrasonido) y manotermosonicación (presión, calor y sonicación). Estas técnicas han sido efectivas contra microorganismos patógenos y de deterioro (Piyasena *et al.*, 20013; Tiwari & Mason, 2012).

Se considera que la termosonicación aumenta la letalidad de los procesos convencionales de pasteurización y disminuyen las temperaturas máximas de los procesos en un 25 a 50%, mejorando la retención de la calidad nutricional y sensorial del producto (Chandrapala *et al.*, 2012). Sin embargo, la principal desventaja de esta tecnología es que disminuye su eficacia al aumentar la temperatura, ya que se reduciría el efecto de la cavitación como resultado del aumento de la presión de vapor y disminución en la tensión superficial del líquido (Villamiel & De Jong, 2000 citados por Bermúdez, 2012). Este efecto se puede contrarrestar aplicando presión, ya sea por manosonicación o manotermosonicación. La aplicación de hasta 600 kPa permite a la

cavitación mantenerse a temperaturas incluso sobre el punto de ebullición, aumentando considerablemente la eficiencia de la inactivación microbiana (Raso *et al.*, 1998; Chandrapala *et al.*, 2012).

3.6.5. Mecanismo de la inactivación microbiana

El tamaño de la burbuja cambia cuando la onda de ultrasonido entra en contacto con el líquido. Después de alternar entre ciclos de compresión y expansión, la energía sónica no logra mantener la fase gaseosa dentro de la burbuja e implota. El mecanismo para la inactivación microbiana después del tratamiento con ultrasonido ocurre cuando estas burbujas implosionan y las moléculas circundantes chocan entre sí unas con otras, creando áreas de temperaturas extremadamente altas, hasta 5500 °C (Condón *et al.*, 2005). Adicionalmente, la implosión libera ondas de choque que dañan las membranas celulares y producen radicales libres, contribuyendo potencialmente a la inactivación microbiana. Se sugiere que la aplicación del calor en conjunto a la ultrasonificación conduce a un incremento de la capacidad de inactivación bacteriana del ultrasonido, proceso conocido como termosonicación (Piyasena *et al.*, 2003).

El trabajo publicado por Lorimer & Mason (1987) muestra que en el ultrasonido, la frecuencia es inversamente proporcional al tamaño de la burbuja. Así, la sonicación de baja frecuencia, la cual es de alta potencia (16-100 kHz) genera burbujas de cavitación grandes, resultando en mayores temperaturas y presiones en la zona de cavitación. Esto causa el colapso de la célula bacteriana y su consecuente inactivación.

En matrices alimentarias, el ultrasonido permite la posibilidad de actuar como tratamiento antimicrobiano en materiales sensibles al calor, mayormente aplicado a jugos de frutas, aguas y leches. La cavitación acústica es la fuerza motriz que produce los efectos de procesamiento de la sonicación. Cuando la energía de la cavitación es dominada y controlada, provee una notable fuente de energía la cual, junto con los cambios de presión que ocurren en las implosiones, son el principal mecanismo para la ruptura de las células microbianas. El nivel de energía transmitida a una matriz alimenticia se expresa como intensidad ultrasónica (W/cm²) o densidad de energía acústica (W/mL) (Tiwari & Mason, 2012).

La utilización de manotermosonicación en productos lácteos es recomendable cuando se deben eliminar enzimas termorresistentes, ya que los daños causados a las células son irreversibles

debido a la intensa vibración y cavitación, causando movimientos violentos en la membrana (Chandrapala *et al.*, 2012).

3.6.6. Necesidad de investigación de ultrasonido en lácteos

Históricamente, los estudios del ultrasonido en lácteos se han enfocado principalmente en la inactivación microbiana y enzimática; los más recientes en cambio se dirigen a la investigación del efecto del ultrasonido en las proteínas y los glóbulos de grasa, así como sus implicaciones en los procesos lácteos y sus productos debido a la cavitación (Ashokkumar *et al.*, 2010; Terefe *et al.*, 2016).

El ultrasonido tiene pocos años de haberse convertido en una herramienta eficiente para aplicaciones comerciales a gran escala, como la emulsificación, homogenización, extracción de compuestos, cristalización, eliminación de agua, pasteurización a baja temperatura, eliminación de gas, eliminación de espuma, activación e inactivación de enzimas, reducción de tamaño de partícula y alteración de la viscosidad. Como la mayoría de las tecnologías innovadoras para el procesamiento de alimentos, la ultrasonificación no es una tecnología estándar, por lo que necesita ser desarrollada y escalada para cada aplicación (Patist & Bates, 2008).

El uso de caracterización acústica en la industria alimentaria está en expansión mundial, específicamente en el sector lácteo por sus aplicaciones en la determinación del contenido de grasa. Si la burbuja de cavitación colapsa cerca de la superficie de la capa limítrofe entre las fases de dos líquidos inmiscibles, la onda de choque puede proveer un mezclado eficiente entre las dos capas, dando como resultado la formación de una emulsión fina y muy estable (Patist & Bates, 2008).

Para la industria láctea resulta de especial interés esta alternativa para la homogenización, pues los glóbulos de grasa disminuyen su tamaño en un 81,5% tras el tratamiento de ultrasonido. Como consecuencia, se da un aumento en la luminosidad de la leche al volverse más blanca, ya que los glóbulos pequeños y homogéneos modifican la reflexión de la luz, resultando en un color más blanco (Bermúdez & Barbosa, 2011; Tiwari & Mason, 2012).

En productos lácteos derivados como el yogurt, estudios han encontrado que la homogenización con ultrasonido mejora la estabilidad ante el cremado, la viscosidad y aumenta la capacidad de retención de agua, disminuyendo la sinéresis. La sonicación influye sobre las cadenas de caseína y

éstas actúan con las proteínas del suero, reteniendo agua y glóbulos de grasa, mejorando el gel (Chandrapala *et al.* 2012). Además, se logra una reducción del tiempo de fermentación del yogurt debido a la estimulación de la producción de ácido gracias a la cavitación que favorece la hidrólisis de la lactosa (Bermúdez & Barbosa, 2011).

Los efectos positivos del ultrasonido han sido ampliamente estudiados en las industrias petroquímicas, de polímeros y farmacéutica, pero es necesario realizar más estudios en alimentos. Las ventajas son versátiles y han resultado rentables en varias industrias de alimentos, sin embargo se necesitan más esfuerzos e investigación para diseñar y desarrollar sistemas eficientes que apoyen operaciones a gran escala que puedan ser adaptados a otros procesos (Gallego *et al.*, 2010; Awad *et al.*, 2012). El Cuadro 3 enlista algunas aplicaciones con necesidad de investigación.

Cuadro 3. Aplicaciones y beneficios del ultrasonido de alta intensidad en la industria láctea.

Aplicación	Mecanismo	Beneficio
Emulsificación / Homogenización	Micro-transmisión de alta cizalla.	Aumento de rentabilidad en la formación de emulsiones lácteas y homogenización de la leche fluida.
Antiespumante	Ondas de presión en el aire que causan colapso de las burbujas.	Mayor producción, reducción o eliminación de productos químicos antiespumantes. Reducción de desperdicios en líneas de embotellado de bebidas lácteas.
Alteración de la viscosidad	Modificación reversible e irreversible mediante vibración y micro-transmisión de alta cizalla. Modificación sono-química	Modificación no química para el mejoramiento de las características de procesamiento, reducción de aditivos y obtención de funcionalidad diferenciada.
Inactivación microbiana y enzimática	Mayor transferencia de calor y alto cizallamiento. Daño cavitacional directo a las membranas celulares de microorganismos.	Como complemento para la inactivación de enzimas a temperaturas más bajas para el mejoramiento de atributos de calidad. Pasteurización a temperaturas bajas.

Cuadro 3. Aplicaciones y beneficios del ultrasonido de alta intensidad en la industria láctea (continuación).

Aplicación	Mecanismo	Beneficio
Fermentación	Transferencia de sustrato mejorada y estimulación del tejido vivo. Mejoramiento de procesos enzimáticos.	Aumento de la producción de metabolitos, con la subsecuente aceleración de los procesos de fermentación en la industria de yogurt, quesos y cremas ácidas.
Transferencia de calor	Transferencia de calor mejorada a través de transmisión acústica y cavitación.	Aceleración del calentamiento, enfriamiento y secado de productos a temperaturas más bajas. Pasteurización alternativa.

*Fuente: Adaptado de Patist & Bates, 2008.

3.7. Parámetros de control para la elaboración de yogurt

3.7.1. Mediciones fisicoquímicas

3.7.1.1. Textura

La textura es una de las principales características que define la calidad de un yogurt. Para los productos alimentarios, la textura representa todos los atributos reológicos y estructurales perceptibles por medidas mecánicas, táctiles y cuando es apropiado, receptores visuales y auditivos. La reología y la estructura de un producto evaluado por métodos instrumentales también brinda información relevante de sus propiedades estructurales (Foegeding *et al.*, 2011; Fisher & Windhad, 2011).

La textura del yogurt o de cualquier tipo de leche fermentada es importante en miras de la calidad del producto, ya que se relaciona con la percepción sensorial. Las características de textura del yogurt son generalmente estudiadas en el recipiente, utilizando cuchara o en la boca por métodos sensoriales (Ozcan, 2013). Los defectos típicamente relacionados a la textura, los cuales pueden influir en el rechazo del consumidor, son cambios aparentes en la viscosidad y la aparición de sinéresis (Goncalvez *et al.*, 2005, Lee & Lucey, 2010).

La caracterización reológica del yogurt es requerida para la producción y proceso de desarrollo para asegurar la aceptación del consumidor. Esta caracterización puede realizarse utilizando tanto métodos sensoriales como instrumentales. Diferentes descriptores sensoriales de textura han sido utilizados para caracterizar al yogurt, tales como firmeza, cremosidad, viscosidad, sensación en la boca y sinéresis (Goncalvez *et al.*, 2005; Ozcan, 2013).

La determinación de la textura del yogurt usualmente incluye análisis sensoriales, de estructura y de reología. Algunos parámetros estructurales son determinados utilizando un Análisis de Perfil de Textura (TPA, por sus siglas en inglés) con compresión mecánica del alimento. Estos análisis implican presionar una sonda sobre la muestra a una velocidad lenta y constante registrando la fuerza requerida. En la práctica, fuerza y deformación son los dos parámetros fundamentales para la caracterización de la textura. Varios parámetros empíricos pueden ser extraídos de las curvas de fuerza vs tiempo/distancia, tales como cohesividad, adhesividad, masticabilidad, gomosidad, firmeza y elasticidad (Loveday *et al.*, 2013; Ozcan, 2013).

3.7.1.2. Color

El color del yogurt depende del tipo de leche utilizada. La leche posee un color entre blanco y blanco-amarillento, el cual está determinado por la dispersión y absorción de la luz por los glóbulos de grasa y las micelas de caseína (Chacón, 2004; Belitz *et al.*, 2009; Lu & Wang, 2017).

El tipo de leche así como su contenido de grasa tienen un efecto significativo sobre atributos sensoriales como el color y el brillo del yogurt. Para yogurt griego o *Labneh*, el color típico varía entre blanco tiza a Ivory tenue (Atamian *et al.*, 2014). Con esto, la homogenización de la leche aumenta la blancura en el yogurt (Lee & Lucey, 2010).

3.7.1.3. Sinéresis y capacidad de retención de agua

La sinéresis se define como la separación del suero de la estructura del gel, observándose como líquido en la superficie del yogurt (Lee & Lucey, 2010). La sinéresis espontánea se relaciona con una red proteica inestable. Los niveles de acidez han sido asociados con el grado de sinéresis en geles lácteos ácidos. La sinéresis ha sido atribuida a reordenamientos estructurales en la red de gel de caseína y al volumen de espacio vacío de la matriz proteica (Atamian *et al.*, 2014).

Dado que la proteína es un elemento básico de la red del gel, las diferencias en sinéresis se atribuyen a las diferencias en el contenido de proteína; cuanto mayor sea el contenido de proteína, más compleja será la red del gel y por lo tanto mayor es la capacidad de los espacios vacíos de contener el suero. La sinéresis se ve afectada por el tipo de leche que se utilice, donde la del tipo bovino presenta mayor grado de sinéresis que la caprina y la ovina (Atamian *et al.*, 2014).

3.7.1.4. Curvas de fermentación y gelación

La temperatura óptima para las bacterias ácido lácticas (*Streptococcus* subsp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*), es alrededor de 40 a 45 °C, para convertir la lactosa a ácido láctico reduciendo el pH de la leche de 6,7 a 4,7. La gelatinización ocurre a un pH entre 5,2 y 5,4 para leche que ha recibido un alto tratamiento térmico (Lee & Lucey, 2010).

En la elaboración de productos lácteos acidificados es importante mantener un control del proceso de acidificación para asegurar un adecuado descenso del pH que propicie los cambios sensoriales y estructurales que se buscan. Los mecanismos fisicoquímicos para la formación del gel se describen en tres regiones de pH (Lee & Lucey, 2010):

- pH de 6,7 a 6,0: La carga negativa neta de las micelas de caseína disminuye, resultando en una disminución de la repulsión electrostática. Como solo una pequeña parte del fosfato de calcio coloidal es soluble a pH mayor a 6,0 el tamaño de las micelas de caseína se mantiene prácticamente sin cambios.
- pH de 6,0 a 5,0: La carga negativa neta en las micelas de caseína disminuye considerablemente y los “hilos” de κ -caseína se contraen o encogen, resultando en una disminución de la repulsión electrostática y la estabilización estérica. El fosfato de calcio coloidal se solubiliza y debilita la estructura interna de las caseínas.
- pH menor a 5,0: Conforme el pH se acerca al punto isoeléctrico de la caseína (4,6) hay una disminución en la carga negativa neta, lo que conduce a una disminución en la repulsión electrostática. Las atracciones caseína-caseína aumentan debido a las interacciones de carga hidrofóbica y positivas-negativas. El proceso de acidificación termina con la formación de una red tridimensional de cadenas y agrupaciones de caseínas.

3.7.1.5. Rendimiento de elaboración

En la industria láctea el rendimiento se refiere a la cantidad de producto obtenido a partir de una determinada cantidad de leche, tratándose de la suma de materia grasa, proteínas, agua y otros componentes y/o agregados de la leche que se transfieren al producto durante el proceso de elaboración (Menz, 2002).

No existe consenso acerca de una manera única y correcta para declarar el rendimiento a partir de la composición de la leche y de la composición deseada en el producto a elaborar, bajo condiciones determinadas de procesamiento. La forma más útil se basa en el balance de materia (Hernández *et al.*, 2004). Es posible reportar el rendimiento como kilogramos de producto obtenidos por cada 100 kilogramos de leche (Menz, 2002).

El rendimiento depende de diversos factores como el contenido de grasa y de proteína en la leche, ya que tanto los glóbulos grasos como las micelas de caseína y otros solutos son los componentes que formarán el producto a elaborar. Las etapas del procesamiento y la manera en la que se realicen también influyen en el rendimiento (Menz, 2002). Pueden ocurrir pérdidas durante el procesamiento por la separación del suero y el drenado, las cuales son variables importantes en la determinación de la composición y el rendimiento (Menz, 2002; Walstra *et al.*, 2006).

3.7.2. Pruebas sensoriales como parámetro de calidad

3.7.2.1. Agrado sensorial del yogurt

El yogurt griego es actualmente el sector con mayor crecimiento en la industria láctea, y sus atributos sensoriales tienen gran efecto en la aceptación del consumidor, así como el sabor. La falta de estándares de identidad junto con la amplia variedad de métodos con los que puede elaborarse conduce a variaciones sensoriales y en sus propiedades, por lo que conocer las expectativas del consumidor, así como conductores de agrado, proporciona información útil para su elaboración (Desai *et al.*, 2013).

Los consumidores prefieren yogurt griego con textura densa y firme, aroma dulce y agrio moderado, así como notas ácidas lácteas. El consumidor actual es consciente del aumento en el contenido proteico de un yogurt griego, pero desconoce la diferencia entre uno batido y uno concentrado o fortificado, pero ambos reciben el porcentaje más alto de agrado general (Desai *et al.*, 2013).

3.7.2.2. Generalidades de las pruebas sensoriales

Las pruebas sensoriales son útiles cuando se requiere información descriptiva por medio de respuestas individuales. La búsqueda de alternativas y nuevas tecnologías para la elaboración de productos es una estrategia apropiada para construir ventajas competitivas en los mercados globales de alimentos. Los programas de innovación son necesarios para dar prioridad a las necesidades de los consumidores, así como comprender las razones que motivan a una determinada compra, con el objetivo de desarrollar productos exitosos. Por esta razón, involucrar a los consumidores desde las primeras etapas del proceso es crítico al desarrollar productos o tecnologías con significado para los consumidores (Fuller, 2001; Costa & Jongen, 2006).

Las pruebas de agrado general son evaluaciones afectivas que se utilizan al valorar un producto nuevo no disponible en el mercado, en donde se invitan consumidores no entrenados a evaluar el producto en un laboratorio bajo condiciones controladas, con el objetivo de localizar el nivel de agrado o desagrado de una muestra específica evaluada mediante una escala hedónica de nueve puntos (Fuller, 2001; Costa & Jongen, 2006). Esta escala es de las más usadas globalmente en este tipo de pruebas y consiste en una escala bipolar balanceada neutra en el centro con cuatro categorías negativas a la izquierda y cuatro positivas a la derecha, como se ilustra en la Figura 3.

Me disgusta en extremo	Me disgusta mucho	Me disgusta moderado	Me disgusta un poco	Ni me gusta ni me disgusta	Me gusta un poco	Me gusta moderado	Me gusta mucho	Me gusta en extremo
---	-------------------------	-------------------------	---------------------------	---	------------------------	----------------------	-------------------	------------------------------------

Figura 3. Ejemplo de una escala hedónica de nueve puntos (tomado de Azofeifa, 2016).

3.7.2.3. Escalas hedónicas de agrado general

Las escalas hedónicas pueden ser estructuradas, en las cuales se indica en cada punto el agrado anclando en los extremos las leyendas “*Me disgusta muchísimo*” hasta “*Me agrada muchísimo*”. Las escalas hedónicas no estructuradas miden 9 cm y no poseen descriptores, únicamente los anclados a los extremos (Villanueva *et al.*, 2005; Brenes, 2008). También se tiene la escala híbrida, con los términos hedónicos a los extremos más el término central “*Ni me gusta ni me disgusta*”. Este tipo resulta más fácil de utilizar para el panelista ya que tiene la ventaja de dar más libertad para expresar su nivel de agrado y asignar un puntaje sensorial más flexible (Navarro *et al.*, 2013).

Dichos panelistas deben ser seleccionados al azar, consumidores del producto, desconocer el objetivo del estudio y comprender el proceso de evaluación (Pedredo & Pangborn, 1989).

3.7.2.4. Análisis de conglomerados

También conocido como Análisis de *Clusters*, sirve de herramienta útil para interpretar los resultados de las pruebas sensoriales, permitiendo agrupar a los consumidores en función de sus intereses en común (Farcomeni & Greco, 2015). Consiste en una gran cantidad de métodos y técnicas cuyo fin es lograr un agrupamiento de “n” individuos en “g” grupos (o *clusters*) según su comportamiento en una serie de variables, en este caso, el nivel de agrado por un producto (Díaz, 1998).

La técnica jerárquica para la clasificación de los *clusters* generados, emplea un algoritmo en el que se realizan agrupaciones utilizando alguna medida de similitud o distancia, resultando en un árbol jerárquico llamado Dendograma o *Joining Tree Clustering*, compuesto por grupos en diferentes niveles unidos a través de nodos, como se observa en la Figura 4.

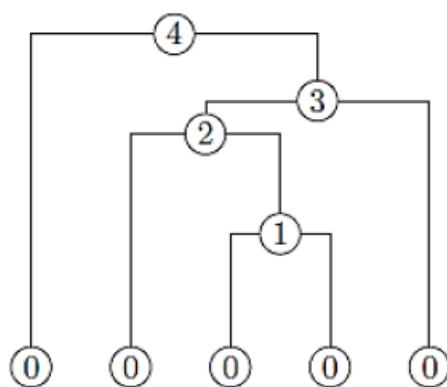


Figura 4. Ejemplo de un árbol jerárquico con niveles o dendograma (tomado de Gan, 2011).

El método de Ward es un método jerárquico para la clasificación de *clusters* en el que se van agrupando los casos de forma jerárquica de modo que se minimiza la variabilidad intra grupal, además del empleo del análisis de varianza para evaluar las distancias entre los *clusters*, generando grupos equilibrados en tamaño (Departamento de Estadística e Investigación Operativa, 2011).

Para determinar el número de grupos que se forman a partir del dendograma, el método “*Jump-statistic*” determina el salto o distancia entre los centroides de los *clusters* (punto promedio en el espacio multidimensional) y define cuando éstos son los suficientemente similares para unirse. La máxima distancia o salto generado corresponde al número de *clusters* (Mirkin, 2005).

Si se desea analizar, no tanto la estructura jerárquica, sino el número de grupos construidos y las características de cada uno, se utiliza la técnica no jerárquica con el algoritmo denominado *k-means*, que minimiza la variabilidad dentro del grupo y la maximiza entre grupos. La combinación de métodos se utiliza para obtener mejores resultados, ya que primero se construyen los *clusters*, y luego se reordenan los individuos en los grupos indicados (Díaz, 1998; Mirkin, 2005; Farcomeni & Greco, 2015).

3.7.3. Distribución de tamaño de partícula de los glóbulos de grasa

3.7.3.1. Los glóbulos de grasa de la leche

La leche es una emulsión aceite en agua en la que los glóbulos de grasa, menos densos que el agua, tienden a subir a la superficie si se deja la emulsión reposar. Con la homogenización, se rompen los glóbulos de grasa aumentando su número en la disolución en un factor de 600. Con esto, el área superficial de los glóbulos homogenizados aumenta 9 veces previniendo que la membrana del glóbulo de grasa cubra toda la superficie. La caseína de la leche se adhiere a los glóbulos, trayéndolos abajo y evitando la aglomeración (Tunick, 2009).

Si se compara contra otras grasas comestibles, la grasa láctea es compleja y contiene diferentes tipos de ácidos grasos, la mayoría de cadena corta, pero también se encuentran C_{14} , C_{16} y C_{18} , importantes en la elaboración de productos lácteos como la mantequilla. En la leche líquida estos ácidos grasos forman glóbulos de grasa con un diámetro generalmente entre 1 y 10 μm (Terefe *et al.*, 2016). Estos glóbulos poseen una membrana que contribuye a su estabilización, compuesta por múltiples fosfolípidos, proteínas y enzimas. Cuando la leche cruda se asienta, los glóbulos de mayor tamaño se agrupan iniciando el proceso conocido como cremado, formando la conocida capa superficial grasa y exponiendo a los lípidos al proceso de oxidación degradativa que acorta la vida útil. Este fenómeno puede ser prevenido con la homogenización (Lu & Wang, 2017).

Los tratamientos de homogenización reducen el diámetro de los glóbulos de grasa a menos de 1 μm y aseguran su distribución uniforme a través de la matriz alimenticia, por lo que la

homogenización es considerada un paso importante en el proceso de elaboración de yogurt, especialmente en aquel con alto contenido de grasa (Weerathilake *et al.*, 2014), como el elaborado a partir de leche entera.

3.7.3.2. Dispersión láser para estimar la distribución del tamaño de partícula

- **Tamaño de partícula**

El tamaño de partícula tiene influencia sobre muchas propiedades de materiales particulados y es un indicador valioso de calidad y desempeño, de especial importancia para emulsiones y suspensiones, ya que menores tamaño de glóbulo y mayores cargas de superficie típicamente mejorarán la estabilidad de la emulsión (Horiba, 2012).

Una partícula esférica puede ser descrita usando un solo número: el diámetro, ya que cada una de sus dimensiones es idéntica. Este es esencialmente el valor físico medido, usualmente por difracción láser. Un equipo de dispersión de luz promediará las dimensiones varias como un flujo de partículas aleatorias a través de un rayo de luz, produciendo una distribución de tamaños desde los más pequeños hasta los de mayores dimensiones. Al reportar la distribución de tamaño de partícula, el formato más comúnmente utilizado incluso para sistemas de análisis de imagen es el diámetro esférico equivalente en el eje x y porcentaje o frecuencia en el eje y (Horiba, 2012).

- **Equipos de dispersión de luz láser**

Los instrumentos de medición de la distribución del tamaño de partícula ofrecen herramientas de caracterización basados en varios principios, incluyendo difracción laser, dispersión dinámica de luz y análisis de imágenes. Estas técnicas pueden describir los resultados utilizando cálculos estadísticos estándar como la media y la desviación estándar. La dispersión dinámica de la luz es única entre las técnicas ya que el resultado primario suele ser el valor medio del ancho de distribución de intensidad, convirtiéndose a una distribución de volumen o frecuencia (Horiba, 2012).

Esta es una de las técnicas más populares en las determinaciones de tamaño de partícula por velocidad, facilidad de aplicación y flexibilidad, ya que permite medir partículas sólidas en suspensiones y emulsiones, e incluso polvos secos en aire. El índice de refracción del complejo de la muestra y el diluyente deben conocerse para una precisión óptima (Horiba, 2012).

El equipo analizador de distribución de tamaño de partícula por dispersión láser Horiba LA-300 puede medir rangos de partícula que van desde 0,1 hasta 600 μm de diámetro. Las mediciones se realizan mediante un diodo láser de 650 nm. Seis detectores de amplio ángulo y un detector de matriz de fotodiodos de silicio en forma de anillo de 36 canales, actúan como receptores para la luz que se refracta de las partículas suspendidas en la celda de flujo, permitiendo procesar señales de datos a la vez. Las señales eléctricas correspondientes a la intensidad de la luz dispersada se utilizan para calcular la distribución del tamaño de las partículas. Dicho esquema se ilustra en la Figura 5.

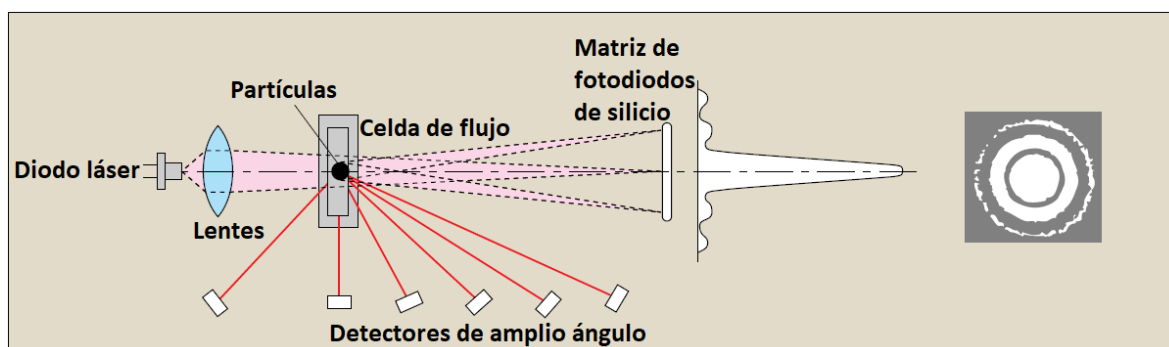


Figura 5. Diagrama de fenómeno de dispersión de luz utilizado por el equipo Horiba LA-300 para realizar la medición de la distribución del tamaño de partícula (adaptado de Horiba (2012)).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Localización del proyecto

Las pruebas experimentales de sonicación y la elaboración del yogurt griego (no para consumo) se realizaron en el laboratorio de microbiología del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA). Los análisis físicos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos (ETA) y en el Laboratorio de Química del CITA. La sonicación y elaboración del yogurt que se utilizó para la evaluación del agrado general se efectuaron en la Planta Piloto del CITA usando buenas prácticas de manufactura (BPM), las cuales junto con una pasteurización al recibo de la leche (detallada en la sección 4.12.2), garantizaron la ausencia de peligros microbiológicos. El panel sensorial tuvo lugar en el Laboratorio de Análisis Sensorial de la Escuela de Tecnología de Alimentos. Todos los anteriores ubicados en la Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Las determinaciones de distribución de tamaño de partícula se llevaron a cabo en el Departamento de Concretos del Laboratorio Nacional de Materiales y Métodos (LANAMME), mientras que las fotografías por microscopía óptica se tomaron en el Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular (CIBCM), ambos centros ubicados en la Ciudad de la Investigación de la Universidad de Costa Rica, Sede Rodrigo Facio, San José, Costa Rica.

4.2. Materia prima

4.2.1. Leche

Se utilizó leche cruda de vaca, entera y sin homogenizar, adquirida en una finca lechera ubicada en El Carmen de Guadalupe, Goicoechea, San José. Se almacenó en refrigeración desde el momento del ordeño, procurando que no tuviera más de 24 horas de ordeñada al momento de ser utilizada. Cada lote de leche se evaluó con el analizador Ekomilk, el cual estimó una composición promedio de 2,4% de grasa, 8,4% sólidos no grasos, 3,2% proteína, 0% agua y una densidad de 1,029 g/mL.

4.2.2. Ingredientes

Para la elaboración del yogurt griego se utilizó el cultivo YoFlex®Mild 1.0 de la casa comercial Chr. Hansen, estabilizante CC-729 de la casa Tate & Lyle y las proteínas lácteas MPC-85% de la casa Vitalus Nutrition y Textrion™PROGEL 800 de la casa DMV International. Los materiales se

adquirieron por medio de la empresa ASEAL S.A. Para la activación del cultivo láctico se utilizó azúcar comercial.

En el Cuadro 4 se indica la información de los aditivos que utilizados para la elaboración del yogurt griego.

Cuadro 4. Características de los aditivos utilizados en la elaboración de yogurt griego.

Producto	Función	Información
YoFlex®Mild 1.0	Cultivo	Cultivo liofilizado compuesto por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> (CHR Hansen, 2013).
CC-729	Agente estabilizante	Mezcla de almidón modificado, gelatina Kosher y gomas vegetales (pectina y goma guar) seleccionados específicamente para yogurt aplanado (Tate & Lyle, sf.).
MPC-85%	Fuente superior de proteína para fórmulas líquidas	Concentrado de proteína de leche 85% a partir de 100% leche líquida descremada, con propiedad emulsificante (Vitalus Nutrition, 2014).
Textrion™ PROGEL 800	Fuente de proteína para productos lácteos	Concentrado de proteína de suero de leche con propiedades emulsificantes para dar textura a productos lácteos (DMV International, 2009).

4.3. Manejo del inóculo de *Escherichia coli*

Para el manejo de *Escherichia coli* se tomó como base el procedimiento seguido por Lara (2015), el cual se describe a continuación.

4.3.1. Preparación del inóculo

Se utilizó la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922. Ésta es aerobia y utilizada regularmente para ensayos de sensibilidad a antibióticos. Es aislada originalmente de una muestra clínica humana en

Seattle, Estados Unidos (Minogue *et al.*, 2014; ATCC, 2015). La cepa se tomó de la bacterioteca del laboratorio de microbiología del CITA. Para su activación se rayó en agar estándar y se incubó a 35 °C de 16 a 24 horas antes de la realización de los ensayos con el objetivo de obtener colonias puras.

El inóculo se preparó utilizando como referencia el estándar de Mc Farland N° 2 para la obtención de una carga aproximada de $8 \log_{10}$ UFC/mL. Se siguió el procedimiento descrito por Marsik (2011), que consiste en colocar una asada del cultivo activado en 10 mL de solución salina al 0,9% y mezclarlo con ayuda de un vórtex hasta que la asada se disperse por completo. Posteriormente, se coloca el estándar al lado del inóculo contra una tarjeta blanca con líneas negras para comparar la turbidez mediante la observación de dichas líneas a través de la suspensión. En caso de que la turbidez no fuese igual en ambos tubos, se dispersan más asadas del cultivo hasta alcanzar la turbidez del estándar de Mc Farland. Finalmente, se realizó un recuento en agar Mac Conkey por el método de plateo, para determinar la carga inicial con la que se inoculó la muestra de leche cruda, para calcular posteriormente la reducción de *E. coli* después del tratamiento de sonicación.

4.3.2. Inoculación de la muestra de leche cruda

Para inocular la muestra de leche cruda se tomó como referencia el procedimiento descrito por Marsik (2011), el cual consistía en tomar una alícuota de 10,00 mL (10,00 g) del inóculo preparado y distribuirla homogéneamente mediante agitación magnética en un volumen equivalente a 240,00 g de leche cruda, para obtener una carga aproximada entre 6 y $7 \log_{10}$ UFC/g obtenida mediante cálculo matemático. La concentración inicial de *E. coli* en la muestra de leche se realizó de esta manera para minimizar costos ya que, al reducir el número de muestras a procesar, se reducen también los recursos necesarios. Con esto además se redujeron las fuentes de error en la determinación, ya que los datos provienen de una operación matemática y no de un conteo microbiológico. Dicha carga inicial se reportó bajo la unidad de medida de masa (UFC/g) debido a que el producto final (yogurt) es un semisólido y se quería mantener la uniformidad en las unidades de medición.

4.4. Sonicación de la muestra

4.4.1. Proceso de sonicación

Para los tratamientos de sonicación se utilizó el sistema mostrado en la Figura 6, propuesto por Wong (2008). Este sistema consiste en un baño de hielo (A) que permitió mantener la temperatura de la muestra de leche a $23 (\pm 2) ^\circ\text{C}$ durante cada tratamiento. La leche se colocó en un beaker (B) y se hizo recircular de manera continua con un flujo constante de 2,25 mL/s hasta la celda del sonicador utilizando una bomba peristáltica Masterflex (D). La celda es de acero inoxidable y contiene en el centro una sonda ultrasónica, o sonotrodo (H) de 13 mm de diámetro. El tiempo y la amplitud de sonicación se programaron en el controlador ultrasónico CP-750 (G). Durante los ensayos se mantuvo la muestra con agitación magnética a 260 rpm.

Cada muestra se sonicó el tiempo correspondiente a cada tratamiento con una frecuencia constante de 20 kHz, una amplitud de 40% y una entrada de energía de 50 W, correspondiente a 0,83 W/mL. Cada tratamiento se evaluó por triplicado, utilizando mangueras previamente autoclavadas; la celda y la sonda se desinfectaron con una solución de cloro con una concentración de 150 ppm. Después de la desinfección se realizaron enjuagues con agua para eliminar restos de cloro en el equipo.

4.4.2. Equipo

En la Figura 6 se muestra el diagrama del sistema de sonicación, donde se incluyen las partes del equipo y la dirección del flujo de sonicación.

En el Cuadro 5 se indican las características de los equipos utilizados en el sistema de sonicación.

Cuadro 5. Información técnica de los equipos del sistema de sonicación.

Equipo	Información técnica
Bomba peristáltica	Masterflex. Cole-Parmer Instrument Company, Vernon Hills, IL.
Controlador ultrasónico	CP-750 Cole-Parmer Instrument Company, Vernon Hills, IL.

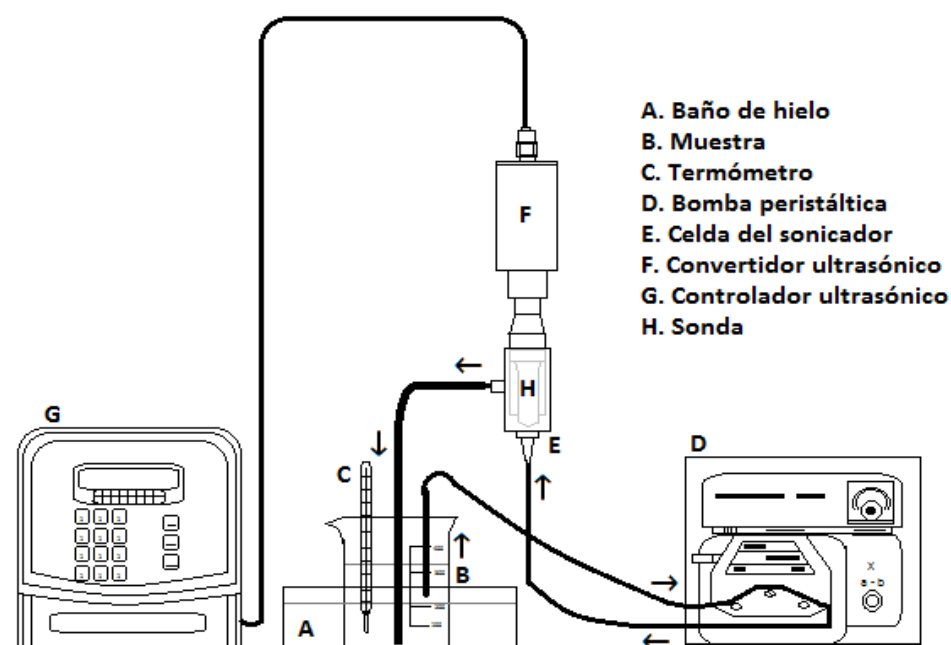


Figura 6. Diagrama del sistema continuo de sonicación (Wong, 2008).

4.5. Elaboración de yogurt griego

4.5.1. Formulación

Para la elaboración del yogurt griego que se evaluó en la investigación, se utilizó la formulación que se presenta en el Cuadro 6. La Figura 7 muestra el diagrama de flujo seguido para la elaboración de yogurt griego.

Cuadro 6. Formulación utilizada para la elaboración de yogurt griego.

Ingrediente	Porcentaje (%)
Leche	88,30
Azúcar	6,00
Estabilizante CC-729	1,20
Textrion™PROGEL 800	1,00
MPC-85%	3,50
Cultivo YoFlex®Mild 1.0	Según dosis recomendada

4.5.2. Diagrama de flujo de proceso

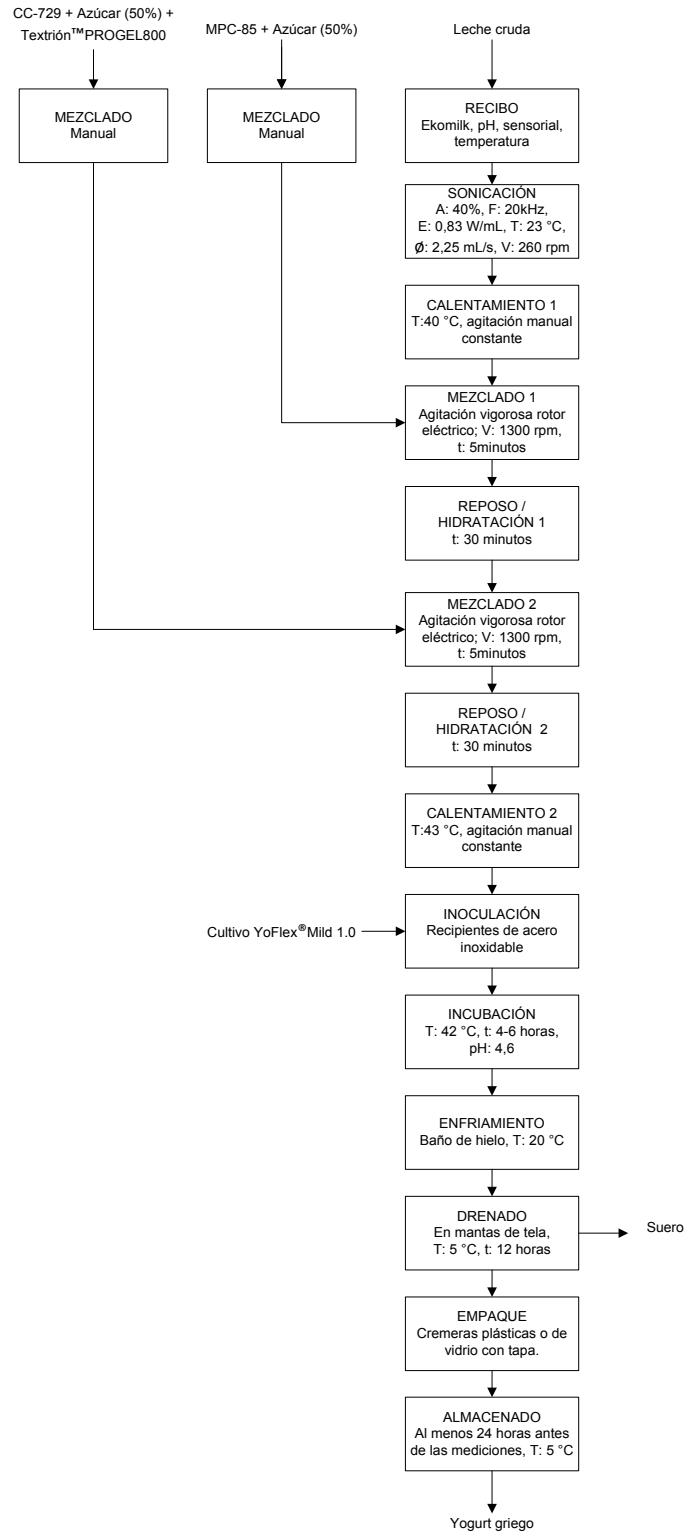


Figura 7. Diagrama de flujo para la elaboración de yogurt griego con leche sonicada.

4.5.3. Descripción de las etapas

- **Recibo de la leche:** se evaluó sensorialmente el color y olor de la leche; además se midió la temperatura de recibo con un termómetro y el pH inicial utilizando un pH-metro. Se realizó un análisis de composición con el equipo Ekomilk, el cual proporcionó los valores de contenido de grasa (%), contenido de proteína (%), sólidos totales (%), sólidos no grasos (%), densidad (g/cm^3), agua añadida (%) y punto de congelación ($^{\circ}\text{C}$).
- **Sonicación:** se operó el equipo a una amplitud de 40% con una energía de entrada de 0,83 W/mL (50 W) de potencia y una frecuencia de 20 kHz. Se llevó a cabo la sonicación del volumen de leche por el tiempo correspondiente a cada tratamiento, manteniendo la temperatura de la leche a $23 (\pm 2) ^{\circ}\text{C}$ mediante un baño de hielo, con agitación magnética a 260 rpm. El flujo volumétrico de recirculación se mantuvo constante a 2,25 mL/s.
- **Calentamiento 1:** la leche sonicada se calentó a $40 ^{\circ}\text{C}$ para facilitar la posterior disolución de los sólidos añadidos.
- **Mezclado de sólidos:** el concentrado de proteína MPC-85 se mezcló manualmente con el 50% del azúcar de la formulación para facilitar su disolución en la leche.
- **Mezclado 1:** la mezcla de MPC-85 con azúcar se adicionó lentamente y en forma de lluvia a la leche a $40 ^{\circ}\text{C}$. Para la agitación se utilizó un rotor IKA con propela mediana de 3 alas a 1300 rpm por 5 minutos hasta su completa disolución.
- **Reposo 1:** una vez disueltos los sólidos adicionados, se dejó reposar la mezcla por 30 minutos para promover su hidratación y favorecer las características de textura deseadas en el yogurt.
- **Mezclado 2:** los sólidos restantes (CC-729, Textrion™ PROGEL 800 y azúcar sobrante) se adicionaron lentamente y en forma de lluvia, agitando vigorosamente con rotor eléctrico a 1300 rpm por 5 minutos, hasta su completa disolución. En la elaboración industrial de yogurt griego, la incorporación de proteínas de suero de leche fortalece la matriz resultando en un producto más firme (Sfakianakis & Tzia, 2014).
- **Reposo 2:** una vez disueltos los sólidos adicionados, se dejó reposar la mezcla por 30 minutos más para promover la hidratación y favorecer la textura deseada.
- **Calentamiento 2:** la mezcla de leche y sólidos lácteos se calentó a $43 ^{\circ}\text{C}$, temperatura óptima para la adición del cultivo iniciador la cual promueve su crecimiento (Wu *et al.*, 2001).

- **Inoculación:** se adicionó el cultivo iniciador disolviendo los gránulos liofilizados en una pequeña porción de la leche, para favorecer la homogenización de la mezcla. Este fue el factor clave para iniciar el proceso de fermentación (Sfakianakis & Tzia, 2014).
- **Incubación:** la leche con los sólidos y el cultivo disueltos se trasvasó a un recipiente de acero inoxidable para favorecer la transmisión de calor al producto. Dicho recipiente se colocó en una incubadora a 42 °C, temperatura óptima de trabajo del cultivo, por un período de entre 4 y 6 horas, en las cuales se monitoreó cuidadosamente la acidificación del yogurt hasta un pH entre 4,6 y 4,7 (Wu *et al.*, 2001). Durante este proceso se dio la fermentación, la cual es la etapa más importante en la elaboración de yogurt pues se forma el gel y se desarrollan las características de textura y sabor (Sfakianakis & Tzia, 2014). La incubadora contenía exclusivamente los recipientes con yogurt para evitar la contaminación cruzada con otras bacterias del ambiente.
- **Enfriamiento:** la acidificación se detuvo mediante el enfriamiento a 20 °C (Wu *et al.*, 2001) mediante un baño de hielo.
- **Drenado:** el producto de la incubación se colocó en mantas de tela por un período de 12 horas a 5 °C para promover el desuerado del yogurt y la concentración de las proteínas. El yogurt se enfrió para inhibir el crecimiento y reacciones metabólicas del cultivo iniciador, así como para prevenir un incremento indeseado de la acidez (Sfakianakis & Tzia, 2014; Lee & Lucey, 2010).
- **Empaque:** el yogurt desuerado se colocó ya fuera en cremeras plásticas o recipientes de vidrio con tapa.
- **Almacenamiento:** una vez envasado, el yogurt obtenido se almacenó en refrigeración a 5 °C por 24 horas, con el objetivo de dejar reposar el producto y que se estabilicen las características físicas antes de realizar las mediciones correspondientes.

4.6. Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre la reducción de *Escherichia coli* en la elaboración de yogurt griego

4.6.1. Diseño Experimental

Se aplicó un diseño de bloques al azar con el tiempo de sonicación (0, 15, 30, 45 y 60 minutos) como factor continuo para evaluar su efecto sobre la variable respuesta reducción logarítmica de *E. coli*. Se realizaron tres repeticiones independientes con tres lotes de leche. Cada bloque se conformó por cada uno de los tres lotes de leche.

4.6.2. Procedimiento

Para realizar la prueba se sonicó la leche cruda según se describe en la sección 4.4 para cada tiempo de sonicación a evaluar y se elaboró yogurt griego siguiendo el procedimiento detallado en la sección 4.5. Para la realización de los recuentos y determinación de la reducción de *E. coli* se tomó como referencia el método de análisis P-SA-MM-001 para recuento de mesófilos aerobios por plateo (CITA, 2014 b) adaptado a agar Mac Conkey como medio selectivo, cuyo procedimiento se describe en la sección 4.15.1.

4.6.3. Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico JMP 7.0. Para analizar los resultados se realizó un análisis de regresión lineal simple por el método de mínimos cuadrados tomando el tiempo de sonicación como factor continuo, con el objetivo de determinar la tendencia del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre la variable respuesta reducción logarítmica de *E. coli*. Mediante un análisis de varianza (ANDEVA) se evaluó la significancia. Se trabajó con un nivel de significancia del 5%. Para el efecto significativo se reportó la probabilidad asociada (p).

4.7. Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre la textura del yogurt griego

4.7.1. Diseño experimental

Se aplicó un diseño de bloques al azar con el tiempo de sonicación (0, 15, 30, 45 y 60 minutos) como factor continuo para evaluar su efecto sobre la variable respuesta textura, correspondiente a los parámetros de firmeza, cohesividad, consistencia e índice de viscosidad. Se realizaron tres repeticiones independientes con tres lotes de leche. Cada bloque se conformó por cada uno de los tres lotes de leche. Para cada repetición se realizaron pruebas por triplicado debido al volumen de yogurt disponible, tomando como referencia el procedimiento empleado por Akalin *et al.* (2012).

4.7.2. Procedimiento

Para la determinación de la textura del yogurt griego elaborado con leche sonicada, se realizó la comparación de la consistencia del producto resultante con cada tratamiento, ya que ésta es la propiedad de textura que poseen los lácteos que se refiere a la firmeza, cohesividad y viscosidad de un líquido o fluido semisólido (Exponent, 2012).

Para realizar la prueba se sonicó la leche cruda según se describe en la sección 4.4 para cada tiempo de sonicación a evaluar y se elaboró yogurt griego siguiendo el procedimiento detallado en la sección 4.5. Para la medición de textura se utilizó el texturómetro TA.XT Plus del laboratorio de química de la Escuela de Tecnología de Alimentos. Se siguió el método planteado por el software del instrumento, detallado en la sección 4.15.2 y se utilizaron los parámetros de ajuste que se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Parámetros de ajuste utilizados en el texturómetro TA.XT Plus para la medición de textura de yogurt griego.

Parámetro de ajuste	Medida utilizada
Accesorio	Back Extrusion Cell (A/BE) con disco de 35,00 mm y barra de extensión usando una celda de carga de 5,0 kg.
Modalidad	Medida de la fuerza en compresión
Opción de acciones	Regreso a la posición inicial
Velocidad antes de la prueba	1,0 mm/s
Velocidad de la prueba	1,0 mm/s
Velocidad posterior a la prueba	10,0 mm/s
Distancia	30,0 mm
Tipo de disparo	Automático – 10,0 g
Tarado	Automático
Velocidad de adquisición de datos	400 pps

4.7.3. Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico JMP 7.0. Para analizar los resultados se realizó un análisis de regresión lineal simple por el método de mínimos cuadrados tomando el tiempo de sonicación como factor continuo, con el objetivo de determinar la tendencia del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre cada variable respuesta: firmeza, cohesividad, consistencia e índice de viscosidad. Mediante un análisis de varianza (ANDEVA) se evaluó la significancia. Se trabajó con un nivel de significancia del 5%. Para los efectos no significativos se reportó la potencia de prueba ($1-\beta$).

4.8. Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre el índice de sinéresis del yogurt griego

4.8.1. Diseño experimental

Se aplicó un diseño de bloques al azar con el tiempo de sonicación (0, 15, 30, 45 y 60 minutos) como factor continuo para evaluar su efecto sobre la variable respuesta índice de sinéresis. Se realizaron tres repeticiones independientes con tres lotes de leche. Cada bloque se conformó por cada uno de los tres lotes de leche. En cada repetición, las mediciones del índice de sinéresis se realizaron por duplicado para cada tratamiento, tomando como referencia el procedimiento empleado por Akalin *et al.* (2012).

4.8.2. Procedimiento

El índice de sinéresis se refiere a los gramos de suero drenado por kilogramo de yogurt. Para realizar la prueba se sonicó la leche cruda según se describe en la sección 4.4 para cada tiempo de sonicación y se elaboró yogurt griego siguiendo el procedimiento detallado en la sección 4.5. El índice de sinéresis se calculó tomando como referencia el método descrito por Akalin *et al.* (2012), el cual se detalla en la sección 4.15.3.

4.8.3. Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico JMP 7.0. Para analizar los resultados se realizó un análisis de regresión lineal simple por el método de mínimos cuadrados tomando el tiempo de sonicación como factor continuo, con el objetivo de determinar la tendencia del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre la variable respuesta índice de sinéresis. Mediante un análisis de varianza (ANDEVA) se evaluó la significancia. Se trabajó con un nivel de significancia del 5%. Para los efectos no significativos se reportó la potencia de prueba (1- β).

4.9. Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre la capacidad de retención de agua del yogurt griego

4.9.1. Diseño experimental

Se aplicó un diseño de bloques al azar con el tiempo de sonicación (0, 15, 30, 45 y 60 minutos) como factor continuo para evaluar su efecto sobre la variable respuesta capacidad de retención de agua. Se realizaron tres repeticiones independientes con tres lotes de leche. Cada bloque se

conformó por cada uno de los tres lotes de leche. En cada repetición, las mediciones de la capacidad de retención de agua se realizaron por duplicado para cada tratamiento, tomando como referencia el procedimiento empleado por Akalin *et al.* (2012).

4.9.2. Procedimiento

Para realizar la prueba se sonicó la leche cruda según se describe en la sección 4.4 para cada tiempo de sonicación y se elaboró yogurt griego siguiendo el procedimiento detallado en la sección 4.5. Seguidamente se procedió a determinar la capacidad de retención de agua siguiendo el procedimiento descrito por Akalin *et al.* (2012), el cual es una adaptación al de Remeuf *et al.* (2003), según se detalla en la sección 4.15.4.

4.9.3. Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico JMP 7.0. Para analizar los resultados se realizó un análisis de regresión lineal simple por el método de mínimos cuadrados tomando el tiempo de sonicación como factor continuo, con el objetivo de determinar la tendencia del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre la variable respuesta capacidad de retención de agua. Mediante un análisis de varianza (ANDEVA) se evaluó la significancia. Se trabajó con un nivel de significancia del 5%. Para los efectos no significativos se reportó la potencia de prueba ($1-\beta$).

4.10. Determinación del efecto del tiempo de sonicación de la leche cruda sobre el color del yogurt griego y el suero exudado

4.10.1. Diseño experimental

Se aplicó un diseño de bloques al azar con el tiempo de sonicación (0, 15, 30, 45 y 60 minutos) como factor continuo para evaluar su efecto sobre la variable respuesta cambio de color (ΔE). Se realizaron tres repeticiones independientes con tres lotes de leche. Cada bloque se conformó por cada uno de los tres lotes de leche. En cada repetición, las mediciones del color se realizaron por triplicado para cada tratamiento.

4.10.2. Procedimiento

Para realizar la prueba se sonicó la leche cruda según se describe en la sección 4.4 para cada tiempo de sonicación y se elaboró yogurt griego siguiendo el procedimiento detallado en la sección 4.5. Seguidamente se procedió a medir los parámetros de color L^* , a^* y b^* tanto para yogurt como para suero exudado en la elaboración, empleando un colorímetro Hunter Lab Colour

Flex con la escala CIELab, del Laboratorio de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos de la UCR. El equipo utiliza una lámpara D₆₅ con un ángulo de observación de 10° y uno de incidencia de 45°. Se calculó la diferencia total de color (o cambio de color ΔE) empleando la Fórmula 1 y utilizando como referencia el color del yogurt control (sin tratamiento de sonicación, t=0 min).

$$\Delta E = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2} \quad (1)$$

4.10.3. Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico JMP 7.0. Para analizar los resultados se realizó un análisis de regresión lineal simple por el método de mínimos cuadrados tomando el tiempo de sonicación como factor continuo, con el objetivo de determinar la tendencia del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre la variable respuesta cambio de color (ΔE) tanto para yogurt como para suero exudado, debido a observaciones experimentales previas y la posibilidad de aprovechamiento posterior del suero. Mediante un análisis de varianza (ANDEVA) se evaluó la significancia. Se trabajó con un nivel de significancia del 5%. Para los efectos no significativos se reportó la potencia de prueba (1- β).

4.11. Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre el rendimiento de elaboración de yogurt griego

4.11.1. Diseño experimental

Se aplicó un diseño de bloques al azar con el tiempo de sonicación (0, 15, 30, 45 y 60 minutos) como factor continuo para evaluar su efecto sobre la variable respuesta rendimiento de elaboración. Se realizaron tres repeticiones independientes con tres lotes de leche. Cada bloque se conformó por cada uno de los tres lotes de leche. En la determinación del rendimiento de elaboración, cada repetición se contó como una única réplica de la determinación debido a la cantidad de leche sonicada disponible.

4.11.2. Procedimiento

Para la determinación del porcentaje del rendimiento se midió la masa de la mixtura inicial para la preparación de yogurt (leche, azúcar, estabilizante, proteínas y cultivo) y la masa de producto final obtenido según los procedimientos descritos en las secciones 4.4 y 4.5. Las mediciones de dichas masas se realizaron con la balanza granataria disponible en el laboratorio. Posteriormente, se calculó el porcentaje de rendimiento como se indica en la Fórmula 2.

$$\text{Porcentaje de rendimiento (\%)} = \frac{\text{Masa de yogurt obtenido (g)}}{\text{Masa de mixtura inicial (g)}} \times 100 \quad (2)$$

4.11.3. Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico JMP 7.0. Para analizar los resultados se realizó un análisis de regresión lineal simple por el método de mínimos cuadrados tomando el tiempo de sonicación como factor continuo, con el objetivo de determinar la tendencia del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre la variable respuesta rendimiento de elaboración. Mediante un análisis de varianza (ANDEVA) se evaluó la significancia. Se trabajó con un nivel de significancia del 5%. Para los efectos no significativos se reportó la potencia de prueba (1-β).

4.12. Determinación del efecto del tiempo de sonicación sobre el tiempo de fermentación del yogurt griego

4.12.1. Determinación preliminar del tiempo requerido para la acidificación en la elaboración de yogurt griego a partir de leche cruda sonicada

Se realizó una prueba preliminar utilizando el valor extremo de tiempo de sonicación propuesto (60 minutos) con el fin de determinar el tiempo que tarda el producto en alcanzar un valor de pH igual a 4,6. Con esa información, posteriormente se definieron los intervalos de tiempo en los que se mediría dicho parámetro para elaborar las curvas de acidificación del tercer objetivo específico.

Para la realización de la prueba preliminar se utilizaron las materias primas descritas en la sección 4.2 de este documento y se siguieron los procedimientos de sonicación y elaboración de yogurt griego que se describen en las secciones 4.4 y 4.5 respectivamente.

En el Cuadro 8 se muestra un resumen del objetivo, las variables de estudio y los resultados de la prueba preliminar realizada.

Cuadro 8. Descripción del objetivo, variables de estudio y resultados de la prueba preliminar.

Objetivo	Variables de estudio	Resultado
Determinar el tiempo que tarda el producto en alcanzar pH igual a 4,6 para definir los intervalos de medición de pH para las curvas de acidificación.	<i>Independiente:</i> - Tiempo de sonicación: 60 minutos. <i>Respuesta:</i> - Tiempo de acidificación hasta pH igual a 4,6. - Evaluación sensorial informal del yogurt griego obtenido.	El producto tarda alrededor de 5 horas en alcanzar un pH igual a 4,62. Se obtiene un yogurt griego de apariencia agradable, olor ácido y textura viscosa, características similares a productos de este tipo.

4.12.2. Diseño experimental

Se aplicó un diseño de bloques al azar con el tiempo de sonicación (0, 15, 30, 45 y 60 minutos) como factor continuo para evaluar su efecto sobre la variable respuesta tiempo de fermentación. Se realizaron tres repeticiones independientes con tres lotes de leche. Cada bloque se conformó por cada uno de los tres lotes de leche. En la determinación del tiempo de gelificación, cada repetición se contó como una única réplica de la determinación debido a la cantidad de leche sonicada disponible.

4.12.3. Procedimiento

Para evaluar si el tiempo de sonicación de leche cruda ejerce algún efecto sobre el tiempo de fermentación y la consecuente formación del gel en la elaboración de yogurt griego, se graficaron curvas de acidificación con cada tratamiento. Para realizar la prueba, se sonicó la leche cruda según se describe en la sección 4.4 para cada tiempo de sonicación y se elaboró yogurt griego siguiendo el procedimiento detallado en la sección 4.5. Para esta prueba se tomó en cuenta las siguientes consideraciones:

- a) El yogurt se colocó en recipientes metálicos de acero inoxidable para favorecer la transferencia de calor desde el ambiente de la incubadora hacia el producto, logrando la temperatura óptima de trabajo del cultivo láctico utilizado de manera más eficiente.
- b) Basado en los resultados obtenidos en la prueba preliminar que se detalla en la sección 4.12.1, las mediciones de pH de yogurt se realizaron de la siguiente manera:
 - a. Una medición de pH inicial al momento de iniciar la incubación en el tiempo cero.
 - b. Mediciones de pH cada 15 minutos durante la primera hora.

- c. Mediciones de pH cada media hora durante las tres horas siguientes.
 - d. Mediciones de pH cada 15 minutos durante la última hora de incubación, o hasta alcanzar pH = 4,6.
- c) Se elaboró una curva de acidificación para cada uno de los cinco tiempos de sonicación por repetición, graficando el tiempo de fermentación contra el valor de pH obtenido en cada medición. Posteriormente, se determinó la tendencia del efecto del tiempo de sonicación sobre el tiempo de gelificación de yogurt griego.
- d) Los valores de pH se determinaron siguiendo el método de análisis P-SA-MQ-012, el cual está basado en el método AOAC 981.12 (AOAC, 2005; CITA, 2014 a).

4.12.4. Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico JMP 7.0. Para analizar los resultados se realizó un análisis de regresión lineal simple por el método de mínimos cuadrados tomando el tiempo de sonicación como factor continuo, con el objetivo de determinar la tendencia del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre la variable respuesta tiempo de fermentación (tiempo en el que se alcanza el valor de pH igual a 4,6). Mediante un análisis de varianza (ANDEVA) se evaluó la significancia. Se trabajó con un nivel de significancia del 5%. Para los efectos no significativos se reportó la potencia de prueba ($1-\beta$).

4.13. Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche sobre el agrado general del consumidor hacia el yogurt griego

4.13.1. Diseño experimental

Para el experimento se realizó una prueba de aceptación general con consumidores de yogurt griego con el tiempo de sonicación (0, 15, 30, 45 y 60 minutos) como factor continuo para evaluar su efecto sobre el agrado general del consumidor como variable respuesta. La misma se llevó a cabo con dos lotes de leche de dos días consecutivos. Debido a la capacidad del equipo de ultrasonido (únicamente 250 mL por *batch*), para facilitar la preparación de las muestras de yogurt griego a partir de leche cruda sonicada, la aplicación de los tratamientos y la elaboración del yogurt se realizó en dos días continuos, hasta obtener la cantidad de leche sonicada necesaria para cubrir las necesidades del panel (aproximadamente 10 g de yogurt por tratamiento para cada panelista). Cada tratamiento se dejó reposar por al menos 24 horas en refrigeración antes de iniciar la prueba sensorial.

4.13.2. Procedimiento

Para realizar la prueba se sonicó la leche cruda según se describe en la sección 4.4 para cada tiempo de sonicación a evaluar, en un número de tandas (*batches*) por tratamiento que permitiera suplir las necesidades del panel, según lo descrito en el punto anterior. El yogurt griego se elaboró siguiendo el procedimiento detallado en la sección 4.5 con la importante variación de, al momento de recibir la leche, se le aplicó una pasteurización a 63 °C por 30 minutos, ya que era fundamental garantizar la inocuidad al tratarse de un producto para consumo humano, pero sin permitir un efecto considerable debido al calor.

Para la prueba sensorial se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones:

- a) El estudio se realizó con un total de 100 jueces consumidores de yogurt griego, seleccionados al azar, quienes evaluaron de forma individual el nivel de agrado de las muestras ofrecidas.
- b) Se evaluó el agrado general hacia el producto elaborado con leche tratada a diferentes tiempos de sonicación (15, 30, 45 y 60 minutos) por comparación contra el agrado general hacia un producto sin tratamiento de ultrasonido, simulando un yogurt griego convencional como los disponibles en el mercado. Para ello se siguió el procedimiento que se describe en la sección 4.15.6.

4.13.3. Análisis estadístico

A los resultados obtenidos en las pruebas de agrado general se les aplicó un análisis de conglomerados (*Clusters*) utilizando distancias euclidianas y el método de Ward, el cual generó dendogramas que mostraron la agrupación de los consumidores por similitudes en cuanto a agrado. A estos conglomerados, se les aplicó un análisis de varianza (ANDEVA) utilizando un nivel de significancia (α) del 5% para determinar si los panelistas presentaban diferencias significativas en el agrado hacia las muestras. Con los datos de cada conglomerado se realizó una comparación de medias de Fisher LSD, lo cual permitió determinar si entre los tratamientos existían diferencias significativas (Morera, 2014). Se utilizó el paquete estadístico XL STAT 2017. Se trabajó con un nivel de significancia del 5%.

4.14. Observación del efecto del tiempo de sonicación sobre la distribución del tamaño de partícula de los glóbulos de grasa de la leche y el yogurt griego

4.14.1. Diseño experimental

Se tomó el tiempo de sonicación (0, 15, 30, 45 y 60 minutos) como factor continuo para observar de manera exploratoria su efecto sobre las curvas de distribución del tamaño de partícula de los glóbulos de grasa y su microestructura, tanto para la leche cruda como para el yogurt griego. Para la prueba se realizó una única repetición con un lote de leche cruda para elaborar yogurt y otro lote para las mediciones de leche.

4.14.2. Procedimiento

4.14.2.1. Distribución de tamaño de partícula

Es posible calcular la distribución del tamaño de partícula de los glóbulos de grasa de la leche y el yogurt al modelar la leche adecuadamente como una colección de glóbulos de grasa más o menos esféricos en una disolución de agua, proteínas y azúcares, conociendo las propiedades físicas de estos ingredientes constituyentes (Dukhin *et al.*, 2005).

Para realizar la prueba se sonicó la leche cruda según se describe en la sección 4.4 para cada tiempo de sonicación a evaluar y se elaboró yogurt griego siguiendo el procedimiento detallado en la sección 4.5. Al día siguiente se sonicó un segundo lote de leche cruda (según sección 4.4 para cada tiempo de sonicación) para así obtener muestras sonicadas tanto de leche como de yogurt griego. Ese mismo día se realizaron las mediciones de la distribución de tamaño de partícula utilizando el equipo de dispersión de luz láser Horiba LA-300 del Departamento de Concretos del LANAMME.

Se siguió el procedimiento planteado por el software del instrumento, tomando también como referencia el seguido por Cortés-Muñoz *et al.* (2009), el cual se detalla en la sección 4.14.7.

4.14.2.2. Microscopía óptica

Para realizar la prueba se sonicó la leche cruda según se describe en la sección 4.4 para cada tiempo de sonicación a evaluar y se elaboró yogurt griego siguiendo el procedimiento detallado en la sección 4.5. Se sonicó además un segundo lote de leche cruda (según sección 4.4 para cada tiempo de sonicación) para así obtener muestras sonicadas tanto de leche como de yogurt griego. Se depositó una gota de cada una de las muestras en vidrios de dispersión para ser observadas en un microscopio de fluorescencia marca Olympus modelo BX42, con un objetivo de 100x. Las micrografías se tomaron con la cámara digital Olympus DP72 incorporada al microscopio del Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica. El sistema de documentación utilizado por el equipo fue el software DP2-BSW.

4.14.3. Análisis de datos

La exploración del efecto del ultrasonido en la distribución del tamaño de partícula de los glóbulos de grasa de la leche cruda, sonicada y del yogurt griego obtenido, se realizó mediante la caracterización con curvas de distribución de frecuencia (%) vs diámetro de partícula de grasa, las cuales se estudiaron y contrastaron entre sí para hallar diferencias y similitudes, así como para proponer explicaciones hipotéticas a los efectos observados y relacionarlas con las micrografías.

4.15. Métodos de análisis

4.15.1. Recuento de *Escherichia coli*

Se utilizó el método para Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos AOAC *Official Method* 966.23.C (AOAC, 2005) siguiendo como referencia el método interno del Laboratorio de Microbiología del CITA (código P-SA-MM-001) para recuento de mesófilos aerobios por plating (CITA, 2014 b), adaptado con agar Mac Conkey como medio selectivo para *Escherichia coli*. El procedimiento realizado se detalla a continuación:

- a) Se preparó el inóculo de *E. coli* siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.3. Para conocer la carga inicial con la que se inoculó la muestra de leche, se realizaron diluciones decimales del inóculo hasta 10^{-9} , tomando 1 mL de este y llevándolo a 9 mL de agua peptonada estéril al 0,1%. Para las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} se montaron placas por vaciado en agar Mac Conkey y se incubaron a 35 °C por 48 horas. Se

contaron las colonias típicas de *E. coli*, de coloración rosada o rojiza, y se expresó el recuento como $\log_{10}\text{UFC/mL}$.

- b) Se mezcló el equivalente a 240 g de leche cruda con 10 mL del inóculo preparado. La carga inicial de *E. coli* en la leche se obtuvo mediante cálculo matemático para reducir el número de muestras a procesar y minimizar costos, además de disminuir las fuentes de error en la determinación al provenir de una operación matemática y no de un conteo microbiológico.
- c) Se sonicó la muestra por el tiempo correspondiente a cada tratamiento según el procedimiento descrito en la sección 4.4 para la posterior elaboración del yogurt griego según se detalla en la sección 4.5.
- d) Se colocaron 25 g de yogurt en una bolsa de Stomacher y se les agregó 225 mL de agua peptonada estéril al 0,1%. Después de la homogenización en el Stomacher, se realizaron diluciones decimales de la muestra hasta 10^{-8} para el recuento final, montado en placas por vaciado en agar Mac Conkey que se incubaron a 35 °C por 48 horas. Se contaron las colonias típicas de *E. coli*, de coloración rosada o rojiza, expresando el recuento como $\log_{10}\text{UFC/g}$.
- e) La reducción logarítmica se calculó como se indica en la Fórmula 3.

$$\text{Reducción}_{\log}(\text{UFC/g}) = \log_{\text{recuento inicial en leche}} - \log_{\text{recuento final en yogurt}} \quad (3)$$

4.15.2. Medición de textura

Para la medición de textura se utilizó el texturómetro TA.XT Plus del laboratorio de química de la Escuela de Tecnología de Alimentos. Se siguió el procedimiento planteado por el software del instrumento, el cual se detalla a continuación, con los parámetros de ajuste mostrados en el Cuadro 7.

- a) Para preparar el equipo se colocó en la base la placa básica de posición sin atornillar. Con el brazo del instrumento en la posición más alta, se colocó el adaptador de la sonda de alta resistencia en el soporte de celdas de carga. El disco de compresión de 35,00 mm se atornilló al adaptador. Se colocó un contenedor de muestra vacío en la placa básica de posición para después, muy despacio, bajar el brazo del instrumento hasta que el disco entrara en el contenedor de la muestra vigilando que no se rocen

entre sí para evitar daños. Una vez que el disco entró en el contenedor, se aseguraron los tornillos de la placa básica de posición para optimizar la centralización del disco en el contenedor. Finalmente se calibró el equipo antes de iniciar con las pruebas experimentales.

- b) Una vez listo el equipo, se procedió a realizar las pruebas de medición de textura del yogurt griego por triplicado. Para ello, las muestras se mantuvieron en refrigeración a 5 °C y se extrajeron del refrigerador justo antes del experimento para asegurar homogeneidad de condiciones y evitar desviación de los resultados por el factor de temperatura. Las muestras se vertieron en el recipiente contenedor hasta un 75% de su capacidad. Una vez dispuesto el recipiente en la placa base, se corrió la prueba.
- c) El programa del instrumento generó gráficos, los cuales proporcionaron los resultados de interés. El punto más alto de la curva se tomó como medida de la firmeza (fuerza máxima); a valores mayores, más firme la muestra. El área bajo la curva se tomó como medida de la consistencia del yogurt; del mismo modo, a mayores valores del área, más espeso el producto. La región negativa del gráfico, producida durante el retorno de la sonda a su posición original, es el resultado del peso de la muestra, la cual se elevó principalmente en la superficie superior del disco en su retorno, proporcionando una medida de la resistencia a fluir; así la máxima fuerza negativa fue indicador de la cohesividad de la muestra; a mayor fuerza negativa, más cohesivo el yogurt. Por último, la región negativa de la curva hizo referencia al trabajo de cohesión, por lo que entre más alto fue el valor, mayor resistencia a fluir y por lo tanto se refería a una muestra más viscosa (Exponent, 2012).

4.15.3. Índice de sinéresis

El índice de sinéresis se calculó tomando como referencia el método descrito por Akalin *et al.* (2012), el cual se detalla a continuación:

- a) Utilizando una cuchara para servir helado (de forma semiesférica) se tomó una porción de yogurt. El excedente se removió con el reverso plano de un cuchillo, de manera que se obtuviera una muestra semiesférica.

- b) Con su lado plano hacia abajo, la muestra se colocó sobre un tamiz con abertura de malla conocida. Como tamiz se utilizó una tela sintética para queso. La masa de la muestra se midió con una balanza.
- c) La muestra se dejó en reposo por un período de 3 horas a 15 °C para acelerar el fenómeno de sinéresis. Posteriormente, se midió la masa de suero exudado en una balanza.
- d) El índice de sinéresis se reportó como porcentaje.

4.15.4. Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua se determinó siguiendo el procedimiento descrito por Akalin *et al.* (2012), el cual es una adaptación al de Remeuf *et al.* (2003). La metodología seguida se describe a continuación:

- a) Se tomó una muestra de 20 g de yogurt griego, medido en balanza analítica, y se colocó en un tubo para centrífuga. La muestra de yogurt griego se centrifugó por 10 minutos a 5,000 x g a 20 °C.
- b) El suero expulsado por la muestra después de la centrifugación se trasvasó a un beaker para medir su masa en balanza analítica.
- c) La capacidad de retención de agua se calculó como se indica en la Fórmula 4.

$$\text{Capacidad de retención de agua (\%)} = \frac{\text{Yogurt entero (g)} - \text{Suero exudado (g)}}{\text{Yogurt entero (g)}} \times 100 \quad (4)$$

4.15.5. Medición de pH

Los valores de pH se determinaron en todo momento siguiendo el método de análisis AOAC *Official Method* 981.12 (AOAC, 2005) siguiendo como referencia el método interno P-SA-MQ-012 empleado por el Laboratorio de Química del CITA (CITA, 2014 a).

4.15.6. Agrado general del consumidor

Se evaluó el agrado general hacia el producto elaborado con leche tratada con diferentes tiempos de sonicación (15, 30, 45 y 60 minutos) para compararlo contra el agrado general

de un producto sin tratamiento de sonicación, simulando un yogurt griego convencional como los disponibles en el mercado. Para ello se siguió la siguiente metodología:

- a) Se presentó a los jueces de manera aleatoria cinco muestras de aproximadamente 10 g de yogurt griego a temperatura de refrigeración, en recipientes plásticos individuales, correspondientes a los cuatro tiempos de sonicación a evaluar más la muestra control sin sonicación, lo que permitió detectar diferencias en el gusto de los consumidores hacia los productos (Arguedas, 2010).
- b) Cada recipiente se codificó con un número de tres dígitos asignado de forma aleatoria. A los panelistas se les sirvió las cinco muestras colocadas aleatoriamente en bandejas plásticas, y se les solicitó indicar el agrado por cada una en el orden asignado (Araya, 2013), expectorando con agua entre cada degustación. A los jueces no se les mencionó ninguna información sobre las muestras de yogurt (Lawless & Heymann, 1999).
- c) Se utilizó una escala híbrida lineal de nueve puntos anclada en los extremos y en el medio con las frases “me disgusta muchísimo”, “ni me gusta ni me disgusta” y “me gusta muchísimo”, de izquierda a derecha respectivamente, sobre la cual el panelista indicó el agrado hacia la muestra trazando una línea horizontal (Villanueva *et al.*, 2005).
- d) A cada juez se le solicitó información personal (género, edad, profesión, frecuencia de consumo de yogurt) con el propósito de caracterizar a los panelistas para el posterior análisis de los resultados (Villanueva *et al.*, 2005).

4.15.7. Distribución del tamaño de partícula de los glóbulos de grasa

Se siguió el procedimiento planteado por el software del instrumento, tomando también como referencia el seguido por Cortés-Muñoz *et al.* (2009), el cual se detalla a continuación con los parámetros de ajuste (Horiba, 2004) enlistados en el Cuadro 9.

La distribución del tamaño de partícula de los glóbulos de grasa se determinó con un analizador de distribución de tamaño de partícula por el fenómeno de dispersión de luz láser usando el equipo Horiba LA-300 con $\lambda=650$ nm. La distribución del tamaño de partícula se caracterizó mediante curvas de distribución en frecuencia (%) vs diámetro de partícula.

Las mediciones se desarrollaron a temperatura ambiente (23 ± 2 °C). El equipo se cargó con agua desionizada y se dejó alcanzar el 100% de transmitancia. La muestra se diluyó a 1/10 (v/v) en agua desionizada y agitó con cuidado para su uniformidad y posteriormente se agregó por goteo en el tanque con agua hasta reportar 80 – 90% de transmitancia. El equipo una vez que ejecutó la medición, expuso las curvas de distribución de tamaño de partícula.

Cuadro 9. Parámetros de ajuste utilizados en el equipo de dispersión láser Horiba LA-300 para la exploración de la distribución del tamaño de partícula de los glóbulos de grasa en leche y yogurt griego.

Parámetro	Medida utilizada
Índice de refracción de grasa láctea	1,52
Índice de refracción de leche en agua	1,14
Fluido dispersante	Agua desionizada
Velocidad de la bomba	2 – 3
Frecuencia del equipo	650 nm

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre la reducción de *Escherichia coli* en la elaboración de yogurt griego

Para evaluar el efecto de la sonicación de leche cruda sobre la reducción de *E. coli*, se realizaron recuentos del microorganismo tanto a la leche cruda inoculada como al yogurt griego obtenido después del proceso detallado en la sección 4.5. En la Figura 8 se presenta el comportamiento resultante para la reducción logarítmica promedio según el tiempo de sonicación aplicado.

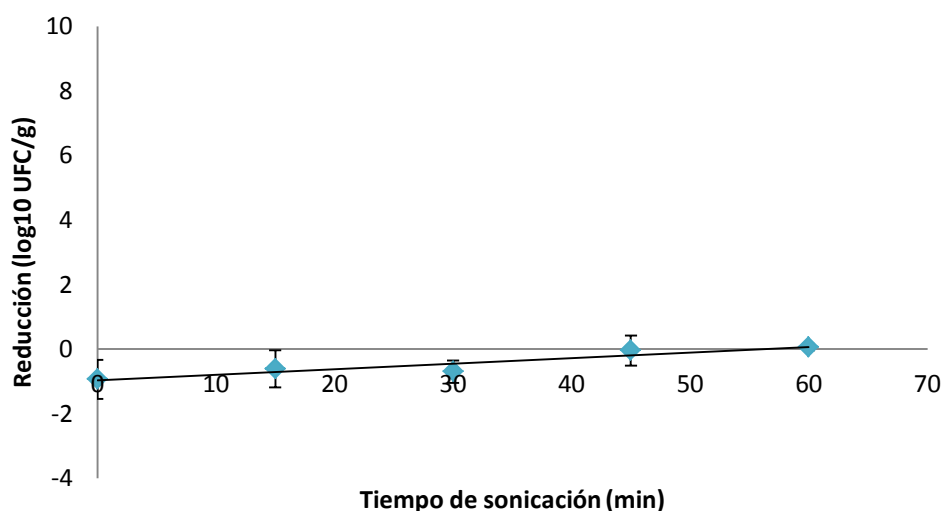


Figura 8. Reducción logarítmica promedio de *E. coli* en yogurt griego en función del tiempo de sonicación de la leche empleada para su elaboración.

Estadísticamente los resultados obtenidos exponen que conforme aumenta el tiempo de sonicación, la reducción logarítmica promedio de *E. coli* también aumenta de forma significativa ($p=0,0015$). Se presumía un comportamiento similar, aunque más marcado ya que han sido ampliamente reportados los efectos positivos del ultrasonido para inactivar microorganismos.

Por ejemplo, Piyasena *et al.*, (2003), D'Amico (2006), Bermúdez & Barbosa (2011) y Tiwari & Mason (2012) son algunos autores que reportan reducciones bacterianas atribuidas al fenómeno de cavitación, ya que su mecanismo causa daño en la membrana celular de la bacteria por acción de las fuerzas de cizalla, cambios de presión y ataques químicos de radicales libres de peróxido.

Pese a lo anterior, al analizar las reducciones obtenidas y mostradas en el Cuadro 10, se tiene que, considerando los intervalos de confianza, la mayor reducción promedio de *E. coli* alcanzada en el yogurt griego fue de 0,4 log₁₀ UFC/g. Estos resultados permiten suponer que si bajo las condiciones utilizadas no fue posible reducir ni 1 log de un microorganismo indicador, la sonicación por sí sola tampoco será capaz de lograr la reducción del microorganismo de referencia para la pasteurización de leche.

Cuadro 10. Reducción logarítmica promedio de *E. coli* en yogurt griego en función del tiempo de sonicación de la leche cruda usada para su elaboración.

Tiempo de sonicación (min)	Reducción (log ₁₀ UFC/g) ¹
0	-0,9 ± 0,6
15	-0,6 ± 0,6
30	-0,7 ± 0,3
45	-0,1 ± 0,5
60	0,1 ± 0,1

¹El promedio y los límites de confianza se calcularon con los resultados correspondientes a las tres repeticiones de elaboración de yogurt griego para cada tratamiento.

Como se ha reportado en la literatura, el ultrasonido provoca un debilitamiento de las células bacterianas debido a las burbujas violentas producto de la cavitación. Conforme aumenta el tiempo de sonicación también aumenta el daño provocado en las células. Lo anterior podría explicar que en el tratamiento control y los de menor tiempo de exposición a las ondas sónicas, las bacterias sufrieran menor daño al estar expuestas a la cavitación por un menor lapso, por lo que se presume que les podría permitir incluso reproducirse al contar con una matriz nutritiva, resultando en un equilibrio vida-muerte.

Esto se presume pues, a pesar de que la habilidad del ultrasonido para estimular actividades biológicas ha recibido poca atención, Tiwari & Mason (2012) reportan que se ha detectado que el ultrasonido puede provocar un impacto estimulador debido al aumento de la permeabilidad de la membrana celular y mayores tasas de transferencia de nutrientes. Esto deja espacio para que no se descarte la posibilidad de que las células de *E. coli* logren reponerse debido al fenómeno descrito.

Para combatir este efecto y obtener los resultados esperados de reducción, Chandrapala *et al.* (2012) recomiendan la utilización de manotermosonicación en productos lácteos donde además se deben eliminar enzimas termorresistentes, ya que los daños que el método causa a la célula son irreversibles debido a la intensa vibración y cavitación, causando movimientos violentos.

Otras reducciones inferiores a 5 logaritmos han sido observadas en estudios previos de sonicación a temperaturas por debajo de 50 °C. Herceg *et al.* (2012) por ejemplo, evaluaron el efecto de la sonicación sobre *E. coli* en leche cruda con 4% de grasa, manteniendo la muestra a 20 °C y utilizando una frecuencia de 20 kHz. La máxima reducción alcanzada fue de 2,49 log₁₀ UFC/mL al sonicar la muestra 12 minutos. Es válido mencionar que pese a que las condiciones de aplicación descritas son similares a las utilizadas para la presente investigación, el estudio de Herceg *et al.* (2012) se refiere a leche fluida, la cual no requiere las etapas de reposo a 40°C como sí lo necesita el yogurt, por lo que la reducción para los autores fue mayor.

El hallazgo de Herceg *et al.* (2012) apoya las observaciones de Tiwari & Mason (2012), quienes atribuyen un efecto protector de la grasa sobre los microorganismos, otorgando una mayor resistencia a la sonicación. Arroyo *et al.* (2011) observaron que para *Listeria innocua* y *Salmonella*, la reducción logarítmica es hasta dos unidades menor al sonicar la leche de alto contenido graso. Esto sustenta la escasa reducción obtenida en el yogurt, ya que la leche utilizada era entera con un contenido de grasa cercano al 3%. Además, no recibió tratamiento de descremado ni estandarización y como menciona Akdemir (2015), la grasa láctea aumenta la viscosidad de la matriz con repercusiones negativas sobre la eficacia del ultrasonido, pues las ondas pierden energía, se resisten a fluir y disminuye la cavitación (Patist & Bates, 2008). Salleh-Mack & Roberts (2007) también señalan que el contenido de sólidos solubles tiene efecto protector e incrementa el tiempo de sonicación requerido para la inactivación de *E. coli* ATCC 25922, misma sepa utilizada en el yogurt.

Monteiro *et al.* (2018) reportan una reducción de 3,56 ciclos logarítmicos de mesófilos aerobios y coliformes aplicando ultrasonido (20 kHz; 3,0 kJ/mL), equivalentes a la carga total inoculada en una bebida láctea con chocolate. Una posible causa de la escasa inactivación de *E. coli* conseguida en el yogurt, es la densidad de energía utilizada, ya que el tratamiento más severo fue de 0,72 kJ/mL, bastante menor que el reportado por Monteiro *et al.* (2018). Como exponen Tiwari & Mason (2012), el efecto del tiempo y la intensidad de la sonicación sobre la inactivación

microbiana es directamente proporcional a la exposición de los microorganismos a la cavitación, pues mayores son los daños que podrían sufrir y en este caso al estar expuestos a menor intensidad sónica, se cree que los microorganismos pudieron haber sufrido menor daño, misma razón por la que posiblemente no se consiguió la reducción esperada.

Halpin *et al.* (2014) observaron bajos niveles de inactivación de *E. coli* utilizando termosonicación a 55 °C y 20 kHz. Los autores sugieren que este microorganismo tiene una mayor resistencia al proceso de termosonicación, ya que incluso observaron bajos porcentajes de daños sub-letales, sin embargo apoyan la hipótesis del efecto sinérgico ya que la sonicación puede ser más útil como obstáculo en un sistema que como método autónomo para la inactivación bacteriana (Noci *et al.*, 2009). Estos autores sugieren que si el primer mecanismo obstáculo provee un efecto débil en términos de inactivación, entonces inevitablemente dejará un mayor número de microorganismos para ser inactivados por el segundo método. En el caso del presente estudio no se tenían otras barreras sinérgicas con el ultrasonido, y éste por sí sólo no fue capaz de reducir un microorganismo indicador. No se cuenta con referencias que indiquen que el cultivo iniciador del yogurt ejerza competencia por sustratos frente a *E. coli*, por lo que no es posible afirmar que contribuya a la inactivación, como tampoco la posterior acidificación.

Como lo comprobó Bermúdez (2012), se ha demostrado que la sonicación por sí sola no es suficientemente efectiva para inactivar bacterias a las intensidades de aplicación práctica (20 a 100 kHz) sin causar disrupción total de los alimentos y alcanzar la reducción de 5 logaritmos necesaria para validar un método antimicrobiano. La sonicación se debe combinar con otras barreras. Wong *et al.* (2008) anteriormente encontraron que el ultrasonido hace a los microorganismos sensibles al pH. Bermúdez (2012) obtuvo que la reducción bacteriana aumenta conforme disminuye el pH del medio. Sin embargo, Salleh-Mack & Roberts (2007) observaron que la menor resistencia de *E. coli* a la sonicación ocurre a un pH de 2,5 en comparación con uno de 4,5 similar al del yogurt.

Algunas cepas de *E. coli* han demostrado capacidad de sobrevivir en ambientes ácidos. Conner & Kotrola (1995) encontraron que *E. coli* O157:H7 puede crecer a 25 °C en caldo de tripticasa soya acidificado con ácido láctico a pH de 4,7, condiciones de temperatura y pH similares a los utilizados en la elaboración de yogurt, lo cual podría ayudar a explicar el fenómeno observado.

Holck *et al.* (2011) comentan que *E. coli* puede desarrollar tolerancia al ácido inducida por exposición a los ácidos, ya que células de *E. coli* patogénica y no patogénica en la fase estacionaria fueron sustancialmente más ácido tolerantes que células en fase de crecimiento. Estos autores comentan además que la tolerancia al ácido de diferentes cepas de *E. coli* varía notablemente del aislado bacteriano, dependiendo de la cepa, tipo de acidulante y la inducción a la resistencia al ácido, por lo que no puede generalizarse.

En contraste con los resultados obtenidos y de acuerdo con lo comentado sobre la combinación de técnicas para la reducción bacteriana, Lee *et al.* (2009) compararon el efecto de la sonicación combinada con calor y presión (20 kHz, 124 μ m de amplitud) sobre la inactivación de *E. coli* en un buffer de fosfatos (0,01 M, pH 7). Ellos demostraron que la combinación de factores letales (calor y sonicación con o sin presurización) disminuyó significativamente el tiempo para la reducción de 5 logaritmos, en donde las tasas de inactivación del microorganismo fueron significativamente mayores para termosonicación y manotermosonicación que las de sonicación. Elevar la temperatura debilita la membrana bacteriana, potenciando el efecto de la cavitación (Patist & Bates, 2008).

Gao *et al.* (2014) en su estudio observaron que la principal razón para la resistencia bacteriana a la inactivación por ultrasonido es debido a la propiedad de formar cápsula. Según Whitfield & Roberts (1999), muchas cepas de *E. coli* están cubiertas por una capa de polisacáridos que representan un antígeno superficial, formando cápsula capilar.

Por último, los resultados no satisfactorios en cuanto a la escasa reducción observada pueden estar relacionados con la baja frecuencia utilizada en el proceso de sonicación, pues Koda *et al.* (2009) encontraron que la inactivación de *E. coli* se mejora al aumentar la potencia ultrasónica en el rango de 1,7 a 12,4 W. Ellos descubrieron que, para la misma potencia ultrasónica suministrada a la solución bacteriana, realizando experimentos a 20 y a 500 kHz, la inactivación se potenciaba ligeramente a la frecuencia de 500 kHz. Como se mencionó anteriormente, en la presente investigación se utilizó una frecuencia baja de 20 kHz, adecuada para matrices alimentarias. Awad *et al.* (2012) también reportan una frecuencia de 20 kHz utilizada normalmente para la inactivación de microorganismos como *E. coli*.

Basado en los resultados de la Figura 8 y la literatura citada, puede ser tentador sugerir aumentar el tiempo de sonicación para determinar si se consigue aumentar la reducción microbiana. Sin

embargo, Lee *et al.* (2009) señalan que incluso tratamientos de 60 minutos no resultan factibles a nivel industrial por la eficiencia negativa en los procesos, especialmente si se cuenta con otros tratamientos más efectivos y eficientes como los térmicos.

Bajo este contexto, se concluye que la sonicación con los parámetros utilizados (20 kHz de frecuencia, amplitud al 40% y 50 W de energía), no es efectiva como método para lograr leche inocua como materia prima destinada a la elaboración de yogurt griego, ya que no logra reducir la carga de un microorganismo indicador de contaminación fecal. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de su aplicación en combinación con los tratamientos térmicos tradicionales, para potenciar características de calidad o mejorar el desempeño de los procesos de producción.

5.2. Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre la textura del yogurt griego

Algunos autores como Soria & Villamiel (2010) han reportado cambios en la funcionalidad y textura de productos lácteos debido al procesamiento con ultrasonido. Por ello, para evaluar el efecto de la sonicación de leche cruda entera de vaca sobre la textura del yogurt griego obtenido, se midieron instrumentalmente los parámetros asociados en términos de firmeza, cohesividad, consistencia e índice de viscosidad según metodología del equipo texturómetro utilizado.

Las tendencias obtenidas para cada medida se ilustran en las Figuras 9 y 10.

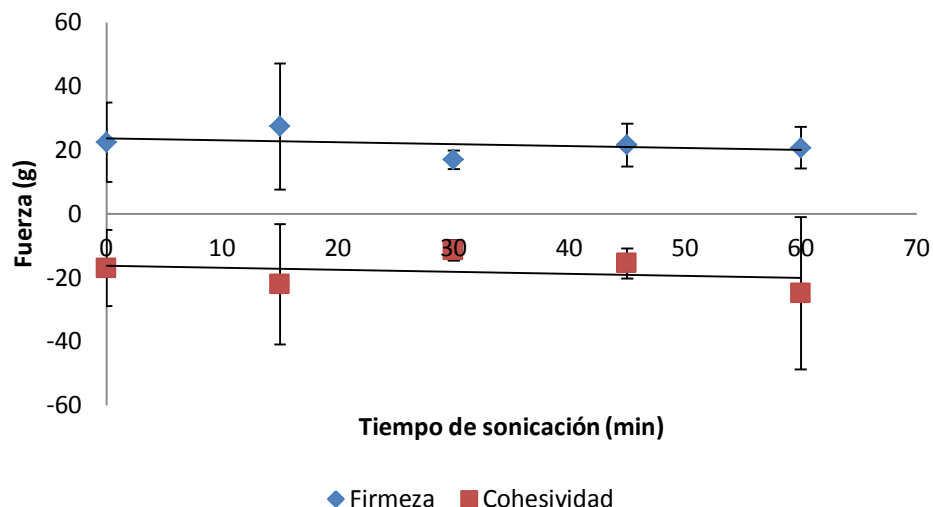


Figura 9. Medida promedio de firmeza y cohesividad asociados con la textura del yogurt griego en función del tiempo de sonicación de la leche empleada para su elaboración.

La figura 9 ilustra el comportamiento resultante para firmeza y cohesividad. De acuerdo con Bourne (2002), la firmeza se define como la fuerza necesaria para alcanzar la máxima profundidad al comprimir la muestra, mientras que la cohesividad, o adhesividad, se asocia con la fuerza negativa en el retorno de la sonda durante el ciclo de compresión. La figura anterior muestra que no se obtuvo un efecto significativo del tiempo de sonicación sobre la firmeza del yogurt griego ($1-\beta=0,8203$). De la misma forma, tampoco se observó un efecto significativo del tiempo de sonicación sobre la cohesividad ($1-\beta=0,7807$).

En la Figura 10 se puede apreciar un comportamiento similar para los parámetros estimados por el equipo según el área bajo las curvas de textura. Nuevamente la figura refleja un comportamiento constante para ambos parámetros, por lo que no se encontró diferencia significativa para la consistencia ($1-\beta=0,4536$) ni para la viscosidad ($1-\beta=0,3088$).

Al analizar las figuras 9 y 10 no es posible rescatar resultados prácticos concluyentes, ya que no se encontraron diferencias debidas a los tiempos de sonicación aplicados. Pese a la inferencia estadística no significativa resultante para el efecto de la sonicación sobre la textura del yogurt, a nivel visual experimental sí fue posible observar con claridad la pérdida de firmeza y consistencia de las muestras conforme aumentó el tiempo de sonicación.

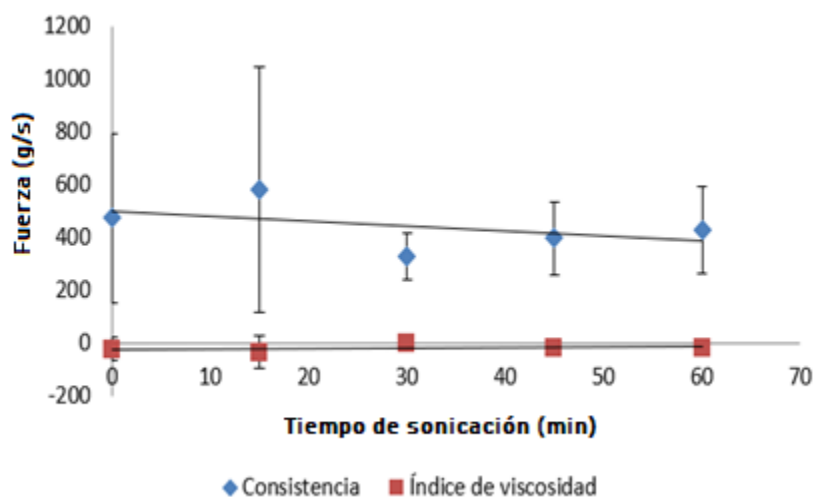


Figura 10. Medida promedio de consistencia e índice de viscosidad asociados con la textura del yogurt griego en función del tiempo de sonicación de la leche empleada para su elaboración.

Se presume que estas diferencias no lograron exponerse a nivel estadístico posiblemente por la alta variabilidad obtenida en los resultados, reflejada en las potencias de prueba. Para el índice de viscosidad por ejemplo, se tuvo una potencia con un valor muy bajo ($1-\beta=0,3088$) que sugiere una alta variabilidad. A pesar de que otros valores de potencia sí parecen satisfactorios, como el de firmeza ($1-\beta=0,8203$), se debe aumentar el número de réplicas y repeticiones para apuntar a una mayor precisión y lograr observar efectos significativos, manteniendo un control estricto de todos los factores que pudieran influir en dicha variabilidad.

La mayor y más representativa debilidad del procedimiento realizado fue la insuficiente cantidad de yogurt posible de elaborar según la capacidad del sonotrodo y la cantidad de muestra requerida por el equipo para cuantificar cambios, lo que limitó a tres réplicas por repetición en lugar de las quince mediciones sugeridas por el profesional del texturómetro, lo que pudo influir en la alta variabilidad obtenida.

Dados los reportes de la literatura, sí se pretendía encontrar efectos sobre la textura. Se dice que el ultrasonido puede ser aplicado tanto para incrementar como para disminuir la viscosidad, y dependiendo de la intensidad, el efecto puede ser temporal o permanente (Patist & Bates, 2008). Por ejemplo, Ashokkumar *et al.* (2009) reportan una reducción de la viscosidad de disoluciones de proteína de suero sonicadas (20 kHz, 5 s) y atribuyen los cambios a las fuerzas físicas de la cavitación acústica originada, en la que en un medio líquido la burbuja crece e implosiona por los

cambios de presión, disminuyendo el tamaño de los agregados de proteína. Este mecanismo aún no ha logrado ser explicado por completo, pero se especula que una reducción en la viscosidad se produce principalmente por las fuerzas de cizalla que interrumpen las interacciones hidrofóbicas y los enlaces disulfuro intermoleculares (Patist & Bates, 2008; Ashokkumar *et al.*, 2009). Chandrapala *et al.* (2012 a) apoyan dicha teoría ya que obtuvieron una reducción significativa de la viscosidad en disoluciones proteicas lácteas.

Desai *et al.* (2013) comentan que las propiedades reológicas y sensoriales del yogurt griego difieren con el contenido de grasa y forma de manufactura. Los yogures con leche entera se caracterizan por su firmeza y densidad, mientras que los descremados carecen de firmeza, densidad, cohesividad y después de agitarlos, viscosidad. Como la leche utilizada en el presente estudio era entera, se esperaba que el yogurt elaborado presentara más cuerpo y firmeza ya que además, Reiner *et al.* (2010) comentan que la aplicación de ultrasonido (24 kHz) a la leche antes de la inoculación con los cultivos del yogurt, aumenta la consistencia, fuerza del gel, y la viscosidad, a la vez que disminuye la sinéresis. Se presume que la ausencia de dichos efectos en el yogurt griego objeto de estudio, se debe a que estos autores reportan la sonicación como un mecanismo para dar soporte al tratamiento térmico, y en este caso el ultrasonido se aplicó como método único manteniendo la temperatura a 23 (± 2) °C.

Terefe *et al.* (2016) comentan que el tamaño y la composición de las micelas de caseína puede responder a alteraciones del pH y temperatura, lo que hace posible que las temperaturas elevadas localizadas y las fuerzas de cizalla creadas por la sonicación a baja frecuencia puedan alterar las micelas de caseína y su interacción con los otros componentes de la leche. Al realizar la sonicación en un baño a 23 (± 2) °C no se permitió alcanzar estas temperaturas elevadas en la matriz láctea y por ende, se presume que no fue posible observar el efecto descrito por Liu *et al.* (2014) quienes demostraron que sonicar la leche a 20 kHz a un pH igual a 8,0 (reajustado posteriormente a 6,7) mejora las propiedades de gelificación con firmezas más altas que en aquellas leches no sonicadas y a su pH normal de 6,7. Chandrapala *et al.* (2013, 2014) confirmaron estos resultados mostrando que la sonicación (20 kHz, 31 W, 30 minutos) mejora la formación de agregados de proteína. En este punto es importante destacar que para el experimento, el pH de la leche al momento de la sonicación no se elevó por arriba de 8 como mencionan los autores, por lo que no se dieron las condiciones para favorecer dichos efectos de firmeza y gelificación. Debería evaluarse si a nivel

industrial resulta factible realizar estas modificaciones de pH con tal de obtener el beneficios en la textura y si la inversión es valorada por el consumidor.

Es posible además que los efectos observados en la textura se relacionen con la ausencia de homogenización de la leche utilizada como materia prima. Como expone Weerathilake (2014), al homogenizar la leche se rompen los glóbulos de grasa y se asegura su distribución uniforme en la matriz, mejorando la consistencia del yogurt. Algunos autores también reportan la necesidad de utilizar agentes estabilizadores ya que tienen efecto sobre la textura del yogurt. Pero pese a que en el yogurt elaborado se utilizaron aislados y concentrado de suero, la ausencia de tratamiento térmico y/o desnaturalización proteica no permitió la correcta agregación de las proteínas para formar el gel, y por ende los estabilizadores no pudieron ser encerrados en la red, perdiendo su funcionalidad en el producto y resultando en un yogurt con baja firmeza y consistencia.

En este punto es importante recalcar la importancia del tratamiento térmico en la elaboración del yogurt para fines de calidad y no solamente de inocuidad, ya que es la responsable de la desnaturalización de las proteínas que permite la correcta formación del gel y propiciar las características de textura firme en el yogurt.

Para sustentar dicha teoría y apoyar el comportamiento de los efectos obtenidos, se presenta la Figura 11 que ilustra la diferencia en los valores de consistencia y firmeza para el yogurt pasteurizado, no pasteurizado y uno con leche sonicada 60 minutos a 20 kHz.

En la Figura 11 se aprecia con total claridad el efecto del tratamiento térmico, que en el caso específico del yogurt cumple una función no sólo de inocuidad sino también de calidad, para propiciar las características de firmeza y consistencia del yogurt griego.

Las proteínas del suero que participan en la agregación de la caseína en el yogurt son α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina. Aunque las caseínas son termoestables, las proteínas del suero sufren desnaturalización a partir de 65°C, y durante el experimento nunca se alcanzó una temperatura tan alta. Romero del Castillo & Lagarriga, (2004) explican que los tratamientos térmicos por encima de 80°C inducen tanto a la α -lactoalbúmina como a la β -lactoglobulina a participar de la agregación proteica junto a κ -caseína de la micela, lo que conduce a la formación de un coágulo firme y un yogurt menos vulnerable a sinéresis.

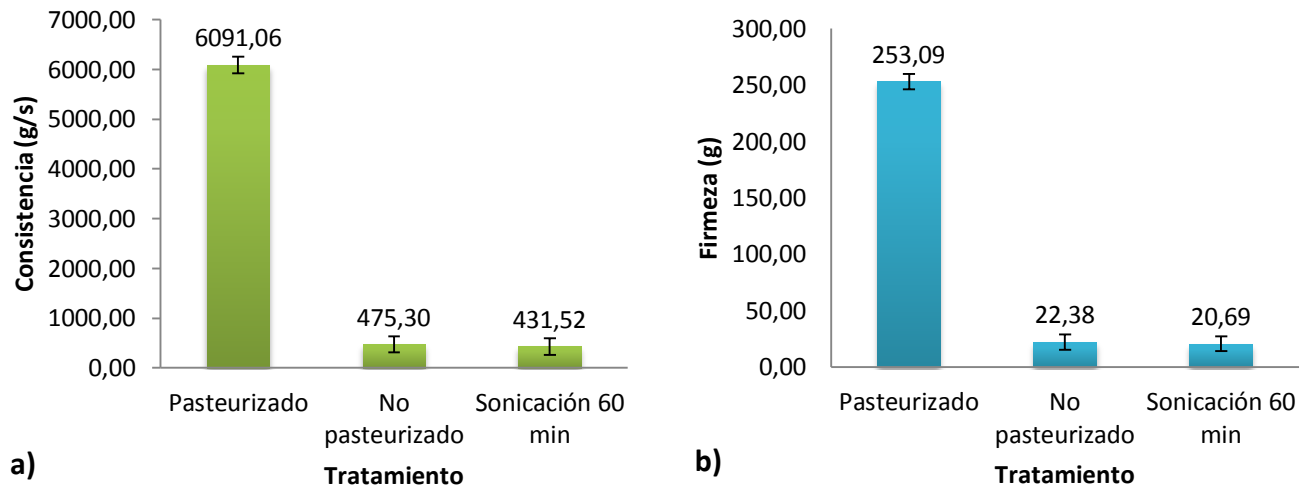


Figura 11. Promedio de dos parámetros asociados con la textura: a) Consistencia y b) Firmeza para yogurt griego pasteurizado, no pasteurizado y con leche sonicada para su elaboración.

Sería provechoso seleccionar tiempos de sonicación factibles para la industria y evaluar su efecto sobre la textura del yogurt realizando más réplicas y controlando factores como la manipulación previa de las muestras, para determinar si ciertamente no existe una diferencia entre los tiempos de sonicación utilizados. Además, dados los pobres valores de firmeza y consistencia obtenidos y los reportes de otros autores, sería provechoso evaluar el efecto de la termosonicación sobre la textura y sus beneficios para la industria del yogurt, ya que es un atributo crítico en la calidad del producto y es apreciado por los consumidores.

5.3. Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre el rendimiento de elaboración de yogurt griego, su capacidad de retención de agua y el índice de sinéresis

Como se explicó en apartados anteriores, se han reportado efectos del ultrasonido sobre las proteínas lácteas y su capacidad de formar la red del gel en lácteos fermentados, por lo que se evaluó el efecto del tiempo de sonicación de leche cruda de vaca sobre los parámetros relacionados a la calidad del gel: rendimiento de elaboración de yogurt griego, capacidad de retención de agua e índice de sinéresis. Los resultados se ilustran en las figuras de la 12 a la 17. Según los resultados obtenidos, se determinó que el tiempo de sonicación de la leche no tuvo efecto significativo sobre ninguno de los parámetros evaluados.

Se determinó que el tiempo de sonicación de la leche no tuvo un efecto significativo sobre el rendimiento de elaboración de yogurt griego ($1-\beta=0,87$). En la Figura 12 se presenta el comportamiento.

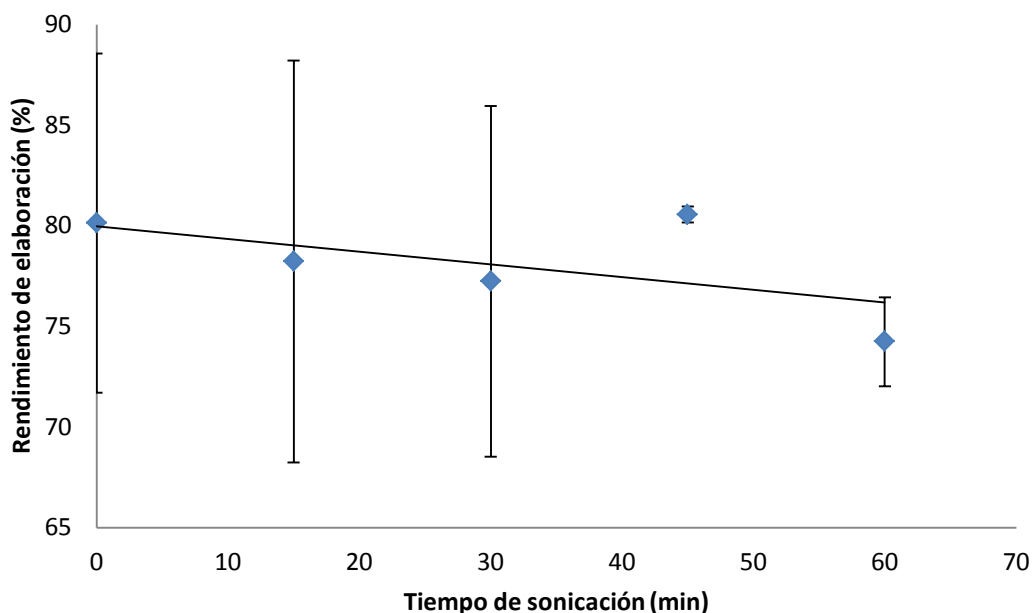


Figura 12. Porcentaje del rendimiento promedio del proceso de elaboración de yogurt griego en función del tiempo de sonicación de la leche cruda usado como materia prima.

Este resultado no era el esperado, ya que Lara (2015) en su experimento bajo las mismas condiciones de sonicación pero elaborando queso seco, encontró un aumento significativo del rendimiento según el tiempo de sonicación. Otros autores reportan efectos similares a los encontrados por Lara, asociando el resultado a cambios estructurales provocados por la cavitación en los glóbulos de grasa y las fracciones de proteína de la leche, como Soria & Villamiel (2010) quienes observaron un mejoramiento del rendimiento en la elaboración de queso a partir de leche homogenizada mediante sonicación.

Autores como Barbosa & Bermúdez (2011) y Sfakianakis & Tzia (2014) apuntan a la homogenización como el principal factor responsable del incremento del rendimiento, ya que al crear mayor área superficial por la reducción de tamaño de los glóbulos de grasa, se generan más puntos de interacción grasa-caseína que favorecen el agrupamiento de caseínas y proteínas del suero, fortaleciendo la red y aumentando el rendimiento al ligar moléculas de agua con la fracción hidrofílica de las caseínas expuestas al medio. Lo anterior fue confirmado por Chandrapala *et al.*

(2013, 2014) quienes encontraron que la sonicación (20 kHz, 31 W, 30 minutos) cambió la naturaleza hidrofóbica de la superficie de las proteínas sin cambiar la carga superficial, demostrando que los agregados proteicos formados por ultrasonido tienen potencial para mejorar el cuajo del queso para aumentar su rendimiento.

Pese a que los reportes de investigaciones anteriores hacen referencia al rendimiento quesero, se espera un comportamiento similar para el rendimiento de yogurt al ser un derivado lácteo fermentado con posterior formación de agregados proteicos que dan forma al gel del producto final.

Dado lo anterior, se presume que la ausencia de una homogenización completa pudo influir en el rendimiento del yogurt, ya que a pesar que la cavitación provoca una fragmentación de los glóbulos grasos, es posible que no sea suficiente para formar en ellos la capa superficial de caseínas y proteínas séricas que evitan el cremado durante la fermentación y la separación del suero, razón por la cual Lee & Lucey (2010) establecen que la homogenización es un paso fundamental en la elaboración de yogurt con alto contenido de grasa para obtener altos rendimientos.

En la elaboración del yogurt griego, durante la etapa del desuerado se observó una gran cantidad de suero exudado que parecía aumentar con el tiempo de sonicación. Se cree que dicho efecto podría deberse a la erosión de la superficie, ya que según reportes de Awad *et al.* (2012) se ha utilizado ultrasonido como ayudante en el proceso de extracción de componentes alimentarios, principalmente aceites, proteínas y polisacáridos, así como antioxidantes (Vilkhu *et al.*, 2008), pues las fuerzas de cizalla y microburbujas generadas por la cavitación potencian la erosión de la superficie, la fragmentación y la transferencia de masa, resultando en un alto rendimiento de los materiales extraídos y tasas rápidas de extracción.

Se presume que la intensidad del ultrasonido es apenas suficiente como para que la cavitación producida erosione la matriz de proteínas, causando daño en su estructura y alterando la capacidad de retención de agua, por lo que no les es posible retener el suero y éste sale exudado como un material extraído, resultando en pérdidas en el rendimiento de elaboración de yogurt. Sería muy valioso evaluar si un tratamiento con termosonicación permite mayores rendimientos por disminución del suero exudado al ser el ultrasonido sólo un coadyuvante del proceso y no el responsable completo de causar los efectos deseados de aumento del rendimiento, pues como

reportan Nguyen & Anema (2010), la sonicación por sí sola no logra desnaturalizar la β -lactoglobulina ni la α -lactoalbúmina a temperaturas entre los 20 y 40°C.

Se ha demostrado también que las proteínas del suero tienen mayor capacidad de retención de agua luego de tratamientos de sonicación (Barbosa & Bermúdez, 2011). Se determinó que el tiempo de sonicación de la leche no tuvo un efecto significativo sobre la capacidad de retención de agua del yogurt griego ($1-\beta=0,1778$). En la Figura 13 se ilustra el comportamiento.

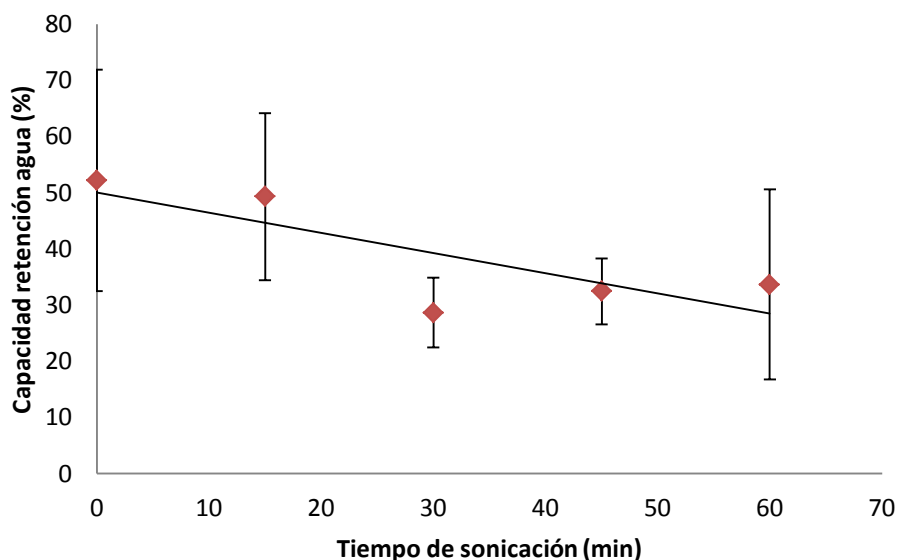


Figura 13. Promedio de la capacidad de retención de agua del yogurt griego en función del tiempo de sonicación de la leche usada para su elaboración.

El comportamiento ilustrado en la figura anterior sugiere una disminución de la capacidad de retención de agua conforme aumenta el tiempo de sonicación, el cual pese a la estadística no significativa resultante, a nivel experimental sí fue posible observar el aumento en el líquido supernatante al centrifugar las muestras de yogurt conforme aumentó el tiempo de sonicación. Estas diferencias no lograron exponerse a nivel estadístico por la variabilidad obtenida en los resultados, reflejada en la potencia de prueba con un valor bajo ($1-\beta=0,1778$) que indica una alta variabilidad. Se debe aumentar el número de réplicas por repetición para apuntar a una mayor precisión y lograr observar efectos significativos, manteniendo un control estricto de todos los factores que pudieran influir en dicha variabilidad.

La mayor debilidad del procedimiento realizado fue la naturaleza compleja del fluido supernatante después de la centrifugación, el cual era cada vez más espeso y blanquecino, por lo que se dificultaba la separación del sólido y la capa grasa que se sedimentaban. Este contenido graso que se sedimentaba en el tubo de la centrífuga era cada vez menor conforme aumentaba el tiempo de sonicación en la muestra. Esto tiene sentido según la explicación de Walstra *et al.*, 2006, quienes señalan que el fortalecimiento de la red proteica por fragmentación de los glóbulos grasos también inhibe la salida de la grasa del producto final, ya que se encuentra homogéneamente distribuida y ligada a los componentes proteicos y acuosos.

Este punto es interesante de recalcar, ya que durante el procesamiento del yogurt, se podía observar que aquellas muestras con más tiempo de sonicación presentaban una capa grasa superficial más homogénea con gotas de grasa más regulares y casi microscópicas con apariencia como de arena, mientras que las muestras con menores tiempos de sonicación presentaban capas de grasa amarillenta con gotas irregulares, como se ilustra en las fotografías de la Figura 14. Sin embargo, es importante destacar que no se realizó una cuantificación del contenido de grasa presente en las muestras, por lo que sería valioso realizar esta determinación para relacionar el resultado con los supuestos anteriores y sugerir una teoría que explique si el contenido de grasa ligada a la red proteica aumenta conforme aumenta el tiempo de sonicación, o si por el contrario la grasa no puede ser retenida por la red y es exudada.

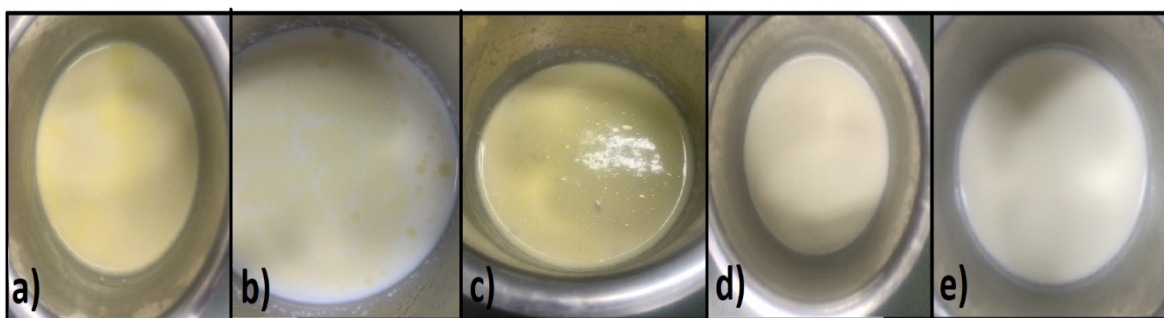


Figura 14. Fotografías de la capa de grasa observada durante la elaboración de yogurt griego según el tiempo de sonicación: a) 0 min, b) 15 min, c) 30 min, d) 45 min, e) 60 min.

La pobre capacidad de retención de agua está directamente relacionada con el porcentaje de sinéresis. Se determinó que el tiempo de sonicación de la leche no tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de sinéresis del yogurt griego ($1-\beta=0,2175$). En la Figura 15 se ilustra el comportamiento.

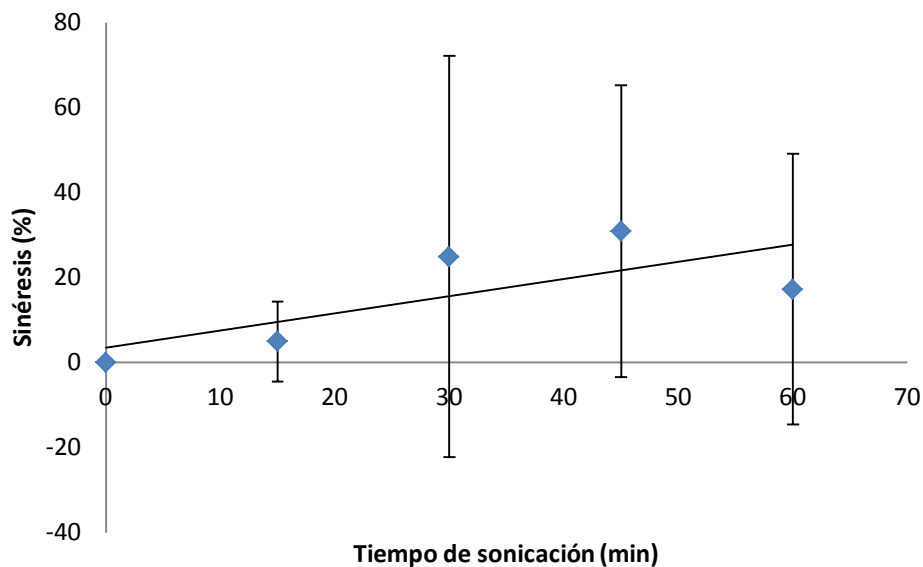


Figura 15. Promedio del porcentaje de sinéresis en yogurt griego en función del tiempo de sonicación de la leche usada para su elaboración.

La débil potencia de prueba denota una alta probabilidad de error debido a la variabilidad de los resultados, reflejada en las amplias barras de límites de confianza. Esto indica que se necesita un número mayor de repeticiones para aumentar la precisión de los resultados y determinar si el efecto verdaderamente es tan pequeño como para no reflejarse a nivel estadístico. Esta variabilidad pudo deberse a complicaciones con el método de análisis ya que, por los efectos anteriormente descritos sobre la poca firmeza y débil fuerza del gel, el yogurt obtenido de consistencia casi líquida y viscosa, en algunos tratamientos pasaba por completo a través de la malla utilizada para promover el desuerado, tratándose como suero cuando en realidad era el mismo yogurt filtrado.

En una muestra patrón de referencia preparada con tratamiento térmico, aunque por su consistencia cremosa no hubo suero exudado, sí fue posible observar separación de suero al permanecer en reposo a temperatura ambiente, como se observa en la fotografía de la Figura 16.



Figura 16. Fotografía que ejemplifica la sinéresis observada en una muestra de yogurt griego elaborado con leche tratada térmicamente.

Como se ha explicado anteriormente para los comportamientos descritos, la tendencia observada puede atribuirse a la influencia de la sonicación sobre la estructura del gel. Según Lucey (2002), se necesita de tratamientos térmicos severos, como 90 °C por 10 minutos, para inducir tanto a la α -lactoalbúmina como a la β -lactoglobulina del suero a participar de la agregación proteica, resultando en un yogurt menos vulnerable a sinéresis, pero un tratamiento térmico más bajo causa la participación de la β -lactoglobulina en lugar de la α -lactoalbúmina, ya que un 80 a 90% de α -lactoalbúmina desnaturalizada es reversible después del calentamiento.

En la Figura 17 se presenta a manera de ejemplo ilustrativo, las diferencias en los valores de porcentaje de rendimiento, capacidad de retención de agua y sinéresis entre un yogurt tratado térmicamente, uno sin pasteurizar y otro con 60 minutos de sonicación.

Con esto, se sospecha que el tratamiento con ultrasonido no ejerce un efecto de desnaturalización tan severo como para promover la agregación de ambas proteínas, resultando en un gel débil con tendencia a la sinéresis.

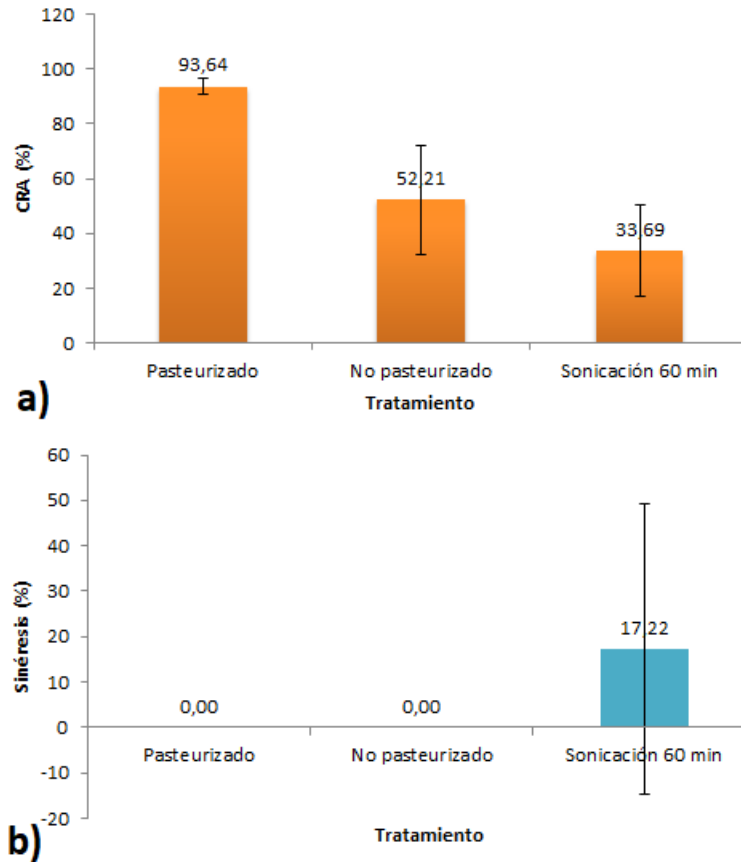


Figura 17. Promedio del porcentaje de a) Capacidad de retención de agua y b) Sinéresis para yogurt griego pasteurizado, no pasteurizado y con leche sonicada para su elaboración.

Lo anterior puede relacionarse con la acidez alcanzada durante la fermentación, pues según Atamian *et al.* (2014) los niveles de acidez se asocian con el grado de sinéresis en geles lácteos ácidos, ya que atribuyen la sinéresis a reordenamientos estructurales en la red de gel de caseína y al volumen de espacio vacío de la matriz proteica. Puede pensarse que los tratamientos de sonicación no permitieron alcanzar plenamente el punto isoelectrico de las proteínas para que se diera la adecuada formación de agregados. Los autores además atribuyen la sinéresis al contenido de proteína. Cuanto mayor sea el contenido, más compleja será la red del gel y por lo tanto mayor es la capacidad de los espacios vacíos de contener el suero. Sin embargo, los análisis con el analizador de características fisicoquímicas al recibo de la leche, Ekomilk, indicaron un contenido proteínico similar al reportado por Lu & Wang (2017), cercano al 3,20%, por lo que la agregación deficiente de las proteínas es más atribuible al bajo poder de desnaturalización del ultrasonido. Aquí se visualiza el valor que aportaría realizar análisis del grado de desnaturalización proteica alcanzado para relacionarlo con la hipótesis anterior.

Es posible que los efectos de aumento en la sinéresis y la disminución en la capacidad de retención de agua se relacionen con la ausencia de homogenización de la leche utilizada como materia prima. En su estudio, Serra *et al.* (2009) encontraron que los yogures con leche tratada con homogenización a ultra alta presión (UHPH por sus siglas en inglés) presentaron valores de capacidad de retención de agua y firmeza más altos en comparación con yogures convencionales, mientras que en yogurt batido observaron mayor consistencia, menos sinéresis y estructura más gruesa. La leche empleada para la presente investigación no fue homogenizada ya que se pretendía causar la menor alteración posible a sus componentes para poder probar únicamente el efecto del ultrasonido sobre las propiedades a medir.

Algunos autores reportan la necesidad de utilizar agentes estabilizadores para evitar la exudación de suero, encontrando que tanto los períodos de almacenamiento como los sólidos totales y el agente estabilizador, tienen efecto sobre la sinéresis, textura, sabor, acidez y color del yogurt. En la investigación se utilizaron estabilizantes como parte de la formulación del yogurt. Sin embargo, se presume que la débil estructura del gel que se formó no permitió encapsular dichos aditivos para que cumplieran su función. Es importante mencionar que no puede descartarse la posibilidad de que el ultrasonido no desnaturalice suficientemente las proteínas como para formar el gel, sino que, por el contrario, ejerza un efecto tan potente sobre las mismas que las desnaturalice por completo a tal punto que no permita la agregación y formación de la red.

Lee & Lucey (2010) relacionan la separación de suero espontánea con una red inestable, la cual puede deberse al aumento en los reajustes en la matriz del gel o puede ser inducido por un daño a la débil red del gel, como vibraciones o cortes.

Para la industria láctea resulta valioso encontrar prácticas y métodos que conduzcan a un aumento del rendimiento de elaboración, así como a productos de características agradables tanto de calidad como sensoriales. Se comprobó que la sonicación por sí sola no es capaz de ofrecer un yogurt con los requisitos que demanda la industria y satisfacer las necesidades del consumidor, ya que no mostró potencial de aumentar rendimiento, aumentar capacidad de retención de agua y/o disminuir la sinéresis. Es necesario desarrollar más pruebas experimentales utilizando la sonicación como un coadyuvante de proceso, como la termosonicación, para evaluar si se consiguen efectos de interés industrial.

5.4. Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre el color del yogurt griego

Como se describió en el apartado anterior, debido a que durante la elaboración y preparación de las muestras bajo los distintos tratamientos de sonicación se observaron cambios interesantes en las coloraciones del yogurt y el suero exudado, se midieron los parámetros asociados con el color y la variable ΔE (cambio de color).

Se determinó que el tiempo de sonicación de la leche sí produce diferencias significativas en el cambio de color del suero exudado durante la etapa de desuerado ($p=0,0357$), mientras que para el yogurt no se tuvo un efecto significativo sobre la misma variable ($1-\beta=0,6687$). En la Figura 18 se presenta el resultado.

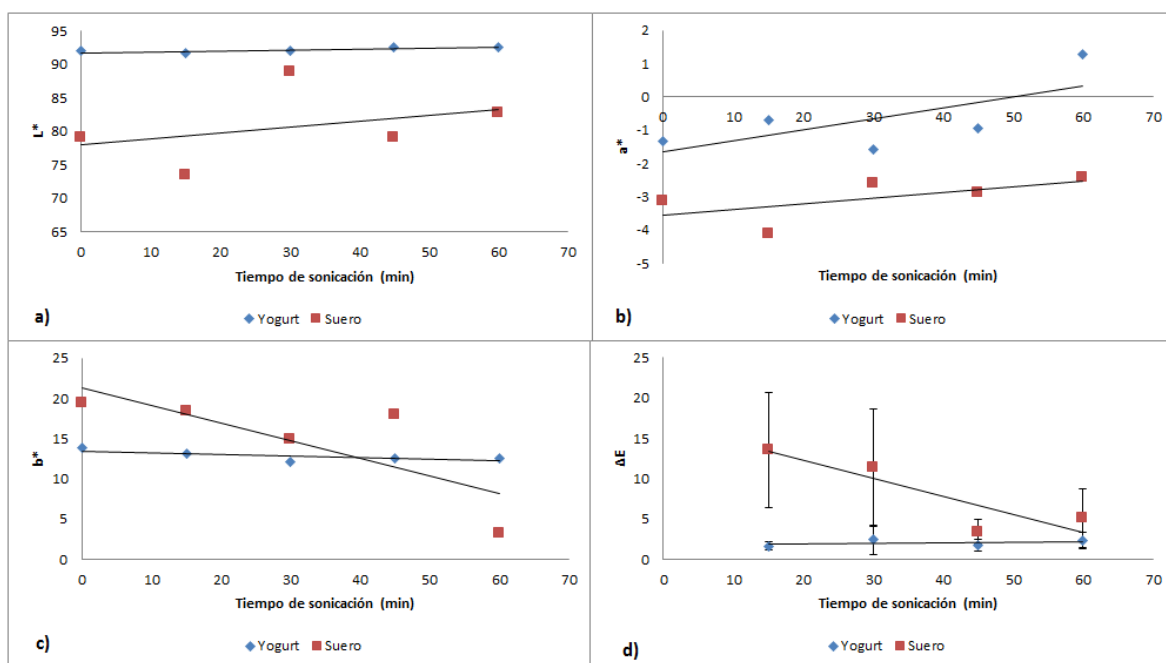


Figura 18. Promedio del cambio de los parámetros de color a) L^* , b) a^* , c) b^* y d) ΔE del yogurt griego y el suero exudado en función del tiempo de sonicación de la leche.

En la Figura 18 se presentan las tendencias obtenidas para los cuatro parámetros asociados con el color. El valor de color L^* se refiere a la luminosidad del producto y abarca desde el blanco (100) hasta el negro (0); la variable a^* se refiere a los colores rojo y verde y la variable b^* contempla desde el amarillo (120) hasta el azul (-120) (León *et al.* 2006). De aquí, los de mayor interés son los parámetros L^* y b^* por ser los del rango blanquecino-amarillento del yogurt y el suero.

En los cuatro gráficos puede observarse que la línea de tendencia del yogurt permanece constante. Se esperaba observar una inclinación hacia las tonalidades amarillas debido al contenido alto de grasa de la leche entera de vaca utilizada, ilustrado en la Figura 14. Atamian *et al.* (2014) obtuvieron que el yogurt griego presenta un color significativamente diferente según el tipo de leche que se utilice, ya sea bovina, ovina o caprina, además del porcentaje de grasa que contenga. Estos autores observaron que el yogurt elaborado con leche entera de bovinos presenta coloración “Ivory clara” y menos brillo. Malek *et al.* (2001) reportan que el yogurt griego elaborado con leche bovina presenta una tonalidad amarillenta debido al contenido de betacarotenos contenidos en este tipo de leche. Los autores reportan además un aumento en los valores de blancura del yogurt conforme el contenido de grasa disminuye. Este último efecto no logró observarse pues la línea de tendencia para L^* en yogurt permanece casi inmutada.

Lee & Lucey (2010) comentan que la homogenización es un paso fundamental en la elaboración de yogurt con alto contenido de grasa, ya que al romper los glóbulos no sólo se disminuye su tamaño, sino que también se forma en ellos una capa superficial de caseína y proteínas de suero que le confiere características proteicas, favoreciendo la formación de uniones entre las moléculas, evitando la separación (o cremado) durante la fermentación, la separación del suero y potenciando la blancura y la consistencia del yogurt. Como consecuencia, se da un aumento en la luminosidad de la leche al volverse más blanca, ya que los glóbulos pequeños y homogéneos modifican la reflexión de la luz, resultando en un color más blanco (Bermúdez & Barbosa, 2011; Tiwari & Mason, 2012).

En la etapa de desuerado se observó una disminución de la turbidez del suero obtenido conforme aumentó el tiempo de sonicación, como se muestra en la Figura 19. Este mismo comportamiento fue observado por Lara (2015) quien describe que cuanto mayor fue el tiempo de sonicación, menor fue la cantidad de partículas suspendidas en el suero, teniendo un suero menos blancuzco y más amarillento. Shanmugam *et al.* (2012) atribuyen dicho comportamiento a una re-agregación de caseínas libres a las micelas de caseína por efecto de las fuerzas mecánicas de cavitación y a la interacción de las proteínas del suero y sus agregados con las micelas de caseína.

Para el caso del suero, los gráficos de L^* y b^* de la Figura 18 parecen sugerir que la blancura aumenta y el amarillo disminuye, mientras que a nivel experimental visual se presenta el efecto contrario ilustrado en la Figura 19, la cual indica que la tendencia ascendente en la luminosidad se

refleja en la disminución de la coloración blanquecina observada en los sueros conforme aumenta el tiempo de sonicación, así como con la disminución de la turbidez. Según se explicó en la sección anterior, Shanmugam *et al.* (2012) atribuyen dicho comportamiento a una re-agregación de caseínas libres a las micelas de caseína por efecto de las fuerzas mecánicas de cavitación y a la interacción de las proteínas del suero y sus agregados con las micelas de caseína, con lo que se tiene un suero más claro y limpio.

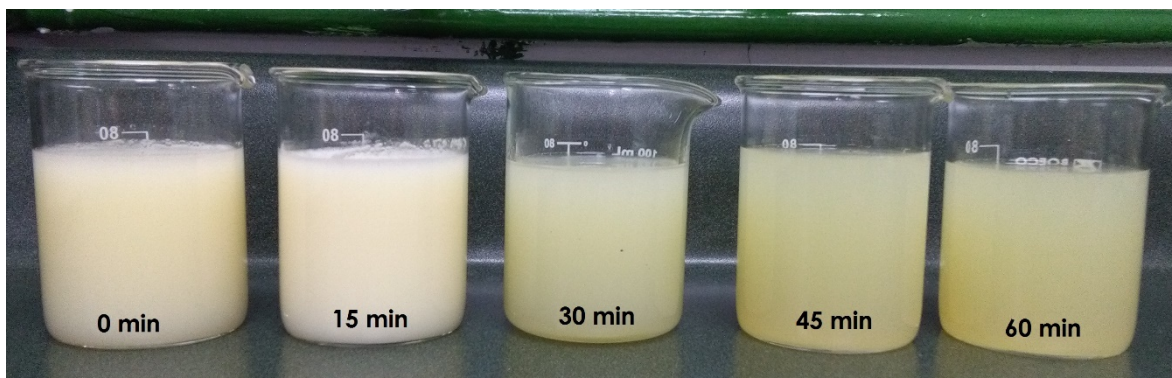


Figura 19. Suero recolectado durante el desuerado en la elaboración de yogurt griego según el tiempo de sonicación de la leche.

Con las variables de color mencionadas, se calculó la diferencia total de color (ΔE) que se refiere a la diferencia mínima de color que el ojo humano puede percibir, sin enfocarse en la dirección de dicho cambio (Francis, 2005). Entre 2 y 3 son valores ya perceptibles como colores distintos por un ojo no adiestrado. El gráfico d) de la Figura 18 muestra que línea del yogurt está por debajo de 5 unidades, muy cerca de 1 y 2 lo que concuerda con la diferencia no significativa obtenida a nivel estadístico para el cambio de color en el yogurt. Por el contrario, la línea de tendencia para el suero en el gráfico b) está por encima de 10 para los tratamientos con menos tiempo de sonicación y disminuye hasta casi 5 para los tratamientos con más intensidad.

Al observar la fotografía de la Figura 19 se logra visualizar esta tendencia ya que la coloración de las muestras de la izquierda es considerablemente diferente a la coloración de las muestras de la derecha, pero entre ellas es casi imperceptible la diferencia de color.

Los efectos descritos sí pueden resultar de interés para las industrias lácteas, ya que se desea obtener yogures blancos de alta luminosidad que resulten atractivos para el consumidor. La aplicación del ultrasonido a la leche puede ofrecer el beneficio de contribuir con el desarrollo de

un color agradable en el producto final y en la obtención de sueros limpios y claros, que pueden ser utilizados posteriormente para elaborar otros subproductos, como el queso ricota.

5.5. Determinación del efecto del tiempo de sonicación sobre el tiempo de fermentación del yogurt griego

Se pretendía evaluar si el tiempo de sonicación de la leche cruda ejercía algún efecto sobre el tiempo en el que el yogurt alcanza un pH igual a 4,6 durante su fermentación, mediante la elaboración de curvas de acidificación desde la inoculación del cultivo iniciador hasta el pH objetivo. La tendencia observada se presenta en la Figura 20.

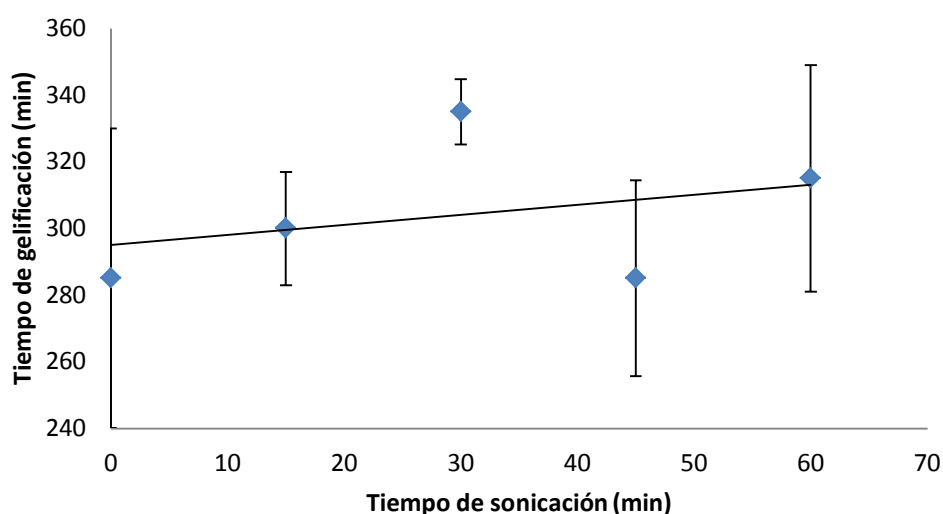


Figura 20. Promedio del tiempo de fermentación de yogurt griego en función del tiempo de sonicación de la leche usada como materia prima.

La figura anterior parece sugerir un comportamiento creciente del tiempo requerido para alcanzar el pH final, sin embargo estas diferencias no resultaron significativas ($1-\beta=0,1143$), posiblemente por la ubicación irregular entre los puntos, donde se observa disminuciones y aumentos del tiempo sin una tendencia clara. Esto se explica con la baja potencia estimada, la cual denota una alta probabilidad de incurrir en un error con la afirmación del efecto no significativo.

Este comportamiento podría ser el resultado de una marcada variabilidad en los datos experimentales utilizados para el análisis estadístico, evidente en las barras de error de los límites de confianza. Dicha variabilidad posiblemente sea producto de debilidades del método empleado para la elaboración de las curvas de acidificación que se muestran en la Figura 21.

La principal fuente de variabilidad consiste en que se trabajó con una única réplica para cada bloque de leche debido a los tiempos requeridos para los tratamientos de sonicación y la capacidad del equipo de procesar únicamente 250 mL por “batch”, lo cual no permite estimar un promedio de las réplicas y obtener tendencias más precisas, considerando que las fermentaciones son de por sí variables por la influencia de factores externos como manejo del cultivo, temperatura y humedad del ambiente, entre otros.

La baja potencia de prueba denota la necesidad de realizar más réplicas en cada bloque para aumentar la precisión de los resultados y lograr exponer a nivel estadístico la tendencia observada a nivel experimental, la cual se presenta en la Figura 21.

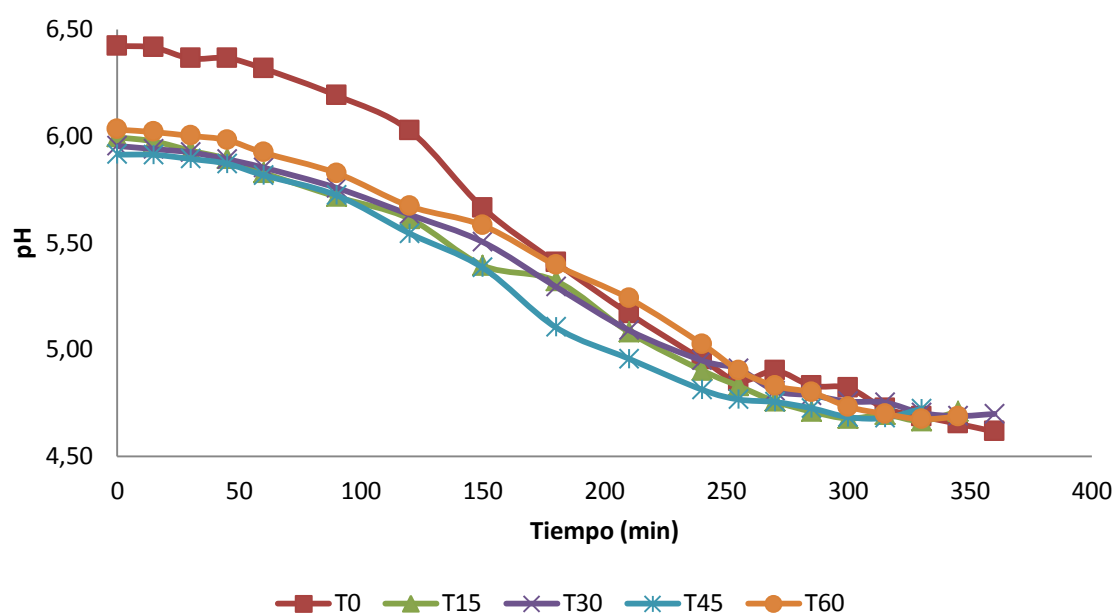


Figura 21. Curvas de acidificación en la elaboración de yogurt griego con leche a distintos tiempos de sonicación como materia prima.

La Figura 21 expone las curvas de fermentación del yogurt griego para cada tratamiento, las cuales ilustran el comportamiento del descenso del pH en el tiempo requerido hasta alcanzar un valor igual a 4,6 correspondiente al punto isoeléctrico de las proteínas, en el que ocurre la agregación de las micelas de caseína, proteínas séricas y el consecuente enrejado formador del gel (Weerathilake *et al.*, 2014), por lo que también se les llama curvas de gelificación.

A pesar de la estadística no significativa, al analizar la Figura 21 puede observarse que el descenso del pH se da en un menor tiempo en las muestras tratadas con ultrasonido que en la muestra

control. Por ejemplo, la muestra con el tratamiento de sonicación por 45 minutos alcanza un pH igual a 5,38 a los 150 minutos, mientras que el tratamiento control logra un pH similar (5,41) a los 180 minutos. Una diferencia de 30 minutos en un proceso industrial podría representar ahorros energéticos a la empresa, además de menores tiempos de producción. Este comportamiento era el esperado ya que coincide con los reportes de la literatura. Bermúdez & Barbosa (2011), por ejemplo, afirman que con la sonicación se logra una reducción del tiempo de fermentación del yogurt debido a la estimulación de la producción de ácido gracias a la cavitación que favorece la hidrólisis de la lactosa.

Otros autores plantean diferentes mecanismos para explicar dicho descenso en el tiempo. Chandrapala *et al.* (2012) señalan que la formación de geles en productos tratados con ultrasonido es diferente de los efectos inducidos por los cambios de pH. Patist & Bates (2008) en cambio, exponen que el ultrasonido de alta intensidad puede romper células y desnaturalizar enzimas por la cavitación originada, mejorando la transferencia de masa entre reactivos y productos a través de la membrana y la pared celular, estimulando la degradación de lactosa y consecuente acidificación.

Tiwari & Mason (2012) así como Ojha *et al.* (2017) comparten dicha teoría al afirmar que el ultrasonido provoca un impacto estimulador a nivel biológico debido al aumento de la permeabilidad de la membrana celular y a mayores tasas de transferencia de nutrientes, lo que conduce a un aumento en la eficiencia de la fermentación (Bermúdez & Barbosa, 2011). Matsuura *et al.* (1994) propusieron que dicho mecanismo se debe a que el ultrasonido, como excelente agente desaireador, estimula la eliminación del CO₂ producido durante la fermentación, el cual normalmente la inhibe.

De acuerdo con Lee & Lucey (2010), la gelificación se da a un pH entre 5,2 y 5,4 para una leche que ha recibido tratamiento térmico. En este caso el único calentamiento de la leche se dio a 43 °C durante el proceso de disolución de los sólidos y durante. Aunque no se realizó una prueba de textura con cada medición de pH, se observó un efecto similar al reportado por estos autores, ya que al alcanzarse un pH cercano a 5,2 – 5,0 se podía observar la formación de coágulo en las muestras de yogurt con leche sonicada al insertar el electrodo. Lo anterior puede reafirmarse con lo mostrado en la Figura 21, donde la caída brusca de pH se da entre 5,50 y 5,0 entre los 100 y 200 minutos, aproximadamente la segunda y tercera hora de fermentación.

Ojha *et al.* (2017) se refieren a industria moderna de fermentados como altamente competitiva e innovadora, siempre a la vanguardia en las nuevas tecnologías para mejorar los procesos de fermentado y obtener productos de mejor calidad. En este marco, la industria de derivados lácteos como el yogurt requiere nuevas técnicas para mejorar la productividad. Dado el potencial del ultrasonido para disminuir los tiempos de fermentación, éste puede convertirse en una herramienta valiosa para aportar beneficios a la industria en el mejoramiento de las tasas de fermentación, por lo que se requiere de más estudios que conduzcan a resultados concluyentes y que soporten dichas teorías.

5.6. Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche sobre el agrado general del consumidor

Los atributos sensoriales y el sabor que presente un yogurt griego tienen gran influencia en la aceptación del consumidor hacia el producto (Desai *et al.*, 2013), por lo que, para evaluar el efecto del ultrasonido de leche de vaca sobre el agrado general del consumidor, se realizó un panel de agrado general con 100 consumidores en el que probaron los yogures elaborados a partir de leche con distintos tiempos de sonicación.

Con base en los resultados obtenidos, se realizó un análisis de conglomerados (*Clusters*) para obtener el dendograma ilustrado en la Figura 22, el cual muestra la agrupación de los consumidores en tres categorías según las similitudes en cuanto a agrado, mostrados en color azul (Grupo 1), rojo (Grupo 2) y verde (Grupo 3).

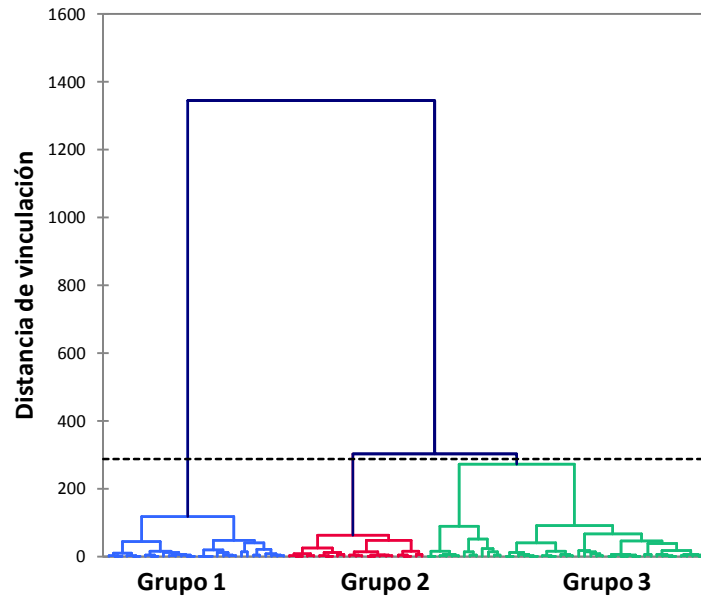


Figura 22. Dendrograma (*Joining Tree Clustering*) generado a partir de la prueba de agrado general con $n=100$ consumidores de yogurt griego.

La Figura 22 demuestra que el método de Ward identificó el mayor salto entre los centroides de los *clusters* cerca de la distancia de vinculación de 300, la cual define la cantidad de grupos formados a partir del dendrograma (Mirkin 2005).

Este método busca lograr una clasificación o agrupamiento de “ n ” individuos (casos) en “ g ” grupos (*clusters*) según el comportamiento de los mismos en una serie de variables (Díaz, 1998). En este caso se clasificaron los panelistas según el nivel de agrado hacia las cinco muestras de yogurt evaluadas en la prueba sensorial. Díaz (1998) indica que con el análisis de conglomerados no se busca explicar un fenómeno en concreto, sino clasificar una población en un número reducido de grupos.

Por medio del análisis de conglomerados se logra identificar las características de los grupos formados. Es importante caracterizar demográficamente los grupos resultantes para determinar cuál de ellos aporta información valiosa y de peso en cuanto al agrado general. Por este motivo a los consumidores se les solicitó información personal como género, edad y frecuencia de consumo de yogurt.

En la Figura 23 se presenta la conformación por género de los participantes del panel sensorial. La población evaluada fue mayoritariamente femenina, ya que se contó con una participación de 62 mujeres y 38 hombres.

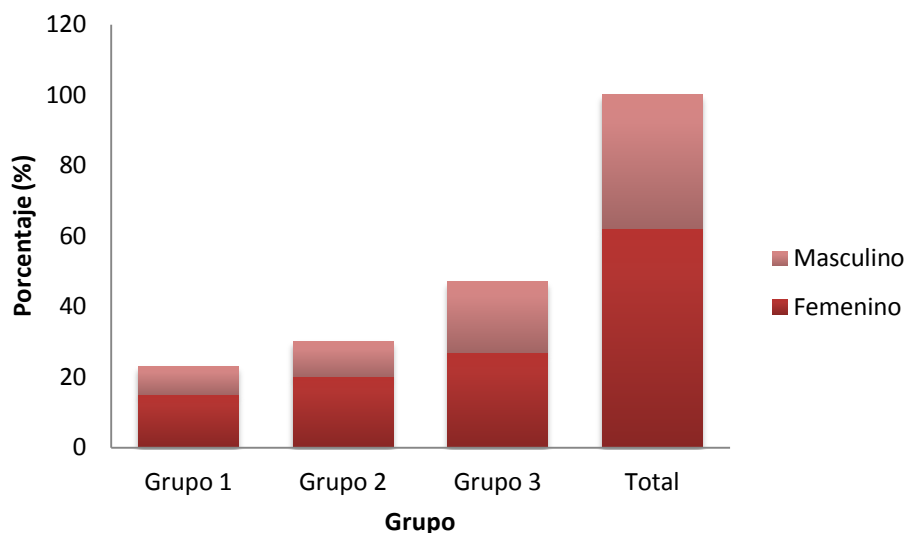


Figura 23. Conformación de los grupos respecto al género de los participantes.

En la Figura 24 se presenta la distribución por edades de los panelistas. En general la mayor participación (53%) se dio por parte de jóvenes de 21 a 30 años, sin embargo también se logra abarcar personas menores de 20 años e incluso hasta de 60 años. En este caso, tomando en cuenta que el estudio se realizó en la Escuela de Tecnología de Alimentos, el rango de población que participó corresponde en su mayoría a estudiantes universitarios que por lo general rondan edades de 21 a 30 años.

Aunque no hay un rango definido para los consumidores de yogurt, se puede decir que la población representa bien el mercado meta ya que el estudiante universitario generalmente tiene criterio al escoger sus productos de consumo y el yogurt es una merienda frecuente en personas jóvenes con tiempos de alimentación limitados (Food Navigator, 2015).

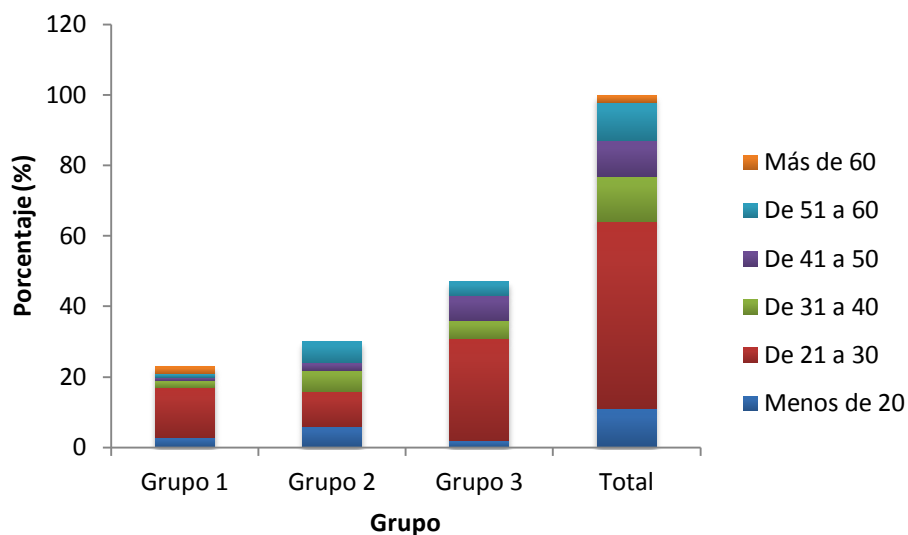


Figura 24. Conformación de los grupos respecto a la edad de los participantes.

Como último punto de la caracterización, uno de los más valiosos es la frecuencia de consumo de yogurt, ya que indicará qué tanto criterio tiene el panelista en la emisión de su juicio, desde que los consumidores regulares tienen más claros los atributos de valor en el producto que evalúan.

En la Figura 25 se presenta la conformación de los grupos respecto a la frecuencia de consumo, donde la mayoría de los panelistas resultaron consumir yogurt más de una vez por semana (37%), seguido por aquellos quienes consumen yogurt al menos una vez al día (20%). Que los participantes sean consumidores frecuentes del producto a evaluar es muy valioso para respaldar el análisis de datos ya que ofrece una imagen más clara y real de la calidad del producto, pues los evaluadores tienen criterio para juzgar el producto que están degustando.

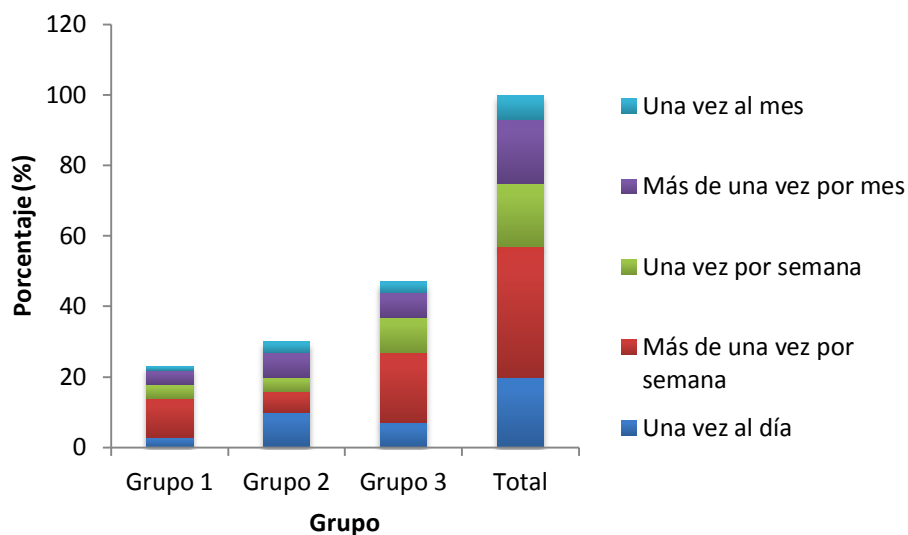


Figura 25. Conformación de los grupos respecto a la frecuencia de consumo de yogurt griego de los participantes.

Establecida la caracterización de los tres grupos, se procedió a realizar el análisis de varianza para la evaluación sensorial emitida por los consumidores. Los promedios de agrado de cada grupo para las cinco muestras de yogurt ofrecidas se presentan en la Figura 26.

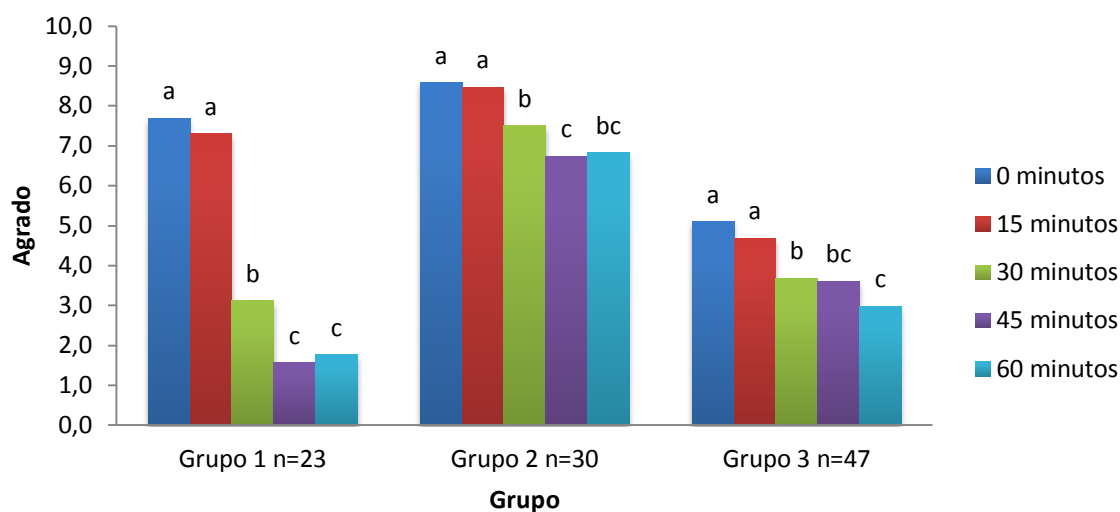


Figura 26. Agrado promedio de las muestras de yogurt griego elaborado con leche a distintos tiempos de sonicación para cada uno de los grupos del análisis de agrupamiento.

**Promedios con letras diferentes entre grupos indican diferencias significativas (Fisher LSD)*

Con un 95% de confianza se logró determinar que sí hubo un efecto significativo del tiempo de sonicación sobre el agrado general del yogurt griego en cada uno de los tres grupos ($p_{G1} < 0,0001$; $p_{G2} < 0,0001$; $p_{G3} < 0,0001$), en donde conforme aumenta el tiempo de sonicación, disminuye el agrado general del consumidor.

En la Figura 26 se observa que el yogurt sin tratamiento de sonicación y el sonificado por 15 minutos fueron los que resultaron con calificaciones más altas sin una diferencia significativa en su promedio. Tampoco hubo diferencia en el agrado entre los yogures sonicados por 45 y 60 minutos, los cuales obtuvieron las calificaciones más bajas. Las calificaciones altas se definen como aquellas iguales o mayores a 5,0 correspondientes al centro de la escala (“ni me gusta ni me disgusta”) sobre la cual se encuentra el rango de categorías de agrado hacia el producto. Así, Lim (2011) afirma que el uso de esta escala hedónica permite interpretar promedios por encima del punto medio de la escala como agrada y los inferiores como desagrado.

La Figura 26 indica que el grupo 2 fue el que calificó los yogures con el puntaje más alto. A pesar de que este grupo está conformado por una importante cantidad de personas, es posible que la información que aporta no refleje el verdadero comportamiento del agrado ya que los participantes pueden tener la tendencia de asignar calificaciones altas a todas las muestras. Caso contrario al grupo 3, que a pesar de contener al mayor número de consumidores, los participantes evaluaron todas las muestras con puntuaciones muy bajas. Este comportamiento puede presentarse porque el panelista tiende a utilizar su preferencia numérica y no todo el rango de la escala (Lawless & Malone, 1986).

En cambio, el grupo 1 a pesar de contener un número más pequeño de participantes, éstos utilizan todo el rango de la escala hedónica para señalar su agrado hacia las muestras durante la evaluación sensorial y como el 60% de los panelistas del grupo reporta consumir yogurt de una vez al día a más de una vez por semana, la calificación asignada se considera un reflejo certero del agrado del consumidor hacia este tipo de productos. Con esto se obtuvo que el yogurt sin sonicación y el sonificado por 15 minutos no presentaron diferencia significativa en su puntuación, lo que permite que, en caso de ser requerido por la industria, se podría aplicar un tratamiento de sonicación leve para propiciar efectos benéficos determinados en apartados anteriores, como disminución del tiempo de fermentación y fragmentación de glóbulos de grasa. Se obtuvo además

que resulta indiferente sonicar la leche 45 o 60 minutos ya que ambos presentan calificaciones de agrado realmente bajas.

Lo anterior era de esperarse puesto que en las pruebas realizadas de caracterización fisicoquímica, éstos mismos tratamientos fueron los que presentaron atributos más pobres, como pérdida de firmeza y consistencia. Desai *et al.* (2013) encontraron que las propiedades sensoriales del yogurt griego difieren con el contenido de grasa y forma de manufactura, existiendo diferencias principalmente en la textura y no tanto en cuanto a sabor. Encontraron además que los consumidores prefieren los yogures griegos con textura firme y densa, aromáticos, de dulzor moderado. Esto da fundamento al por qué de las calificaciones brindadas por los panelistas, ya que los yogures sin sonicación o con el menor tratamiento (15 minutos) fueron los que resultaron más agradables y era justamente los que tenían mejor textura.

Es importante destacar que para salvaguardar la seguridad del consumidor, la leche con la que se prepararon los yogures recibió una pasteurización térmica a baja temperatura (63°C/30 minutos) para asegurar la inocuidad con la menor influencia posible a las características de la leche.

Con la prueba sensorial se logró determinar si la sonicación realmente es una tecnología factible para la industria procesadora de yogurt y su mercado, ya que la misma no aportaría valor real si los procesos de manufactura se ven beneficiados pero el consumidor no muestra un agrado considerable que permita comercializar el producto de manera exitosa. Los resultados demuestran que para lograr un producto sonicado agradable para el consumidor, el tiempo de sonicación no debe exceder los 15 minutos.

Sería valioso realizar una segunda prueba sensorial confirmatoria en la que se le consulte al consumidor las razones de su puntuación así como la intención de compra, lo que daría un panorama más claro e indicaría los atributos valorados por el comprador para enfocarse en ellos al desarrollar productos sonicados.

5.7. Exploración del efecto del tiempo de sonicación sobre distribución del tamaño de partícula de los glóbulos de grasa del yogurt griego

Dukhin *et al.* (2005) señalan a la leche como el candidato ideal para verificar la influencia de las técnicas de ultrasonido sobre los tamaños de partícula, ya que se le atribuye una sustancial capacidad de reducir el tamaño de los glóbulos de grasa conduciendo a la homogenización. Por lo

tanto, se realizó un estudio exploratorio para observar el efecto del tiempo de sonicación sobre la distribución y el tamaño de los glóbulos de grasa, tanto en la leche sonicada como en el yogurt elaborado y con ello respaldar e ilustrar los resultados obtenidos en las pruebas anteriores.

5.7.1. Distribución del tamaño de partícula

Utilizando el equipo de difracción láser propiedad del LANNAME, fue posible medir la distribución del tamaño de partícula de cinco muestras de leche cruda entera de vaca con diferentes tratamientos de sonicación. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 27, en la que es posible apreciar una disminución del tamaño de los glóbulos de grasa conforme aumenta el tiempo de sonicación, así como un incremento en la frecuencia en la que estas partículas de menor tamaño están presentes. Terefe *et al.* (2016) reportan el mismo efecto atribuido a la cavitación.

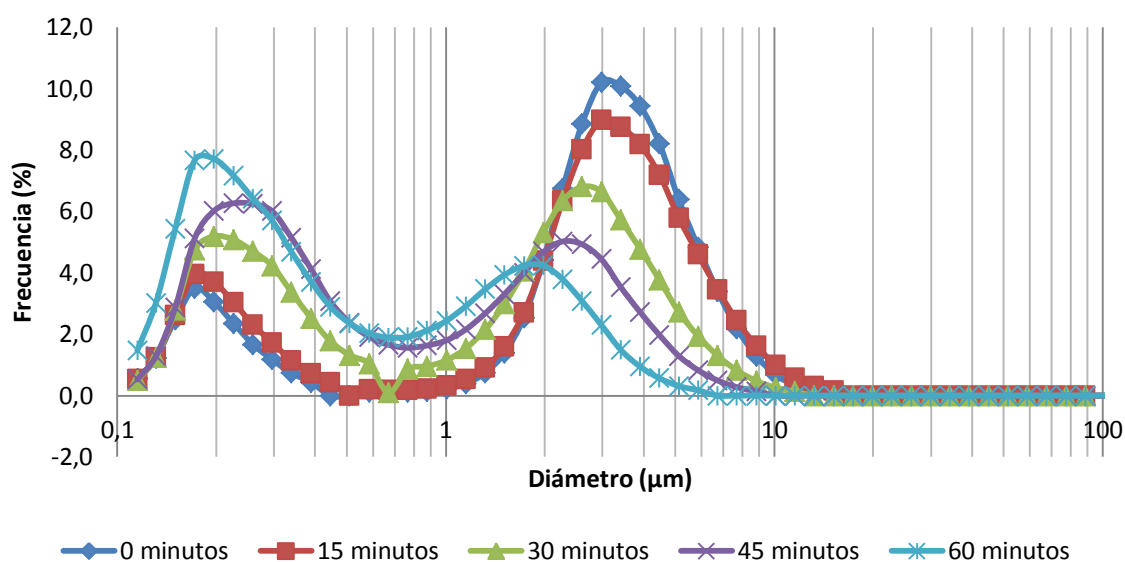


Figura 27. Distribución del tamaño de partícula de los glóbulos de grasa de leche cruda entera de vaca con diferentes tiempos de sonicación.

Al analizar la Figura 27, en la curva del tratamiento control (0 minutos de sonicación) se observa el pico más alto a 3 μm con una frecuencia cercana al 10%, siendo ésta la leche con los glóbulos de grasa de mayor tamaño y con menor frecuencia de partículas pequeñas. Al observar la curva de la leche con menor tratamiento de sonicación (15 minutos), el pico derecho, aunque continua a 3 μm, ha reducido su frecuencia a la vez que el pico izquierdo la ha incrementado, lo que significa

que el tratamiento de ultrasonido ha provocado una disminución del tamaño y hay partículas de menor diámetro.

Si se ve la curva del tratamiento 30 minutos, resalta que la frecuencia de las partículas mayores a 1 μm continúa disminuyendo mientras que aquellas de diámetro cercano a 0,2 μm aumentan. A los 45 minutos de sonicación no sólo ya empieza a notarse un desplazamiento de la curva hacia la izquierda, teniendo menor frecuencia de partículas de 2,5 μm , sino que además la frecuencia de glóbulos de 0,2 μm aumenta, reafirmando la existencia del fenómeno de fragmentación de los glóbulos de grasa con el ultrasonido. En el máximo tratamiento de sonicación aplicado (60 minutos), se obtuvo la curva de menor frecuencia de partículas de 2 μm y la mayor frecuencia de partículas con diámetro 0,17 μm .

Otra característica importante que sobresale en la Figura 27 es la variación en el grosor de las curvas Gaussianas, en donde conforme aumenta el tiempo de sonicación las campanas se ensanchan, denotando la fragmentación de las partículas y por ende menos uniformidad y frecuencia de un mismo diámetro; es decir, el rango de distribución del diámetro se amplía.

Los resultados observados coinciden con lo esperado, pues según reportan Tiwari & Mason (2012) el ultrasonido tiene la capacidad de dispersar y homogenizar debido a la turbulencia característica de la cavitación producida en interfases líquido-líquido, la cual libera energía facilitando la emulsión. Comparado contra la agitación mecánica, la sonicación requiere menos agentes surfactantes y produce glóbulos más pequeños y estables (Awad *et al.*, 2012).

Para ilustrar y contrastar este fenómeno, la Figura 28 expone la distribución de los glóbulos de grasa en leche comercial, la cual ha recibido tratamiento de homogenización severo. En la misma figura se presenta además la distribución del tamaño de los glóbulos de grasa de leche cruda, sin tratamiento de ningún tipo. En ella se observa la notoria diferencia entre las muestras, a la vez que se reafirma el diámetro cercano a 0,2 μm de los glóbulos fragmentados producto de una homogenización, muy similar al tamaño de los glóbulos resultantes en la leche con un tratamiento de 60 minutos de sonicación. Resalta además que 100% de las partículas de la leche homogenizada se encuentra entre 0,3 y 0,4 μm , mientras que la leche cruda presenta un amplio rango, presentando una ligera mayoría de 2 a 3 μm .

Se realizaron las mismas mediciones en yogurt griego elaborado con leche cruda con distintos tiempos de sonicación y los resultados obtenidos fueron muy similares, obteniendo las curvas que se muestran en la Figura 29.

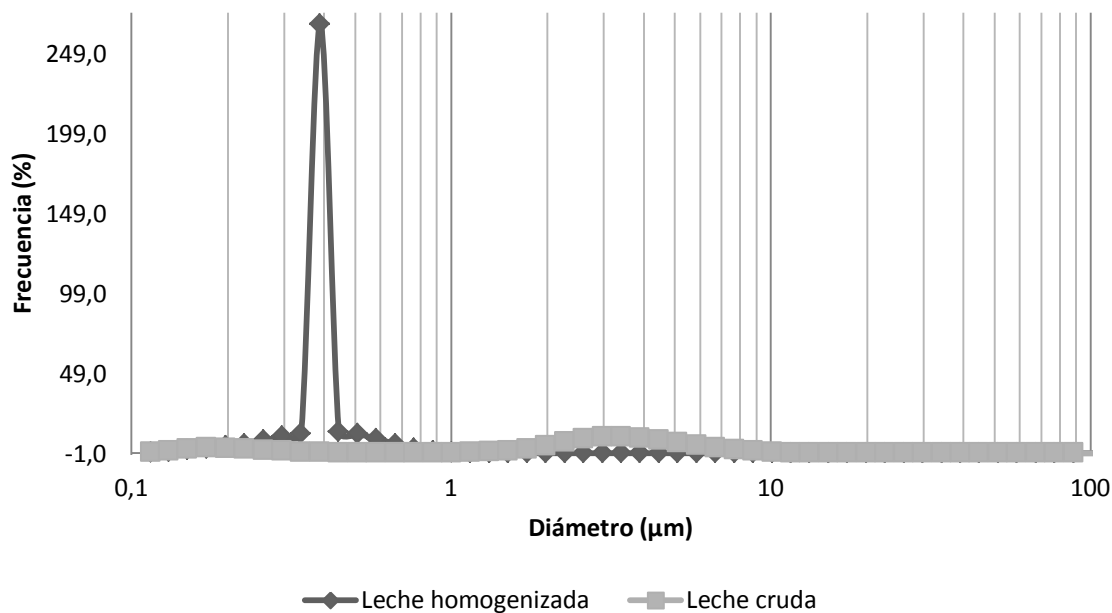


Figura 28. Distribución del tamaño de partícula de los glóbulos de grasa de leche cruda entera de vaca y leche con homogenización comercial.

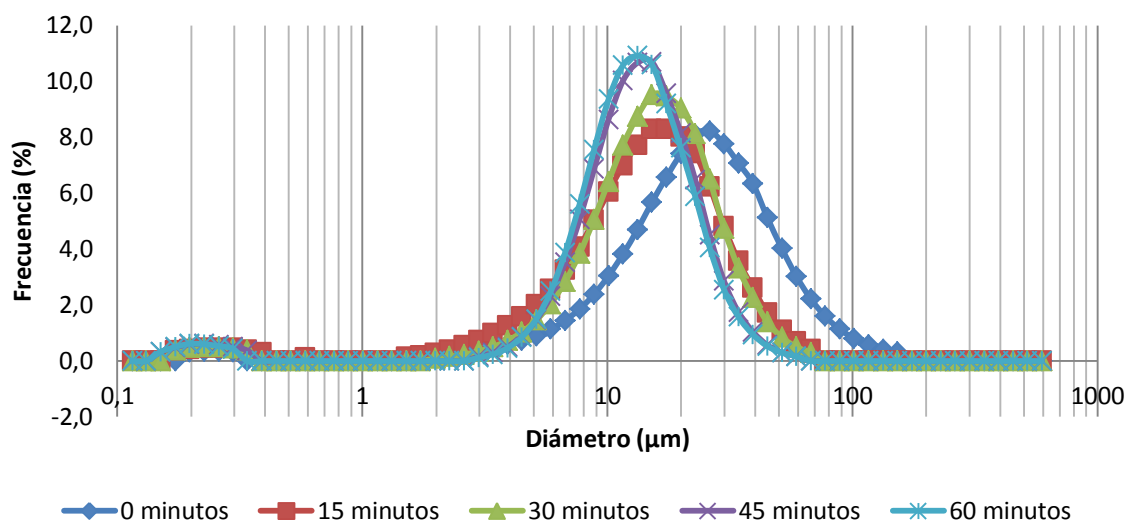


Figura 29. Distribución del tamaño de partícula de muestras de yogurt griego elaborado con leche a distintos tiempos de sonicación.

En la figura anterior se observa el mismo efecto presentado en las curvas de leche de la Figura 27: conforme aumenta el tiempo de sonicación, disminuye el tamaño de partícula. En este caso para yogurt, se obtuvo diámetros mayores debido a la adición de sólidos (proteínas, estabilizantes, azúcares) propia del proceso de elaboración de yogurt. Pese a utilizar el índice de refracción específico para la grasa, posiblemente ésta se ligó con moléculas de mayor tamaño, debido a la cual se presume que no fue posible para el equipo seleccionar únicamente los glóbulos de grasa individuales.

Puede observarse también que conforme aumenta el tiempo de sonicación, las campanas Gaussianas no sólo se desplazan hacia la izquierda, sino que también aumentan su frecuencia y se hacen más angostas, lo que se traduce en una fragmentación de los glóbulos de grasa de manera más uniforme, es decir en un menor rango de diámetro. Se observan además efectos similares en las curvas de los tratamientos 15 y 30 minutos y en 45 y 60 minutos. En las curvas izquierdas la conglomeración no permite ver el efecto en esa zona.

Noci (2017) comenta los beneficios de la utilización del ultrasonido en la industria de lácteos procesados, tanto leches como sus derivados, ya que genera emulsiones más estables al homogenizar los glóbulos de grasa. El autor reporta que tanto la amplitud como los tiempos de sonicación son factores importantes para obtener tamaños de partícula menores y por ende emulsiones más estables.

5.7.2. Microscopía óptica

Las micrografías obtenidas por microscopía óptica ayudan a confirmar la tendencia descrita, ya que puede apreciarse un incremento en la uniformidad del tamaño de las partículas conforme aumenta el tiempo de sonicación, como se observa en las Figuras 30 y 31.

La Figura 30 ilustra el fenómeno ocurrido en la leche. La imagen a) muestra el tratamiento control, en el que se observan los glóbulos de grasa de una leche cruda con mucha variación en el tamaño de las partículas, ya que según la escala de 20 μm de la esquina inferior derecha, pueden encontrarse esferas de hasta aproximadamente 40 μm de diámetro, pero en general se aprecia una matriz poco uniforme en cuanto a tamaño de glóbulos.

Conforme avanza el tiempo de sonicación, puede observarse un aumento en la uniformidad de las matrices. La imagen d) por ejemplo, que muestra la leche tratada con 45 minutos de sonicación,

presenta glóbulos de menor tamaño en relación con las otras imágenes y una densidad mayor de partículas.

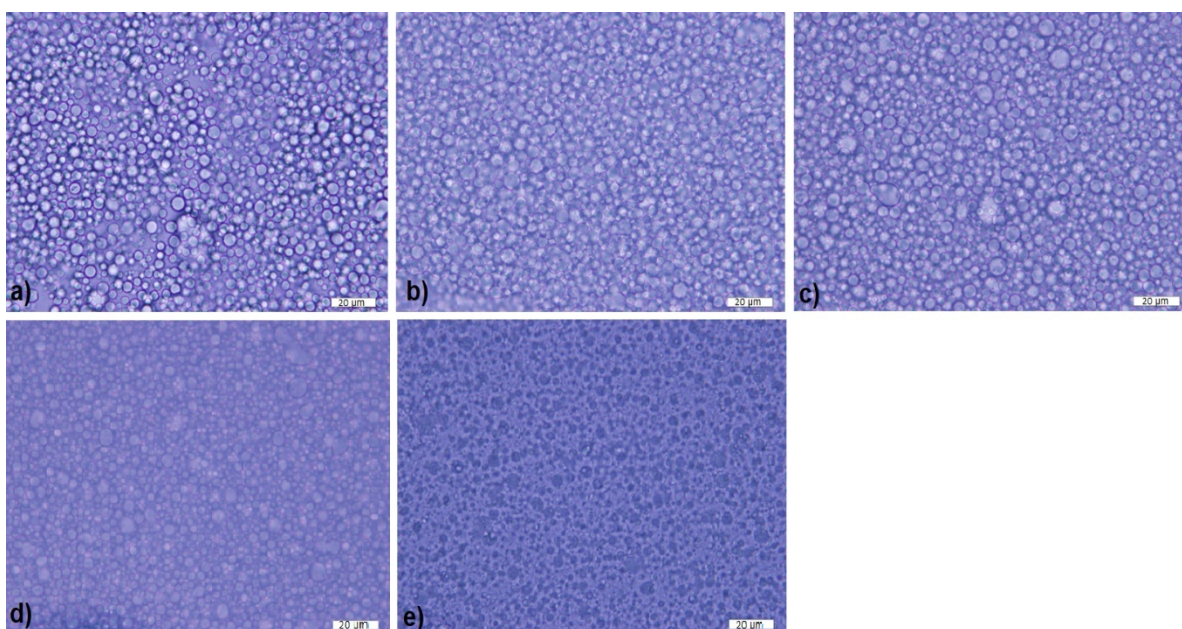


Figura 30. Micrografías obtenidas por microscopía óptica a 100x para cinco muestras de leche entera tratada a diferentes tiempos de sonicación: a) 0 min, b) 15 min, c) 30 min, d) 45 min, e) 60 min.

La Figura 31, aunque con menor nitidez, muestra el mismo efecto descrito para la leche de la Figura 27. La imagen a) presenta las partículas de composición del yogurt elaborado con leche cruda. Puede observarse poca uniformidad y muchas partículas globulares de gran tamaño, mientras que las imágenes que ilustran las muestras con mayor tratamiento de ultrasonido, como la d) por ejemplo con 45 minutos de sonicación, muestra glóbulos esféricos más pequeños y en menor densidad.

Las fotografías tomadas con microscopio permiten obtener información de la microestructura de las matrices en estudio y relacionar las imágenes resultantes con los valores cuantitativos, y así obtener una descripción gráfica que apoye los resultados numéricos. Las micrografías de las figuras 30 y 31 permiten sustentar las exploraciones realizadas en cuanto a los efectos de homogenización del ultrasonido. Sin embargo, se trata sólo de estudios observacionales. Dada la baja nitidez conseguida por la complejidad de las matrices, es importante repetir dichas observaciones al microscopio para confirmar las exploraciones iniciales y obtener evidencia

suficiente y concluyente, ya que podría representar un aporte valioso para las investigaciones en la industria láctea.

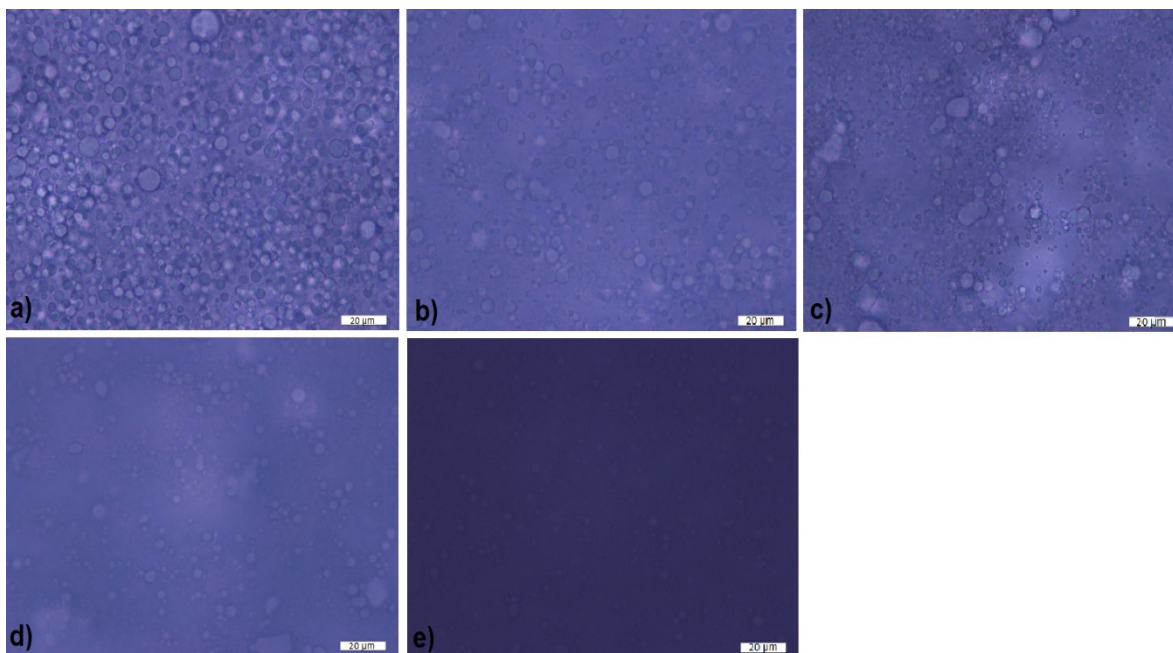


Figura 31. Micrografías obtenidas por microscopía óptica a 100x para cinco muestras de yogurt griego elaborado con leche entera con distintos tiempos de sonicación: a) 0 min, b) 15 min, c) 30 min, d) 45 min, e) 60 min.

6. CONCLUSIONES

1. La sonicación bajo los parámetros utilizados (20 kHz de frecuencia, amplitud al 40% y 50 W de energía) no es efectiva como método antimicrobiano ya que la magnitud de la reducción de *E. coli* no tiene relevancia práctica.
2. Se estima que si la sonicación no fue capaz de provocar la reducción de un microorganismo indicador, tampoco lo hará para un microorganismo de referencia.
3. La alta variabilidad en los resultados no permitió exponer diferencias a nivel estadístico del efecto de la sonicación sobre la textura del yogurt griego.
4. Bajo las condiciones de ultrasonido utilizadas para la leche cruda, la sonicación por sí sola no aporta valor a la industria del yogurt en términos de aumento del rendimiento, capacidad de retención de agua y sinéresis, ya que estos parámetros no se ven influenciados positivamente.
5. El tiempo de sonicación presentó un efecto significativo en las diferencias de color resultante para el suero exudado en donde los sueros con mayor exposición al ultrasonido fueron más limpios y claros con disminución de la tonalidad blanquecina.
6. Conforme aumenta el tiempo de sonicación de la leche, se obtiene un menor agrado general del consumidor de yogurt.
7. Experimentalmente, conforme aumenta el tiempo de sonicación se observó una mayor fragmentación de los glóbulos de grasa de la leche, pasando los diámetros de 3 μm a 0,2 μm .
8. De manera exploratoria conforme aumenta el tiempo de sonicación de la leche se observó una fragmentación de las partículas de manera más uniforme.

7. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio de almacenamiento previo para evaluar la interacción entre posibles daños a la célula bacteriana con las etapas de proceso de elaboración de yogurt griego.
- Evaluar capacidad de adaptación al ácido de *Escherichia coli*.
- Revisar cuáles propiedades de los productos lácteos pueden ser extraídas por mediciones con ultrasonido, así como la precisión requerida de dichas mediciones para caracterizar adecuadamente estas propiedades y determinar un efecto significativo.
- Evaluar la posibilidad de desarrollar el experimento variando los parámetros de frecuencia y energía del ultrasonido, para determinar si a una mayor frecuencia se consigue aumentar la reducción bacteriana y propiciar efectos positivos en las características reológicas.
- Determinar la concentración de proteínas del suero y caseínas presentes en el suero exudado durante el desuerado en la elaboración de yogurt griego para relacionar el resultado con la fuerza del gel, el rendimiento obtenido y el color consiguiente en el suero.
- Determinar el porcentaje de grasa en los yogures finales para evaluar si aumenta o disminuye con la sonicación y relacionar el resultado con la homogenización conseguida y el grado de interacciones entre los glóbulos fragmentados y las micelas de caseína y proteínas séricas.
- Realizar un estudio que determine el efecto del ultrasonido específicamente en las proteínas de la leche para determinar el grado de desnaturalización causada. Con esto se pretende evaluar si los resultados de poca firmeza, poca capacidad de retención de agua y aumento en la sinéresis, se deben a la falta de desnaturalización requerida para formar el gel o más a un exceso de daño en la estructura proteica tal que no permite el enrejado.
- Diseñar una metodología que permita determinar el tiempo de sonicación óptimo para lograr la mayor disminución del tiempo de fermentación del yogurt, ya que se observa una tendencia irregular.
- Diseñar estudios de aplicación de ultrasonido de baja intensidad (alta frecuencia) para estudiar atributos sensoriales como textura y sensación en la boca (*mouthfeel*) de alimentos lácteos de alto contenido de grasa como mantequilla, crema dulce, yogurt y leches enteras.
- Utilizar ultrasonido de baja intensidad (alta frecuencia) para realizar estudios de microestructura y obtener imágenes más definidas del efecto del ultrasonido en la conformación de las partículas de la leche y el yogurt.

- Realizar estudio en yogurt con pasteurización térmica pero observando efecto sinérgico del ultrasonido de alta intensidad (baja frecuencia) en las propiedades fisicoquímicas, tiempo de fermentación, formación de gel.

8. BIBLIOGRAFÍA

- AKALIN, A. S., UNAL, G., DINKCI, N. & HAYALOGLU, A. A. 2012. Microestructural, textural and sensory characteristics of probiotic yogurts fortified with sodium calcium caseinate or whey protein concentrate. *Journal of Dairy Dairy Science*, 95. (7). 3617-3628.
- AKDEMIR, G. 2015. Non-thermal processing of milk and milk products for microbial safety. In Özer, B.H. & Akdemir G. eds Dairy microbiology and biochemistry. CRC Press Taylos & Francis Group. Estados Unidos.
- ÁLVAREZ, M. L. 2012. Comparación de las características fisicoquímicas y sensoriales de leche de cabra entera, descremada y deslactosada (entera y descremada) con las respectivas leches análogas de vaca, y de natilla elaborada con ambos tipos de leche. Trabajo Final de Graduación para optar por el título de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José, Costa Rica.
- ÁLVAREZ, V.B. & JI, T. 2003. Emerging processing and preservation technologies for milk and dairy products. In Gutiérrez, G. F. & Barbosa, G. V. eds Food Science and Food Biotechnology. CRC Press Taylor & Francis Group. Estados Unidos.
- AMERICAN CULINARY FEDERATION. sf. Greek yogurt: Ingredient of the month. Florida, Estados Unidos. [INTERNET] Recuperado 14/03/2017. Disponible en http://www.acfchefs.org/download/documents/ccf/nutrition/2012/201203_ingredient_greek_yogurt.pdf
- ANON. 2004. Codeo g Hygienic Practice for Milk and Milk Products. Washington D.C. USA. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. CODEX Committee on Food Hygienic, 26th Session. p88.
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis. 18ed. Métodos 981.12 y 934.06. Association of Official Analytical Chemists. Maryland.
- ARANCETA, J. & SERRA, LI. 2004. Leche, lácteos y salud. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.

- ARAYA, T. 2013. Evaluación del efecto de la incorporación de proteína de suero dulce en un yogurt batido de fresa, bajo en grasa. Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Escuela de Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- ARCE, J. R. 2011. Incorporación de proteína de suero en la elaboración de un queso blanco y valoración del efecto provocado en su rendimiento, agrado general y contenido de triptófano. Tesis de Licenciatura en Tecnología de Alimentos. Escuela de Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- ARGUEDAS, N. 2010. Determinación de la sobrevivencia del cultivo probiótico *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (LC-01®) en un queso crema durante su almacenamiento y su influencia sobre la aceptación por consumidores, el pH, la textura y los costos variables. Tesis de Licenciatura en Tecnología de Alimentos. Escuela de Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- ARROYO, C., CERÍAN, G., PAGÁN, N. & CONDÓN, S. 2011. Inactivation of *Cronobacter sakazakii* by manothermosonication in buffer and milk. *International Journal of Food Microbiology*, 151: 21-28.
- ASHOKKUMAR, M., BASHKARACHARYA, R., KENTISH, S., LEE, J., PALMER, M. & ZISU, B. 2010. The ultrasonic processing of dairy products – an overview. *Dairy Science and Technology*, 90:147-168.
- ASHOKKUMAR, M., LEE, J., ZISU, B., BHASKARCHARYA, R., PALMER, M. & KENTISH, S. 2009. Hot topic: Sonication increases the heat stability of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 92: 5353-5356.
- ATAMIAN, S.; OLABI, A.; BAGHDADI, O. & TOUFEILI, I. 2014. The characterization of the physicochemical and sensory properties of full-fat, reduced-fat and low-fat bovine, caprine and ovine Greek yogurt (Labneh). *Food Science & Nutrition*, 2 (2): 164-173.
- ATCC. 2015. Product sheet. *Escherichia coli* (ATCC 25922). ATCC, Estados Unidos.
- AWAD, T.S., MOHARRAM, H.A., SHALTOUT, O.E., ASKER, D. & YOUSSEF, M.M. 2012. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 48(2012): 410-427.

- AZOFEIFA, C. 2016. Evaluación de la aceptación sensorial y del concepto producto de tres mermeladas de vegetales con especias y determinación de la vida útil de la mermelada más susceptible al deterioro mediante un estudio de almacenamiento. Trabajo Final de Graduación para optar por el título de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica. Escuela de Tecnología de Alimentos. San José, Costa Rica.
- BELITZ, H.; GROSH, W. & SCHIEBERLE, P. 2009. Química de los Alimentos. Springer. Alemania.
- BERMÚDEZ, D. & BARBOSA, G. 2011. Power ultrasound to process dairy products. Chapter 6 in Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing. Springer Science + Business Media. Washington, Estados Unidos.
- BERMÚDEZ, D., CORRADINI, M. G., MAWSON, R. & BARBOSA, G. V. 2009. Modeling the inactivation of *Listeria innocua* in raw whole milk treated under thermo-sonication. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10: 172-178.
- BERMÚDEZ, I. M. 2012. Efecto de diversos parámetros del proceso de sonicación, seguido de un almacenamiento en alta presión osmótica, sobre la reducción de *Salmonella* Typhimurium y *Lactobacillus rhamnosus* en soluciones modelo y su aplicación en jugos de frutas. Trabajo Final de Graduación para optar por el título de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica. Escuela de Tecnología de Alimentos. San José, Costa Rica.
- BOOR, K. J. & MURPHY, S. C. 2002. Microbiology of market milks. In Robinson, R. K. ed Dairy microbiology handbook: The microbiology of milk and milk products. John Wiley and Sons, Estados Unidos.
- BOURNE, M. 2002. Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement. 2nd ed. Academic Press, New York, Estados Unidos.
- BRENES, L. 2008. Evaluación del concepto y estudio de la aceptación de un producto a base de café variedad *Coffea arabica* L., empacado para infusión en bolsitas “tipo té”. Trabajo Final de Graduación para optar por el título de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José, Costa Rica.
- BUSTA, F. F., SUSLOW, T. V., PARISH, M. E., BEUCHAT, L. R., FARBER, J. N. GARRETT, E. H. & HARRIS, L. J. 2013. The use of indicators and surrogate microorganisms for the evaluation of

- pathogens in fresh and fresh-cut produce. In FDA. Ed. Preventive control measures for fresh & fresh-cut produce. [INTERNET]. Recuperado 14/03/2017. Disponible en <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm091372.htm>
- CÁMARA NACIONAL DE PRODUCTORES DE LECHE DE COSTA RICA. 2017. Consumo de Productos Lácteos. [INTERNET] Recuperado 26/02/2019. Disponible en <http://proleche.com/consumo-de-productos-lacteos/>
- CÁMARA NACIONAL DE PRODUCTORES DE LECHE DE COSTA RICA (CNPL); SECRETARÍA DE INTEGRACIÓN ECONÓMICA DE CENTROAMÉRICA (SIECA). 2009. Información del sector 2010. [INTERNET] Recuperado 23/01/2017. Disponible en http://www.proleche.com/info_sector.htm
- CHACÓN, A. 2004. Acidez y peso específico de la leche de cabra de un grupo de capricultores en la Meseta Central Costarricense. *Revista Agronomía Centroamericana*, 15 (2): 179-183.
- CHANDRAPALA, J., MARTIN, J.G., KENTISH, S. & AHOKKUMAR, M. 2014. Dissolutions and reconstitution of casein micelle containing dairy powders by high shear using ultrasonic and physical methods. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21:1658-1665.
- CHANDRAPALA, J., MARTIN, G., ZISU, B., KENTISH, S. & ASHOKKUMAR, M. 2012a. The effect of ultrasound on casein micelle integrity. *Journal of Dairy Science*, 95: 6882-6890.
- CHANDRAPALA, J., OLIVER, C., KENTISH, S. & ASHOKKUMAR, M. 2012b. Ultrasonics in food processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19: 975-983.
- CHANDRAPALA, J., ZISU, B., KENTISH, S. & ASHOKKUMAR, M. 2013. Influence of ultrasound on chemically induced gelation of micellar casein systems. *Journal of Dairy Science*, 1: 1-6.
- CHEMAT, F., HUMA, Z. & KAMRAN, M. 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18: 813-835.
- CITA. 2014 a. Determinación de pH, P-SA-MQ-012. Emisión N° 5. San José, Costa Rica.
- CITA. 2014 b. Recuento de mesófilos aerobios, P-SA-MM-001. Emisión N° 2. San José, Costa Rica.

- CHR HANSEN. 2013. Especificación de producto. YoFlex®Mild 1.0.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. 2010. Codex Standard for fermented milks. Codex Stan 243-2003.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. 2004. Report of the Thirty-sixth Session of the Codex Committee on Food Hygiene. Joint FAO/WHO Food Standard Programme. Washington, D.C. Estados Unidos.
- COSTA, A. & JONGEN, W. 2006. New insights into consumer-led food product development. *Trends in Food Science and Technology*, 17: 457-465.
- CONDÓN, S., RASO, J. & PAGÁN, R. 2005. Microbial inactivation by ultrasound. In G.V. Barbosa-Canovas, M.S. Tapia & M.P. Cano (Eds). *Novel food processing technologies*. Boca Raton, Estados Unidos: CRC Press (Capítulo 19).
- CONNER, D. E & KOTROLA, J. S. 1995. Growth and survival of *Escherichia coli* O257:H7 under acid conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (1): 382-385.
- CUBERO, E. 2016. Información referente al diseño experimental y análisis de datos del panel sensorial en la prueba de agrado general. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José, Costa Rica. Comunicación personal.
- DAIRY UK. 2015. Code of practice for the composition and labeling of yogurt. Londres. [INTERNET] Recuperado 13/05/2018. Disponible en <http://www.dairyuk.org/media-area/resources/item/yogurt-cop>
- D'AMICO, D., SILK, T., WU, J. & GUO. M. 2006. Inactivation of Microorganisms in milk and apple cider treated with ultrasound. *Journal of Food Protection*, 69(3): 556-563.
- DEPARTAMENTO DE ESTADÍSTICA E INVESTIGACIÓN OPERATIVA. 2011. Análisis de datos multivariantes. Universidad de Granada, España.
- DESAI, N. T., SHEPARD, L. & DRAKE, M. A. 2013. Sensory properties and drivers of liking for Greek yogurts. *Journal of Dairy Science*, 96 (12): 7454-7466.

- DÍAZ, V. 1998. Diseño de tipologías de consumidores mediante la utilización conjunta del Análisis de Cluster y otras técnicas multivariantes. *Economía Agraria*, 182: 75-104.
- DMV INTERNATIONAL. 2009. Product sheet. Textrion™PROGEL 800. Estados Unidos.
- DOWDEN, A. 2013. The good yogurt guide. Daily Mail. [INTERNET] Recuperado 13/05/2018. Disponible en <http://www.dailymail.co.uk/health/article-19005/The-good-yoghurt-guide.html>
- DUKHIN, A.S. GOETZ, P.J. & TRAVERS, B. 2005. Use of Ultrasound for Characterizing Dairy Products. *Journal of Dairy Science*, 88 (4): 1320-1334.
- EL-HABBADI, N.; DAO, M. & MEYDANI, S. 2014. Yogurt: role in healthy and active aging. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99 (5): 1263-1270.
- EXPONENT. 2012. Comparison of consistencies of full-fat and low-fat yoghurt by back extrusion. Application Study for TA.XT Plus Texture Analyzer. Stable Macro Systems Ltd. Reino Unido.
- FARCOMENI, A. & GRECO, L. 2015. Robust Methods for Data Reduction. Chapman & Hall, CRC Press. Florida.
- FDA. 2001. Hazard analysis and critical control point (HACCP) procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice. Federal Register. 66.6138-6202.
- FDA. 2013. Yogurt. 21 CFR 131.200. Código de Regulaciones Federales de la Administración de Alimentos y Medicamentos. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos.
- FDA. 2011. Grade A pasteurized milk ordinance, 2011 revision. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos. Servicios de Salud Pública de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos.
- FISBERG, M. & MACHADO, R. 2015. History of yogurt and current patterns of consumption. *Nutrition Reviews*, 73(S1)4-7.
- FISHER, P. & WINDHAD, E.J. 2011. Rheology of food materials. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci*, 16: 36-40.

- FOEGEDING, E.A., DAUBERT, C.R., DRAKE, M.A., ESSICK, G., TRULSSON, M. & VINYARD, C.J. 2011. A comprehensive approach to understanding textural properties of semi- and soft-solids foods. *Journal of Texture Studies*, 42: 103-129.
- FOOD NAVIGATOR. 2015. The Greek yogurt category is heating up again, says Chobani citing latest Nielsen data. Estados Unidos. [INTERNET] Recuperado 15/8/2016. Disponible en <http://www.foodnavigator-usa.com/Trends/Greek-yogurt/The-Greek-yogurt-category-is-heating-up-again-says-Chobani>
- FOXNEWS. 2015. What's new with the Greek yogurt trend? [INTERNET] Recuperado 15/8/2016. Disponible en <http://www.foxnews.com/leisure/2015/09/30/what-new-with-greek-yogurt-trend/>
- FRANCIS, J. 2005. Colorimetric properties of foods. In Rao, A., Datta, A. & Rizvi, H. Engineering properties of food. 3era edición. CRC Press. Nueva York. Pp30.
- FULLER, G. 2001. Food, Consumers and the Food Industry: Catastrophe or Opportunity? CRC Press. Florida. Estados Unidos.
- GALLEGO-JUÁREZ, J., RODRÍGUEZ, G., ACOSTA, V. & RIERA, E. 2010. Power ultrasonic transducers with extensive radiators for industrial processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(6): 953-964.
- GAN, G. 2011. Data clustering in C++. An object-oriented approach Chapman & Hall, CRC Press, Florida.
- GAO, S., LEWIS, G., ASHOKKUMAR, M. & HEMAR, Y. 2014. Inactivation of microorganism by low-frequency high-power ultrasound: 1. Effect of grow phase and capsule properties of the bacteria. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(2014): 446-453.
- GOGATE, P.R., TAYAL, R.K. & PANDIT, A.B. 2006. Cavitation: A technology on the horizon. *Current Science*, 91(1): 35-46.
- GONCALVEZ, D.; PÉREZ, C. REOLÓN, G.; SEGURA, N. LEMA, P.; GÁMBARO, A.; ARES, G. & VARELA, P. 2005. Effect of thickeners on the texture of stirred yogurt. *Alim. Nutr, Araranquara*, 16 (3): 207-211.

- GONZÁLEZ, J.M. 2012. Situación Actual y Perspectivas del Sector Lácteo Costarricense. Visión de la Cámara Nacional de Productores de Leche. Congreso Nacional Lechero. San Carlos, Costa Rica.
- GUINEE, T. P. & FOX, P. F. 2004. Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. In Fox, P. F., McSweeney, P. L. Cogan, T. M. & Guinee, T. P. eds. Cheese: chemistry, physics and microbiology. 3era ed. Elsevier. Italia.
- GUK KIM, S.; HEE KIM, E.; LAFFERTY, C. & DUBOVI, E. 2005. *Coxiella burnetii* in Bulk Tank Milk Samples, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 11 (4): 619-621.
- HALPIN, R., DUFFY, L., CREGENZÁN-ALBERTI, O., LYNG, J. & NOCI, F. 2014. The effect of not-thermal processing technologies on microbial inactivation: an investigation into sub-lethal injury of *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Food Control*, 41: 106-115.
- HERCEG, Z., REZEK, A., LELAS, V. & MEDEDOVIC, S. 2012. The effect of high intensity ultrasound treatment on the amount of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in milk. *Food Technology & Biotechnology*, 50(1): 46-52.
- HERNÁNDEZ, J.C., MARTÍNEZ, C., LÓPEZ, M., MERCADO, J. & ALCÁNTARA, M. 2004. Evaluación de rendimientos y costos de fabricación en queso asadero, queso Oaxaca y yogurt a nivel industrial. VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Guanajuato, México.
- HOLCK, A.; AXELSSON, L.; RODE, T.; HOY, M.; MAGE, I.; ALVSEIKE, O.; L'ABÉE-LUND, T.; OMER, M; GRANUM, P. & HEIR, E. 2011. Reduction of verotoxigenic *Escherichia coli* in production of fermented sausages. *Meat Science*, 89: 286-295.
- HORIBA INSTRUMENTS INC. 2012. A Guidebook to Particle Size Analysis. California, Estados Unidos.
- HORIBA INSTRUMENTS INC. 2004. Application Note: Milk Homogenization. California, Estados Unidos.
- KEENER, K.M. 2013. Food Regulations. In Kutz, M. ed. Handbook of farm, dairy and food machinery engineering. 2da edición. Academic Press. Estados Unidos.
- KNORR, D.; ZENKER, M.; HEINZ, V. & LEE, D. 2004. Applications and potential of ultrasonic in food processing. *Trends in Food Science & Technology*, 15: 261-266.

- LA REPÚBLICA. 2013. Colanta, Pasco y Alpina quieren replicar éxito estadounidense del yogurt griego. Bogotá, Colombia. [INTERNET] Recuperado 15/8/2016. Disponible en http://www.larepublica.co/empresas/colanta-pasco-y-alpina-quieren-replicar-%C3%A9xito-estadounidense-del-yogurt-griego_85161
- LARA, S. 2015. Efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre distintos parámetros de proceso y sobre la calidad e inocuidad durante la elaboración de queso seco y queso Ricotta. Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Escuela de Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- LAWLESS, H. & HEYMANN, H. 1999. Sensory Evaluation of Food. Segunda edición. Springer. Estados Unidos.
- LAWLESS, H. & MALONE, G. 1986. A comparison of ranking scales: sensitivity, replicates and relative measurements. *Journal of Sensory Studies*, 1: 155-174.
- LEE, H., ZHOU, B., LIANG, W., FENG, H. & MARTIN, S. E. 2009. Inactivation of *Escherichia coli* cells with sonication, manosonication, thermosonication and manothermosonication: microbial responses and kinetics modeling. *Journal of Food Engineering*, 93: 354-364.
- LEE, W.J. & LUCEY, J.A. 2010. Formation and Physical Properties of Yogurt. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 23 (9): 1127-1136.
- LEON, F., MERY, D., PEDRESCHI, F. & LEON, J. 2006. Color measurement in L*a*b* units from RGB digital images. *Food Research International*, 39:1084-1091.
- LIM, J. 2011. Hedonic scaling: a review of methods and theory. *Food Quality and Preference*. 22:733-747.
- LIU, Z., JULIANO, P., WILLIAMS, R.P., NIERE, J. & AGUSTIN, M.A. 2014. Ultrasound effects on the assembly of casein micelles in reconstituted skim milk. *Journal of Dairy Research*, 81: 146-155.
- LORIMER, J.P. & MASON, T.J. 1987. Sonochemistry Part 1. The Physical Aspects. *Chemical Society Reviews*, 16: 239-274.

- LOVEDAY, S., SARKAR, A. & SINGH, H. 2013. Innovative yoghurts: Novel processing technologies for improving acid milk texture. *Trends in Food Science & Technology*, 33(1): 5-20.
- LU, M. & WANG, N. 2017. Chapter 7: Spoilage of Milk and Dairy Products. The Microbiological Quality of Food. Elsevier. [INTERNET] Recuperado 23/05/2018. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00010-8>
- LUCEY, J.A. 2002. Formation and physical properties of milk protein gels. *Journal of Dairy Science*, 85: 281-284.
- MACBEAN, R. 2009. Packaging and the Shelf Life of Yogurt. In Robertson, G. ed. Food Packaging and Shelf Life. A Practice Guide. Taylor & Francis, Boca Ratón. V8, p143-156.
- MADRIZ, J.A. 2013. Situación Actual y Perspectivas del Sector Lácteo Costarricense. Visión de la Cámara Nacional de Productores de Leche. Congreso Nacional Lechero. Heredia, Costa Rica.
- MALAVASSI, P. 2017. Desarrollo de un dulce de leche de cabra saborizado tomando en cuenta el criterio del consumidor, las características fisicoquímicas y sensoriales para la elección del mejor prototipo, que cumpla con la factibilidad técnica de adaptarse a la planta de procesamiento de la empresa Productos D'Cabra. Trabajo Final de Graduación para optar por el título de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José, Costa Rica.
- MALEK, A., SHARADEVIAN, S. & TOUFEILI, L. 2001. Sensory properties and consumer acceptance of concentrated yogurt made from cow's, goat's and sheep's milk. *Milchwissenschaft*, 56: 687-689.
- MARRIER, R. 1973. An outbreak of enteropathogenic *E. coli* food borne disease traced to imported French Cheese. *Lancet*, 1376-1378.
- MARSIK, F.J. 2011. Antimicrobial susceptibility testing. In Mahon, C.R., Lehman, D.C. & Manulesis, G. Textbook of Diagnostic Microbiology. 4ta edición. Elsevier, Estados Unidos.
- MARTIN, M. L.; SHIPMAN, L. D.; POTTER, M. E.; WACHSMUTH, L. K.; WELLS, J. G.; HEDBERG, K.; TAUXE, R. V.; DAVIS, J. P. ARNOLDI, J. & TILLELI, J. 1986. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy cattle associated with two cases of hemolytic uraemic syndrome. *Lancet*, 8514-1043.

- MATSUURA, K., HIROTSUNE, M., NUNOKAWA, Y., SATOH, M. & HONDA, K. 1994. Acceleration of Cell Growth and Ester Formation by Ultrasonic Wave Irradiation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77: 36-40.
- MAURIN, M. & RAOULT, D. 1999. Q fever. *Clinical Microbiological Review*, 12: 518-553.
- MCCONNEL, C.; STENKAMP-STRAHM, C.; RAO, S.; LINKE, L.; MAGNUSON, R. & HYATT, D. 2016. Antimicrobial Resistance Profiles in *Escherichia coli* O157 Isolates from Northern Colorado Dairies. *Journal of Food Protection*, 79 (3): 484-487.
- MEDEIROS, U.; MEDEIROS, M. & PASSOS, M. 2009. Goat Milk Powder Production in Small Agrocooperatives. Estados Unidos.
- MENZ, M.B. 2002. Estudio del rendimiento quesero teórico a través de ecuaciones predictivas y su correlación con el rendimiento práctico en queso chanco industrial. Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad Austral de Chile, Escuela de Ingeniería de Alimentos. Valdivia.
- MINOGUE, T.D., DALIGAUT, H.A., DAVENPORT, K.W., BISHOP-LILLY, K.A., BROOMALL, S.M., BRUCE, D.C., CHAIN, P.S., CHERTKOV, O., COYNE, S.R., FREITAS, T., FREY, K.G., GIBBONS, H.S., JAISSE, J., REDDEN, C.L., ROSENZWEIG, C.N., XU, Y. & JOHNSON, S.L. 2014. Complete genome assembly of *Escherichia coli* ATCC 25922, a serotype O6 reference strain. *Genome Announc*, 2(5): 00969-14.
- MIRKIN, B. 2005. Clustering for data mining: a data recovery approach. Chapman & Hall. Nueva York.
- MONGE, M. 2010. Diseño de seis procedimientos requisito de los capítulos 7 y 8 de la norma ISO 22000:2005 y validación, por métodos microbiológicos, del procedimiento de limpieza y desinfección del piso de la bodega de materia prima utilizando una disolución de hipoclorito de sodio en la empresa Alserro S.A. Tesis de Licenciatura en Tecnología de Alimentos. Escuela de Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- MONTEIRO, S., SILVA, E., ALVARENGA, V., MORAES, J., FREITAS, M., SILVA, M., RAICES, R., SANT'ANA, A., MEIRES, M.A. & CRUZ, A. 2018. Effects of ultrasound energy density on the

- non-thermal pasteurization of chocolate milk beverage. *Ultrasonics Sonochemistry*, 42 (2018): 1-10.
- MORERA, V. 2014. Evaluación de la post-acidificación del yogurt líquido de fresa durante el almacenamiento y su efecto en el agrado del consumidor. Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Escuela de Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- MUÑOZ, J. & ZAMORA, K. 2013. Caracterización del sector lácteo en Costa Rica. MEIC, Costa Rica.
- MURILLO, L. 2008. Desarrollo y caracterización sensorial y fisicoquímica de un dulce de leche sin grasa y sin azúcar elaborado a nivel de laboratorio. Trabajo Final de Graduación para optar por el título de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José, Costa Rica.
- NAGENDRA, S. 2007. Functional Cultures and Health Benefits. *International Dairy Journal*, 17 (11): 1262-1277.
- NATIONAL YOGURT ASSOCIATION. *sf a*. Live and Active Culture Yogurt. [INTERNET] Recuperado 13/05/2018. Disponible en <http://www.aboutyogurt.com/Live-Culture>
- NATIONAL YOGURT ASSOCIATION. *sf b*. Yogurt varieties. [INTERNET] Recuperado 13/05/2018. Disponible en <http://aboutyogurt.com/index.asp?bid=27>
- NAVARRO, A.; DOS SANTOS, R.; MARQUES, M.; RODRIGUES, V.; TEIXEIRA, T. & PEREZ, R. 2013. Performance of hedonic scales in sensory acceptability of strawberry yogurt. *Food Quality and Preference*, 30: 9-21.
- NGUYEN, H.A. & ANEMA, S.G. 2010. Effect of ultrasonication on the properties of skim milk used in the formation of acid gels. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11:626-622.
- NOCI, F., WALKLING-RIBEIRO, M., CRONIN, D., MORGAN, D. & LYN, J. 2009. Effect of thermosonication, pulsed electric field and their combination on inactivation of *Listeria innocua* in milk. *International Dairy Journal*, 19 (1): 30-35.

- OJHA, K., MASON, T., O'DONNELL, C., KERRY, J. & TIWARI, B. 2017. Ultrasound technology for food fermentation applications. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34:410-417.
- OMBARAK, R. A.; HINENOYA, A.; AWASTHI, S. P.; IGUCHI, A.; SHIMA, A.; ELBAGORY, A. M. & YAMASAKI, S. 2016. Prevalence and pathogenic potencial of *Escherichia coli* isolates from raw milk and raw milk cheese in Egypt. *International Journal of Food Microbiology*, 221 (2016): 69-76.
- OZCAN, T. 2013. Determination of Yogurt Quality by Using Rheological and Textural Parameters. International Conference on Nutrition and Food Sciences. IPCBEE vol.53. IACSIT Press, Singapur.
- ÖZER, B. 2009. Strategies for Yogurt Manufacturing. In Yildiz, F., ed. Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products. Taylor & Francis, Boca Ratón. V2, p.47-96.
- ÖZER, B. & KIRMACI, H. 2009. Quality Attributes of Yogurt and Functional Dairy Products. In Yildiz, F., ed. Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products. Taylor & Francis, Boca Ratón. V8, p. 229-265.
- PAPADEMAS, P. & ASPRI, M. 2015. Dairy pathogens: characteristics and impact. In Papademas, P. ed. Dairy microbiology: a practical approach. CRC Press Taylor & Francis Group. Estados Unidos.
- PATIST, A. & BATES, D. 2008. Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9 (2008): 147-154.
- PEDREDO, D. & PANGBORN, R. 1989. Evaluación Sensorial de los Alimentos: Métodos Analíticos. Alambra. México.
- PELCZAR, M.J. & REID, R.D. 1972. *Microbiology*, pp783-807. McGraw-Hill. New York, Estados Unidos.
- PEREDA, J., FERRAGUT, V., QUEVEDO, J. M. GUAMIS, B. & TRUJILLO, A. J. 2007. Effects of ultra-high pressure homogenization on microbial and physicochemical shelf life of milk. *Journal of Dairy Science*, 90: 1081-10993.

- PEREIRA, R. N. & VICENTE, A. A. 2010. Novel technologies for milk processing. In Dos Reis Combria, J. S. & Texeira, J. A. eds Engineering aspects of milk and dairy products. CRC Press Taylor & Francis Group. Estados Unidos.
- PÉREZ, A. M. 2016. Información referente a las mediciones e interpretación del cambio de color. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José, Costa Rica. Comunicación personal.
- PINEDA, M. L. 2016. Información referente al diseño experimental en pruebas de textura y panel sensorial. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José, Costa Rica. Comunicación personal.
- PIYASENA, P., HOHAREB, E. & MCKELLAR, R. 2003. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 87 (3): 207-2016.
- QUESADA, J. & FIGUEROLA, J. 2010. Potencia de una prueba estadística: aplicación e interpretación en ecología del comportamiento. *Temas actuales de Etología*, 22: 19-37.
- RASO, J.; PAGÁN, R.; CONDÓN, S. & SALA, F. 1998. Influence of Temperature and Pressure on the Lethality of Ultrasound. *Appl Environ Microbiol*, 64 (2): 465-471.
- REA, M.; COGAN, T. & TOBIN, S. 1992. Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland. *Journal of Applied Microbiology*, 73 (4): 331-336.
- REINER, J., NOCI, F., CRONIN, D.A., MORGAN, D.J. & LING, D. 2010. A comparison of selected quality characteristics of yoghurts prepared from thermosonicated and conventionally heated milks. *Food Chemistry*, 119: 1108-1110.
- REMEUF, F., MOHAMMED, S., SODINI, I. & 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: 773-782.
- ROJAS, W. 2005. Evaluación del efecto de diferentes proporciones de leche de vaca y leche de cabra sobre las características químicas, físicas y sensoriales de un yogurt batido de fresa. Tesis de Licenciatura en Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José, Costa Rica.

- ROMERO DEL CASTILLO, R. & MESTRES LAGARRIGA, J. 2004. Productos lácteos: tecnología. Universidad Politécnica de Catalunya. [INTERNET] Recuperado 23/03/2017. Disponible en https://books.google.co.cr/books?id=HUugK6Ep_JkC&pg=PA128&lpg=PA128&dq=proceso+desnaturalizacion+proteinas+yogurt+formacion+gel&source=bl&ots=FMrJfupbDz&sig=uFBM3QvCERtzyhto_CS7zoaC8a8&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=proceso%20desnaturalizacion%20proteinas%20yogurt%20formacion%20gel&f=false
- RTCA. 2009. Reglamento Técnico Centroamericano. RTCA 67.04.50:08. Alimentos. Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de los Alimentos.
- SALLEH-MACK, S.Z. & ROBERTS, J.S. 2007. Ultrasound Pasteurization: The effects of temperature, soluble solids, organic acids and pH on the inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(3): 323-329.
- SALVADOR, A.; FISZMAN, S.; CURIA, A. & HOUGH, G. 2005. Survival Analysis Applied to Sensory Shelf Life of Yogurts – II: Spanish Formulations. *Journal of Food Science*, 70 (7): 446-450.
- SAN MARTÍN, B., BRAVO, V. & BORIE, C. 2005. Evaluación de la resistencia microbiana en ganado bovino en Chile utilizando *E. coli* como bacteria indicadora. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 37 (2): 117-123.
- SANCHO, J., BOTA, E. & CASTRO DE, J. 1999. Introducción al Análisis Sensorial de los Alimentos. Edicions Universitat de Barcelona. Barcelona, España.
- SERAPEIMIDOU, A.; ZLATANOS, S.; LASKARIDIS, K. & SAGREDOS, A. 2012. Chemical characteristics, fatty acid composition and conjugated linoleic acid (CLA) content of traditional Greek yogurts. *Food Chemistry*, 134 (4): 1839-1846.
- SERRA, M.; TRUJILLO, A.J.; GUAMIS, B. & FERRAGUT, V. 2009. Evaluation of physical properties during storage of set and stirred yogurts made from ultra-high-pressure homogenization-treated milk. *Food Hydrocolloids*, 23 (1), 89-91.
- SFAKIANAKIS, P. & TZIA, C. 2014. Conventional and Innovative Processing of Milk for Yogurt Manufacture; Development of Texture and Flavor: A Review. *Journal Foods*, 3, 176-193.

- SHANMUGAM, A., CHANDRAPALA, J. & ASHOKKUMAR, M. 2012. The effect of ultrasound on the physical and functional properties of skim milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16: 251-258.
- SHELLY, R.R.C. & LAGARRIGA, J.M. 2004. Productos Lácteos: tecnología. Universidad Politécnica de Catalunya. España.
- SOLANO, M. F. 2003. Desarrollo de un sistema de control de costos e ingresos de producción de leche para un hato Holstein. Tesis de Bachillerato en Ingeniería Agropecuaria Administrativa con énfasis en Empresas Agropecuarias. Instituto Tecnológica de Costa Rica. Escuela de Ingeniería Agropecuaria Administrativa. Cartago.
- SOOMRO, A. H.; ARAIN, M. A.; KHASKHELI, M. & BHUTTO, B. 2002. Isolation of *Escherichia coli* from Raw Milk and Raw Milk Products in Relation to Public Health Sold Under Market Conditions at Tandojam. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1(3): 151-152.
- SORIA, A.C. & VILLAMIEL, M. 2010. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(7): 323-331.
- TAMINE, A.Y. & ROBINSON, R.K. 1999. Yoghurt science and technology. 2nd ed. CRC Press LLC. Boca Raton, Florida.
- TATE & LYLE Custom Ingredients. Sf. Product Information sheet. CC-729. Illinois, Estados Unidos.
- TEREFE, N.S., SIKES, A.L. & JULIANO, P. 2016. Ultrasound for Structural Modification of Food Products. *Innovative Processing Technologies*, 209-230. Elsevier. [INTERNET] Recuperado 8/5/2018. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100294-0.00008-0>
- THE DAIRY COUNCIL. 2013. The Nutritional Composition of Dairy Products. Londres.
- TIWARI, B. K. & MASON, T. J. 2012. Chapter 6. Ultrasound Processing of Fluid Foods. *In Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluids Foods*. Elsevier.
- TUNICK, M. H. 2009. Dairy Innovations over the Past 100 Years. *Journal of Agrocultural and Food Chemistry*, 57:8093-8097.

- USDA. 2001. Specifications for Yogurt, Nonfat Yogurt and Lowfat Yogurt. Dairy Programs. Agricultural Marketing Services. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Washington, D.C.
- USDA, 2011. Performance standards for production of processed meat and poultry products; proposed rule. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria. Washington, D.C.
- VARGAS, P.; PINEDA, M. L. & CHACÓN, A. 2007. Lácteos bovinos y percepción de la leche caprina entre estudiantes de la Universidad de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 18 (1): 27-36.
- VERGARA, D., TORRES, M., GONZÁLEZ, F., LASSO, N. & ORTEGA, C. 2006. Prevalencia de Brucelosis en la leche cruda de bovinos expendida en el municipio de Popayán Cauca. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 6 (2): 76-85.
- VILKHU, K., MAWSON, R., SIMONS, L. & BATES, D. 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2):161-169.
- VILLAMIEL, M. & DE JONG, P. 2000. Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* and *Streptococcus thermophilus* in Trypticase® Soy Broth and total bacteria in milk by continuous-flow ultrasonic treatment and conventional heating. *Journal of Food Engineering*, 45 (3): 171-179.
- VILLANUEVA, N., PETENATE, A. & DA SILVA, M. 2005. Performance of the hybrid hedonic scale as compared to the traditional hedonic, self-adjusting and ranking scales. *Food Quality and Preference*, 16: 691-703.
- VITALUS NUTRITION. 2014. Ficha técnica de producto. MPC-85.
- WALSTRA, P., WOUTERS, J.T.M. & GEURTS, T.J. 2006. Dairy Science and Technology. 2da edición. CRC Press Taylor & Francis Group. Florida, Estados Unidos.
- WEERATHILAKE, W.; RASIKA, D.; RUWANMALI, J. & MUNASINGHE, M. 2014. The evolution, processing, varieties and health benefits of yogurt. *International Journal of Scientific and*

Research Publications, 4 (4). [INTERNET] Recuperado 8/5/2018 Disponible en <https://pdfs.semanticscholar.org/8b2c/6b5dcffe3a2f3e6c8dd494d560521d62feae.pdf>

WHITFIELD, C. & ROBERTS, I. 1999. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 31(5):1307-1319.

WONG, E. 2008. Combinación de sonicación y almacenamiento en alta presión osmótica: una alternativa de procesamiento para obtener jugos de frutas inocuos y de calidad. Tesis de Doctorado en Ciencias. Programa de Doctorado en Ciencias de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

WONG, E.; PÉREZ, A. M. & VAILLANT, F. 2008. Combined effect of osmotic pressure and sonication on the reduction of *Salmonella* spp. in concentrated orange juice. *Journal of Food Safety*, 28: 499-513.

WU, H., HULBERT, G.J. & MOUNT, J.R. 2011. Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, (2011): 211-218.