



Ingeniería de alimentos



APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA PARA EVALUAR EL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCAR Y DE CULTIVOS INICIADORES COMERCIALES SOBRE LA CINÉTICA DE FERMENTACIÓN DEL YOGURT

APPLICATION OF RESPONSE SURFACE METHODOLOGY TO EVALUATE THE EFFECT OF THE CONCENTRATION OF SUGAR AND COMMERCIALS STARTERS ON THE FERMENTATION KINETICS OF YOGURT

J.M. Rodríguez-Bernal¹, J. A. Serna-Jiménez¹, M.A. Uribe-Bohórquez¹, B. Klotz² y M. X. Quintanilla-Carvajal^{1*}

¹Facultad de Ingeniería, Universidad de la Sabana. Puente del Común Km 7 Auto Norte, Bogotá, Colombia

²Instituto Alpina de Investigación, Alpina Corporativo S.A., Km 3 Vía Briceño- Sopó, Sopó, Cundinamarca, Colombia.

Recibido 1 de Diciembre de 2013; Aceptado 1 de Febrero, 2014

Resumen

En este trabajo, mediante la metodología de diseño experimental de superficie de respuesta de optimización (MSRO) se evaluó la concentración de dos cultivos iniciadores comerciales (YO-MIXTM 204 (L) y YOFLEX[®] (Y)) y el porcentaje de azúcar añadido (5, 7.5 y 10 %) como factores influyentes sobre el proceso de fermentación de yogurt, con el fin de identificar la tasa de acidificación más alta. De igual forma, se planteó la caracterización del crecimiento microbiano durante el proceso de acidificación. Las condiciones óptimas de acidificación para L se dan a los porcentajes de azúcar más bajos y concentraciones de inóculo más altas, mientras que para Y se dan a los porcentajes de azúcar medios y concentraciones de inóculos más altas para tiempos totales de proceso de 4.4 y 4.2 horas, respectivamente. Se determinó la tasa de crecimiento para cada cultivo iniciador dando como resultado menores tasas de crecimiento para estreptococos (0.705 h⁻¹ para L y 0.367 h⁻¹ para Y) que para lactobacilos (0.733 h⁻¹ para L y 0.389 h⁻¹ para Y) en cada cultivo iniciador. Finalmente se encontraron diferencias significativas en el tiempo en el que se alcanzó la máxima tasa de acidificación para los cultivos iniciadores evaluados a una misma concentración de azúcar.

Palabras clave: cultivos iniciadores, yogurt, optimización, tasa de acidificación máxima, tasa de crecimiento máxima.

Abstract

In this work, the concentration of two commercial starters (YO-MIXTM (L) 204 and YOFLEX[®] (Y)) and sugar percentage (5, 7.5 and 10%) were evaluated by optimization response surface methodology (ORSM), in order to identify the higher acidification rate. The starters growth was followed during the acidification process. The results showed that optimal acidification conditions for L were at the lowest value of sugar and the highest value of the starter concentration. In the case of Y the optimal acidification conditions were with the highest starter concentration but at medium sugar levels. Total acidification times were 4.4 and 4.2 hours, respectively. The growth rate for each starter culture was determined by nonlinear regression resulting lower growth rates for streptococcus (0.705 h⁻¹ for L and 0.367 h⁻¹ for Y) than for lactobacillus (0.733 h⁻¹ for L and 0.389 h⁻¹ for Y) in each starter. Finally, significant differences were found in the time necessary to reach the maximum acidification rate for starter cultures evaluated at the same concentration of sugar. This kind of studies should continue because it offers the possibility of growth in the dairy sector by standardizing production processes.

Keywords: starters, yogurt, optimization, maximum acidification rate, maximum growth rate.

*Autora para la correspondencia. E-mail: maria.quintanilla1@unisabana.edu.co

1 Introducción

El yogurt es consumido en todo el mundo por su alto contenido nutricional (Schnürer y Magnusson, 2005). Se encuentra catalogado entre los alimentos empacados con mejor desempeño en el 2012 y su posicionamiento está previsto al menos por cinco años más (Alimentos I, 2010). Para 2012, la consultora de alimentos Zenith International (www.zenithinternational.com) pronosticó un crecimiento del 38 % en el consumo mundial de yogurt. Específicamente el mercado de ventas de este producto lácteo respecto a otro tipo de snacks en América latina creció en un 6.2 % y se espera que en los próximos cinco años el consumo de yogurt aumente con una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) de 5.9 % en volumen y 7.6 % en valor (Tamillow, 2012). Es por esto que la investigación en procesos de elaboración de yogurt a nivel industrial sigue siendo vigente con el propósito de disminuir los tiempos de proceso, mejorar las propiedades físico-químicas y sensoriales de dichos productos fermentados y volver más eficiente su producción (Martínez y col., 2013).

Existen en el mercado diferentes tipos de yogurt según su consistencia: afluado, batido y líquido. La composición del yogurt es variada de acuerdo al tipo de leche que se utilice, su contenido de grasa, adición de azúcar, frutas y sabores (Ramírez-Sucre y Vélez-Ruiz, 2013). Sin embargo, toda elaboración industrial de yogurt incluye las etapas de estandarización de la leche, homogenización, pasteurización, enfriamiento de la leche a temperatura de incubación, adición de los cultivos iniciadores, la etapa de fermentación o acidificación, empaque y finalmente refrigeración (Tamime y Robinson, 2000).

El yogurt es un producto lácteo fermentado de baja acidez (Marth y Steele, 2001) que se elabora principalmente con cultivos bacterianos de *Streptococcus* subsp. *thermophilus* (Gougouli y col., 2011) y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Beletsiotis y col., 2011; Díaz-Jiménez y col., 2004) generalmente en una proporción 1:1 (Hui y col., 2003). Los dos cultivos son homofermentativos termófilos y se desarrollan de forma simbiótica siendo cada cultivo bacteriano incapaz de producir las características del yogurt de forma independiente. La fermentación ácido láctica la inicia *S. thermophilus* cambiando las condiciones para que *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pueda iniciar su crecimiento. La reducción del pH a valores cercanos a 5.5 y de oxígeno así como la producción de compuestos estimulantes

(aminoácidos, péptidos, ácidos orgánicos entre otros) activan el desarrollo de éste (Marth y Steele, 2001).

La elaboración de la gran mayoría de bebidas de yogurt inicia con leche desnatada estandarizada, la cuál ha sido previamente pasteurizada durante 15 minutos entre 85 °C y 95 °C. La leche se fermenta con las bacterias del yogurt a 43 °C hasta alcanzar un pH alrededor de 4.6. Posteriormente, se realiza un proceso de enfriamiento hasta 20 °C aproximadamente, donde se añaden zumos de frutas, azúcar, una dispersión de pectina en agua, agentes aromatizantes y colorantes, en caso de ser necesarios. Para dispersar la pectina, se procede a un proceso de homogenización de 15 a 20 MPa; es de resaltar, que la adición de pectina de alto metoxilo es esencial para la estabilización del producto final. De igual forma, se pueden agregar otros estabilizantes como la carboximetil celulosa o la goma guar. El material de empaque debe ser impermeable al oxígeno para evitar el desarrollo de sabores no deseados (Walstra, Wouters y Geurts, 2006).

La acidificación es la responsable del proceso de coagulación de la leche. Las moléculas de caseína se desestabilizan a un pH de 5.3-5.2 y el proceso completo de precipitación ocurre entre un pH de 4.7 y 4.6 (aproximadamente el 1.0 % de acidez expresada como porcentaje de ácido láctico). Las variables más relevantes en el proceso de fermentación son: el tipo y cantidad de cultivo iniciador, las características físico-químicas de la leche y la temperatura. De acuerdo a estas variables, los microorganismos iniciadores transforman la lactosa y otros carbohidratos de la leche en ácido láctico y en otros productos (acetaldehído (Walstra, Wouters y Geurts, 2006), treonina (Beal y col., 1999), piruvato (Higashio, Yoshioka y Kikuchi, 1977), CO₂ (Ascon-Reyes y col., 1995), diacetilo, exopolisacáridos (Walstra, Wouters y Geurts, 2006)), los cuales contribuyen al sabor, la textura y el aroma específico del yogurt (De Brabandere y De Baerdemaeker, 1999).

La aplicación de modelos para el entendimiento y optimización de procesos en el desarrollo de productos permite la obtención de beneficios tales como el incremento de rendimientos, reducción de la variabilidad, reducción del tiempo de proceso y reducción del costo del proceso (Téllez-Mora y col., 2012; Corona-González y col., 2013; Hernández-Díaz y col., 2013), entre otros. Los modelos reducen también los tiempos y el costo en el desarrollo de productos ya que disminuye la realización de ensayos. La metodología de superficie de respuesta, es una técnica de modelamiento estadístico

empírico empleada para el análisis de regresión múltiple utilizando datos cuantitativos obtenidos de experimentos diseñados adecuadamente para resolver ecuaciones de múltiples variables simultáneamente (Rao, Kim y Rhee, 2000). Es así como, se han utilizado metodologías de superficie de respuesta para modelar y evaluar los efectos simultáneos de la temperatura de fermentación, el nivel total de sólidos de la leche y el nivel total de inóculo, en las propiedades reológicas y la cinética de acidificación de la fermentación con dos bacterias iniciadoras *S. thermophilus* Y4.10 y *Lb. Bulgaricus* Y6.15 aislados de yogures griegos tradicionales encontrando las mejores características reológicas del producto (Kristo, Biliaderis y Tzanetakis, 2003). Torriani y col. (1996) identificaron el efecto de la temperatura de fermentación, de las características de la leche y del tamaño del inóculo sobre la tasa de acidificación y el crecimiento de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus* ST54.

Las empresas productoras de derivados lácteos fermentados tienen procesos de manufactura específicos y particulares donde buenas prácticas de diseño y optimización brindan la oportunidad de mejorar las características del producto, de reducir costos y tiempo. Para tal propósito la metodología de superficie de respuesta se considera como una herramienta útil en la mejora continua de procesos a nivel industrial. Es por esto que el objetivo de este trabajo fue desarrollar un modelo de superficie de respuesta para evaluar el efecto de la concentración inicial de inóculo de dos cultivos iniciadores comerciales y la concentración de azúcar sobre la tasa máxima y tiempo de acidificación.

2 Materiales y métodos

2.1 Elaboración de yogurt a nivel de laboratorio

La leche estandarizada (5 % sacarosa añadida, pH 6.6 y 1.5 % de contenido de grasa) y pasteurizada se obtuvo de la planta de Sopó de la Compañía Alpina Productos Alimenticios S. A. (Colombia). Toda la leche se almacenó a temperatura de refrigeración (4 °C) por un tiempo máximo de 24 horas. Para la elaboración del yogurt se utilizaron dos cultivos iniciadores comerciales: YOFLEX® (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) cultivo ultracongelado de CHR Hansen (Horsholm, Dinamarca) y YO-

MIX™ 204 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* y *Streptococcus thermophilus*) cultivo liofilizado de DuPont Danisco (Dinamarca). Para la adición de azúcar se utilizó azúcar de nivel comercial (5 - 7.5 - 10 %) (Incauca Blanco Especial, Colombia) según las condiciones del diseño experimental de la metodología de superficie de respuesta de optimización (MSRO) como se puede observar en la Tabla 1.

Las fermentaciones ácido lácticas se realizaron con volúmenes de 5 Litros en frascos de vidrio previamente esterilizados. A la leche estandarizada y pasteurizada se adicionó el porcentaje de azúcar correspondiente a los niveles de azúcar a evaluar, se calentó a la temperatura de fermentación (43 °C) y finalmente, se procedió a la inoculación con el cultivo iniciador YOFLEX® (Y) o YO-MIX™ 204 (L) a la concentración correspondiente según el modelo de superficie de respuesta de optimización (Tablas 1 y 2). El proceso de acidificación se interrumpió al alcanzar el valor final de pH 4.6.

2.2 Medición de parámetros cinéticos

El pH de las muestras se determinó a temperatura ambiente (18 °C) con un potenciómetro (888 Titrand, Metrohm, Florida, Estados Unidos) y se utilizó el software Tiamo versión 2.3 (Metrohm, Florida, Estados Unidos). El valor de pH se tomó cada 30 minutos durante el tiempo de fermentación para cada tratamiento.

Para el cálculo de la máxima tasa o velocidad de acidificación (V_m), el tiempo en el que se alcanza V_m (T_m) y el tiempo total de fermentación para un pH 4.6 (T_e), se siguió la metodología propuesta por Kristo, Biliaderis y Tzanetakis (2003). V_m se calculó a partir de las curvas de pH vs. tiempo de acuerdo a la Ec. (1), donde V_m es la tasa máxima de acidificación, dpH es el cambio de pH y dT es el cambio de tiempo. V_m , T_m y T_e se consideraron como los responsables de caracterizar la cinética del proceso.

$$V_m = \left(\frac{dpH}{dT} \right)_{\max} \quad (1)$$

2.3 Diseño experimental

Se aplicó un diseño experimental de MSRO usando el paquete estadístico comercial, Design Expert versión 8 (Statease Inc., Minneapolis, USA) para identificar los niveles óptimos de concentración de los dos cultivos iniciadores comerciales (DCU, por sus siglas en inglés, Unidades de Cultivo Danisco) y porcentaje de

azúcar (%), respecto a la tasa máxima de acidificación (V_m). La codificación de los factores independientes usados en el diseño se muestran en la Tabla 1. Los experimentos se diseñaron de acuerdo al diseño "D-optimal" como se muestra en la Tabla 2 para cultivo iniciador Y y cultivo iniciador L, en ensayos independientes. El orden de los experimentos fue totalmente aleatorio. Los datos fueron analizados por regresiones múltiples a través del método de mínimos cuadrados.

Se utilizó un modelo cuadrático para expresar la variable de respuesta en función de los factores independientes, donde A y B son valores codificados de la concentración de cultivo iniciador y porcentaje de azúcar, respectivamente. Se utilizó la prueba de significancia estadística en los criterios de error total con un nivel de confianza del 95%. Los términos significativos en el modelo fueron encontrados por análisis de la varianza (ANOVA). El ajuste del modelo se evaluó por el valor de R^2 y el R^2 -Ajustado. La técnica de optimización gráfica y numérica del software Design Expert se utilizó para la optimización de la respuesta.

2.4 Curvas de Crecimiento

El conteo de microorganismos se realizó por duplicado con seis puntos de muestreo para la construcción de las curvas de crecimiento: dos puntos de muestreo entre 0 y 4 horas y cuatro puntos de muestreo para las últimas horas. La siembra de las muestras se realizó mediante el equipo Spiral Plater de Microbiology International® (Whitley Scientific, Maryland, Estados Unidos) en medio Agar Man Rogosa Sharpe (MRS). Se incubaron por 48 horas a 37°C en condiciones anaeróbicas. La lectura del conteo de los cultivos en cajas de Petri se realizó mediante el equipo Colony Counter Protocol 3 de Microbiology International® (Maryland, Estados Unidos) diferenciando las colonias características a nivel macroscópico de cada cultivo iniciador por su tamaño y color (pequeñas de color blanco con diámetros de hasta 3 mm para *S. thermophilus* y grandes de color crema con diámetros mayores a 3 mm para *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), adicional a esto se hizo verificación microscópica donde se identificó el crecimiento del estreptococos como cadenas de forma esférica y el de lactobacilos en varillas largas y cortas, rectas y delgadas (Tamime, 2006; Sun-Waterhouse, Zhou y Wadhwa, 2013). Los términos significativos en el crecimiento de los cultivos iniciadores se

determinaron por análisis de la varianza (ANOVA).

2.5 Parámetros cinéticos de crecimiento de los cultivos iniciadores

A cada una de las curvas de crecimiento de los cultivos iniciadores generadas en 16 tratamientos del diseño experimental MSRO, es decir, el cambio en el recuento de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *S. thermophilus* (Y), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* (L) (\log_{10} UFC g^{-1}) como función del tiempo de proceso, se les ajustó el modelo de crecimiento primario de Baranyi y Roberts (Baranyi y Roberts, 1995), lineal y bifásico (Rosso y col., 1995) teniendo en cuenta que este tipo de cultivos iniciadores presentan diferentes fases de latencia según sus procesos a los que hayan sido sometidos durante su elaboración (Boza, Barbin y Scamparini, 2004). Para el desarrollo de estos modelos se utilizó la edición web de DMFit (<http://modelling.combase.cc/DMFit.aspx>). Este procedimiento proporciona estimaciones del valor inicial (N_0 , \log_{10} UFC g^{-1}) y la tasa de crecimiento máxima (MR , \log_{10} UFC $g^{-1} h^{-1}$) con el coeficiente de regresión (R^2) y el error estándar del ajuste (ES).

3 Resultados y discusión

3.1 Optimización de parámetros de acidificación

La máxima tasa de acidificación (V_m) y el tiempo en el que se alcanza V_m (T_m) están contenidos en la Tabla 2 para cada uno de los cultivos iniciadores. Los valores máximos del cultivo iniciador L fueron de -0.228 $\Delta pH/min$ y 180 min para V_m y T_m , respectivamente para niveles de azúcar y cultivo iniciador medios; los valores mínimos de V_m y T_m (-0.141 $\Delta pH/min$ y 270 min) para niveles medios de cultivo iniciador (0) utilizando el mínimo contenido de azúcar (-1).

Para el cultivo iniciador Y, los factores evaluados influyeron sobre V_m y T_m de manera inversamente proporcional. Los valores máximos de -0.219 $\Delta pH/min$ y 210 min para V_m y T_m , respectivamente, se obtuvieron con niveles de azúcar 1 y cultivo iniciador -1, de forma contraria, los valores mínimos de V_m y T_m (-0.125 $\Delta pH/min$ y 480 min) se obtuvieron con niveles de azúcar mínimos (-1) y el máximo nivel de cultivo iniciador (1), lo que indica que el azúcar si es un factor que influye sobre la tasa máxima de acidificación para Y. Los

datos experimentales se utilizaron para calcular los coeficientes de la ecuación cuadrática, en las Tabla 3 y 4 se muestra el resumen de los resultados de ANOVA con la significancia de los coeficientes de los modelos de regresión. Para cualquier término del modelo, un coeficiente de regresión alto y un valor de probabilidad bajo, indicarán un efecto significativo en la variable de respuesta respectiva. El coeficiente de determinación R^2 es la proporción de la variación en la respuesta atribuida al modelo y se recomienda que para un buen ajuste del modelo, el R^2 no debe ser inferior a 80% para cualquier tipo de proceso que involucre el uso de materiales biológicos en la agroindustria (Little y Hills, 1978). Los resultados del ANOVA (Tabla 3 y 4) mostraron que los modelos utilizados en este estudio

fueron los adecuados para identificar las condiciones óptimas de acidificación de dos cultivos iniciadores comerciales para la producción de yogurt con $R^2 > 0.8$.

Para el cultivo iniciador Y, el análisis de la superficie de respuesta de los datos demostraron que la relación entre V_m y las variables independientes se ajustan a un modelo cuadrático de 0.8963 y 0.8445 para R^2 y R^2 -Ajustado respectivamente. El modelo y los factores A, B y A^2 fueron significativos ($p < 0.001$), de forma contraria, no se consideraron significativos las interacciones AB y B^2 (Tabla 3). La Ec. (2) describe la relación entre las variables independientes (factores A y B) y la V_m del cultivo iniciador Y.

$$Tiempo = \frac{1}{2} \left(\frac{pH_{inicial} - pH_{final}}{-0.15 + 0.023A - 0.017B + 0.0012AB - 0.0017A^2 - 0.0087B^2} \right) \quad (2)$$

Tabla 1: Factores y niveles utilizados para el diseño experimental

Parámetro	Concentración cultivo iniciador Y (DCU)	Concentración cultivo iniciador L (DCU)	% Azúcar para Y y L
Factor	A	A	B
Parámetro máximo	0.622	0.375	10
Nivel alto	+1	+1	+1
Parámetro medio	0.414	0.250	7.5
Nivel medio	0	0	0
Parámetro mínimo	0.207	0.125	5
Nivel bajo	-1	-1	-1

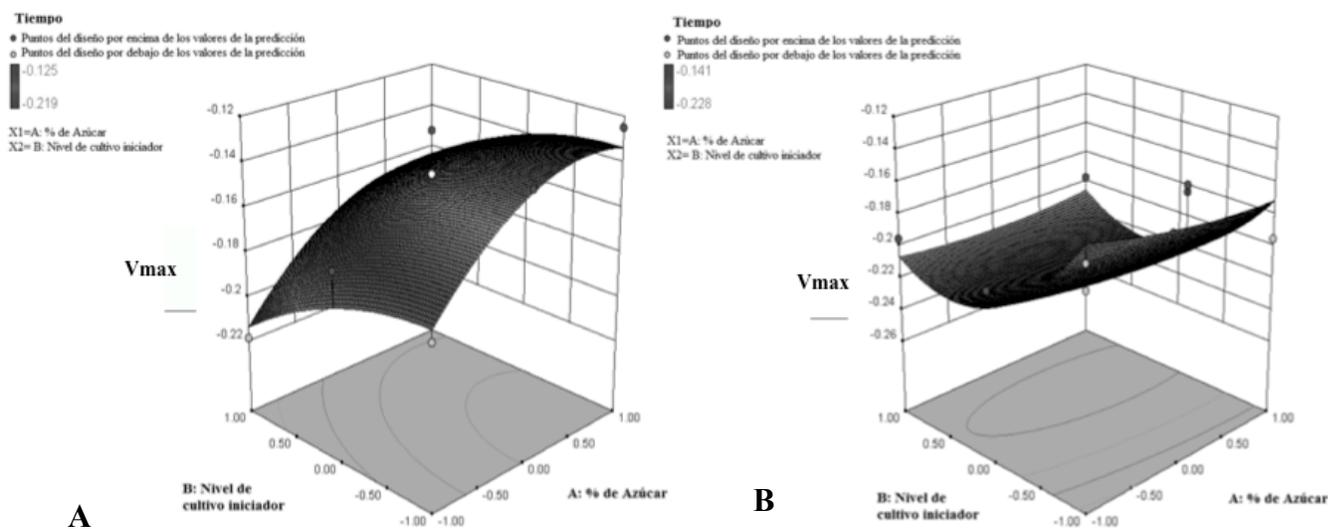


Fig. 1. Resultados optimización cultivo iniciador Y(A); cultivo Iniciador L (B).

El análisis de la superficie de respuesta para el cultivo iniciador L demostró que la relación entre la V_m y las variables independientes se ajustan a un modelo cuadrático de 0.8062 y 0,7093 para R^2 y R^2 -Ajustado respectivamente. El modelo y el factor B fueron significativos ($p < 0.001$), de forma contraria, no se consideraron significativos A, AB, A^2 y B^2 (Tabla 4). En este caso, la Ec. (3) describe la relación entre las variables independientes (factores A y B) y la V_m del cultivo iniciador L.

$$Tiempo = \frac{1}{2} \left(\frac{pH_{inicial} - pH_{final}}{-0.22 - 0.044A - 0.022B + 0.0048AB + 0.0042A^2 + 0.034B^2} \right) \quad (3)$$

Tabla 2. Parámetros cinéticos de MSRO para cultivos iniciadores Y y L

Std	A	B	Y		L	
			V_m ($\Delta pH/min$)	T_m (min)	V_m ($\Delta pH/min$)	T_m (min)
1	0	-1	-0.137	330	-0.145	270
2	1	-1	-0.125	480	-0.195	210
3	0	0	-0.145	300	-0.228	180
4	0	0	-0.145	300	-0.228	180
5	1	0	-0.152	270	-0.214	180
6	-1	-1	-0.182	240	-0.163	240
7	1	1	-0.152	240	-0.197	210
8	1	0	-0.152	270	-0.214	180
9	0	0	-0.145	300	-0.228	180
10	0	1	-0.177	210	-0.220	180
11	-1	1	-0.219	210	-0.195	240
12	-1	0	-0.171	270	-0.203	240
13	0	-1	-0.137	330	-0.141	270
14	-1	-1	-0.182	240	-0.163	240
15	0	0	-0.145	300	-0.228	180
16	0	1	-0.177	210	-0.22	180

Std: Número de Corrida

A: Concentración de Cultivo Iniciador Y o L, respectivamente

B: Porcentaje de Azúcar para Y o L, respectivamente

Y: Cultivo Iniciador YOFLEX®

L: Cultivo Iniciador YO-MIX™ 204

V_m : Máxima Tasa de Acidificación ($\Delta pH/min$)

T_m : Tiempo en el que se alcanza V_m (min)

La Fig. 1 muestra el efecto de de la concentración del cultivo iniciador Y y el porcentaje de azúcar en el tiempo expresado como la V_m . La interacción AB no resultó significativa ($p > 0.05$). La tasa de acidificación primero aumenta ($-0.2 \Delta pH/min$) y se mantiene constante a medida que el nivel de cultivo iniciador disminuye (nivel $^{-1}$), lo que indica que a mayor concentración de Y, disminuye el T_m . A mayor porcentaje de azúcar el T_m disminuye y en los niveles más altos la V_m tiende a mantenerse constante, lo que revela que el azúcar no tiene incidencia sobre la producción de ácido láctico con el fin de obtener cortos tiempos de proceso. Es por esto, que en la región

experimental, el mejor T_m expresado como V_m se observa en 1 y $^{-1}$ para A y B respectivamente.

En la Fig. 1 se puede observar el efecto de la concentración del cultivo iniciador L y el porcentaje de azúcar en el tiempo expresado como la V_m . La interacción de los factores independientes (AB) no presentan un efecto significativo ($p > 0.05$) sobre la variable de respuesta. La máxima tasa de acidificación primero disminuye ($-0.239 \Delta pH/min$) y luego aumenta ($-0.180 \Delta pH/min$) cuando el nivel de cultivo iniciador disminuye (nivel $^{-1}$), lo que indica que concentraciones medias (nivel 0) de Y brindan una V_m mayor ($-0.239 \Delta pH/min$).

Tabla 3. Análisis de Varianza (ANOVA) superficie de respuesta modelo cuadrático para el cultivo iniciador Y.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Mínimos cuadrados	Valor de F	Valor de p
Modelo*	7.623E-3	5	1.525E-3	17.29	0.0001
A*	3.922E-3	1	3.922E-3	44.48	<0.0001
B*	2.594E-3	1	2.594E-3	29.41	0.0003
AB	6.647E-6	1	6.647E-6	0.075	0.7892
A2*	1.133E-3	1	1.133E-3	12.85	0.0050
B2	2.826E-4	1	2.826E-4	3.21	0.1037
Residuales	8.818E-4	10	8.818E-5		
Lack of Fit	8.818E-4	3	2.939E-4		
Error	0.000	7	0.000		
Total	8.505E-3	15			
Dev. Std.	0.0094	R ²	0.8963		
Media	-0.16	R ² -Ajustado	0.8445		

* Valores que se consideran significativos

Tabla 4. Análisis de Varianza (ANOVA) superficie de respuesta modelo cuadrático para cultivo iniciador L.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Mínimos cuadrados	Valor de F	Valor de p
Modelo*	0.011	5	2.196E-3	8.32	0.0025
A	1.465E-4	1	1.465E-4	0.55	0.4734
B*	4.235E-3	1	4.235E-3	16.05	0.0025
AB	1.091E-4	1	1.091E-4	0.41	0.5347
A2	6.725E-5	1	6.725E-5	0.25	0.6247
B2	4.230E-3	1	4.230E-3	16.02	0.0025
Residuales	2.640E-3	10	2.640E-4		
Lack of Fit*	2.632E-3	3	8.772E-4	767.52	<0.0001
Error	8.000E-6	7	1.143E-6		
Total	0.014	15			
Dev. Std.	0.016	R ²	0.8062		
Media	-0.20	R ² -Ajustado	0.7093		

El porcentaje de azúcar no afecta el Tm permaneciendo constante a los diferentes niveles de azúcar. En la región experimental, el mejor tiempo de acidificación se observa en ⁻¹ y 0 para A y B, respectivamente, lo que indica que la adición de azúcar no es necesaria para el proceso de fermentación.

El rol principal del *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en la elaboración de yogurt es la acidificación de la leche mediante la producción de una gran cantidad de ácido láctico a partir de la lactosa. El ácido láctico reduce el pH de la leche y conduce a una solubilización progresiva del fosfato de calcio micelar. Esto causa la desmineralización de las micelas de la caseína y su desestabilización, lo que genera la completa precipitación de la caseína en un

rango de pH entre 4.6-4.7 (Fox, 1989; Zourari y col., 1992).

A partir de esto, se puede determinar que el efecto de la concentración de azúcar sobre el crecimiento de los microorganismos es relevante como agente osmótico pero puede llegar a ser negativo sobre el tiempo requerido para alcanzar Vm, es así como Y necesita menor concentración de azúcar que L para alcanzar dicho valor. Cabe resaltar que cada cultivo iniciador utiliza diferentes cantidades de azúcar, de forma individual, el *S. thermophilus* fermenta únicamente pocos carbohidratos, como la lactosa, sacarosa, glucosa y en algunos casos galactosa (Hardie, 1986), mientras que el *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* fermenta menor cantidad de carbohidratos

como la glucosa, lactosa, fructosa, y en algunas casos galactosa y manosa (Kandler y Weiss, 1986; Zourari y col., 1992). Durante el proceso de elaboración de yogurt, estos microorganismos tienen como fuente principal de sustrato la lactosa para lograr la acidificación de la leche mediante la producción de gran cantidad de ácido láctico (Fox, 1989), donde cada microorganismo difiere en su metabolismo (Poolman y col., 1989). Durante el crecimiento de *S. thermophilus* en sacarosa, la glucosa y la fructosa se usan simultáneamente. La fructosa se acumula en el medio, aunque puede ser utilizada por el microorganismo (Thomas y Crow, 1983). La mayor tasa de utilización de sacarosa en comparación con la glucosa y la fructosa puede estar relacionada con una tasa de absorción diferente (Hutkins y Morris, 1987); a diferencia, el *Lactobacillus* utiliza sólo la fracción de glucosa de la lactosa y libera la galactosa en el medio de crecimiento. Algunas cepas pueden utilizar galactosa en un medio de crecimiento que contiene la limitación de la concentración de lactosa (Zourari y col., 1992). Estos azúcares que se liberan al medio se pueden atribuir a características específicas del yogurt.

Algunos autores han reportado que el mecanismo de transporte de la lactosa en *S. thermophilus* difiere del de los lactococos, sin embargo se logra la hidrolización de la glucosa metabolizándola en ácido láctico (Zourari y col., 1992). Un efecto inhibitorio de alto contenido de sacarosa en la leche (12% de 10), sobre el crecimiento de las bacterias de yogurt a menudo se ha informado. Esto se debe tanto a un efecto adverso osmótico de los solutos presentes en la leche y una baja actividad de agua (Tamime y Robinson, 1985).

En términos generales se puede considerar que las condiciones de acidificación deseables son aquellas que promueven valores mínimos de V_m . Las tasas de acidificación más negativas generan menores tiempos de proceso, mayor capacidad de producción por turnos y menores costos indirectos como mano de obra, entre otros, si las propiedades y atributos de calidad del producto son las deseadas y no se modifican. Aunque el objetivo del estudio fue buscar las óptimas condiciones de acidificación para la elaboración de yogurt comercial, es de resaltar que una velocidad de acidificación menos acelerada puede ser contemplada en aras de obtener una estructura de coágulo más homogénea y una mejor viscosidad del producto final (Kristo, Biliaderis y Tzanetakis, 2003).

Con los resultados mostrados anteriormente y por medio del software Design Expert se pudieron transformar los valores de la superficie de respuesta a valores de deseabilidad, donde 0 y 1 corresponden

a los valores mínimos y máximos, respectivamente. La máxima deseabilidad para el cultivo iniciador Y, es un porcentaje de azúcar de -1 y una concentración de cultivo iniciador de 1 para tener un V_m de -0.214 $\Delta\text{pH}/\text{min}$, 4.4 horas aproximadamente con un pH inicial de 6.5 y final de 4.6; para el cultivo iniciador L, el porcentaje de azúcar de 36% y una concentración de cultivo iniciador al 30% permitieron obtener el menor valor de V_m (-0.226 $\Delta\text{pH}/\text{min}$), a las 4.2 horas aproximadamente con un pH inicial de 6.5 y final de 4.6.

Finalmente, en este estudio se logró identificar un efecto del porcentaje de azúcar sobre el comportamiento de los cultivos iniciadores, donde Y necesita la menor cantidad de azúcar y L 0.30 como nivel intermedio entre 0 y 1 para poder obtener la V_m más alta. Sin embargo, es importante resaltar que para cualquier condición de proceso siempre habrá una acidificación específica en respuesta a dichas condiciones de proceso. Las bacterias ácido lácticas utilizan preferentemente la lactosa vía glicólisis como fuente de energía (Martinussen y col., 2013). De acuerdo a las características metabólicas de las bacterias acidificantes estas pueden utilizar el azúcar en mayor o menor grado ya que por disminución del pH esta se hidroliza generando glucosa y fructosa. La utilización de los dichos monosacáridos dependerá de K_S . Por lo tanto, el efecto que la adición de azúcar (sacarosa) puede tener sobre el proceso de fermentación de una bacteria dependerá del perfil de carbohidratos utilizados como fuente de energía y de su afinidad por ellos (Zarey col., 2012).

3.2 Crecimiento del Cultivo Iniciador

La cantidad de inóculo es importante para un proceso de acidificación puesto que se asegura el nivel de contenido bacteriano al final de la fermentación en un tiempo determinado y durante el almacenamiento en frío del producto (Kristo, Biliaderis y Tzanetakis, 2003). En la Tabla 5 y 6, se muestra el crecimiento (ciclos \log_{10} (UFC/mL)) para los microorganismos de cada cultivo iniciador Y y L, respectivamente. El Codex a nivel internacional, en productos fermentados tipo yogurt exige que la concentración del cultivo de microorganismos como mínimo sea de 10^7 UFC/g (CODEX, 2010), por lo que los resultados obtenidos se consideran aceptables para Y (crecimiento de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* entre 4.28 \log_{10} UFC/ mL y 7.97 \log_{10} UFC/ mL, y para *S. thermophilus* entre 4.92 \log_{10} UFC/ mL y 7.96 \log_{10} UFC/ mL, como

Tabla 5. Parámetros cinéticos de crecimiento para cultivo iniciador Y

Std	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactic</i>					<i>Streptococcus thermophilus</i>				
	CC (log ₁₀ UFC/ mL)	Tmáx (h ⁻¹)	CI (log ₁₀ UFC/ mL)	R ²	SE	CC (log ₁₀ UFC/ mL)	Tmáx (h ⁻¹)	CI (log ₁₀ UFC/ mL)	R ²	SE
1	2.200 ± 0.229	0.346	5.720	0.962	0.168	1.490 ± 0.206	0.236	6.223	0.979	0.081
2	1.870 ± 0.163	0.293	6.382	0.991	0.067	1.220 ± 0.094	0.196	5.591	0.953	0.107
3	2.080 ± 0.198	0.267	6.621	0.954	0.156	2.300 ± 0.173	0.308	5.356	0.922	0.238
4	2.080 ± 0.198	0.267	6.621	0.954	0.156	2.300 ± 0.173	0.308	5.356	0.922	0.238
5	2.650 ± 0.262	0.389	5.931	0.983	0.136	2.040 ± 0.086	0.295	5.889	0.992	0.071
6	2.050 ± 0.123	0.309	6.671	0.966	0.140	1.370 ± 0.193	0.201	5.774	0.977	0.078
7	2.100 ± 0.058	0.367	5.840	0.990	0.082	1.910 ± 0.228	0.320	5.912	0.988	0.083
8	2.650 ± 0.262	0.389	5.931	0.983	0.136	2.040 ± 0.086	0.295	5.889	0.992	0.071
9	2.080 ± 0.198	0.267	6.621	0.954	0.156	2.300 ± 0.173	0.308	5.356	0.922	0.238
10	1.610 ± 0.260	0.197	6.214	0.925	0.156	1.710 ± 0.044	0.225	6.135	0.886	0.224
11	1.920 ± 0.289	0.267	5.763	0.968	0.136	2.180 ± 0.077	0.367	5.681	0.975	0.130
12	1.700 ± 0.140	0.309	6.886	0.910	0.182	1.210 ± 0.171	0.250	5.728	0.955	0.096
13	2.200 ± 0.229	0.346	5.720	0.962	0.168	1.490 ± 0.206	0.236	6.223	0.979	0.081
14	2.050 ± 0.123	0.309	6.671	0.966	0.140	1.370 ± 0.193	0.201	5.774	0.977	0.078
15	2.080 ± 0.198	0.267	6.621	0.954	0.156	2.300 ± 0.173	0.308	5.356	0.921	0.238
16	1.610 ± 0.260	0.197	6.214	0.925	0.156	1.710 ± 0.044	0.225	6.135	0.886	0.224

Std: Número de Corrida

CC: Crecimiento Microbiano (log₁₀ UFC / mL)

Tmáx: Tasa Máxima de Crecimiento

CI: Concentración Inicial (log₁₀ UFC / mL)R²: Coeficiente de Regresión

SE: Error estándar del Ajuste

valores mínimos y máximos respectivamente) y L (crecimiento de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* entre 6.05 log₁₀ UFC/ mL y 8.82 log₁₀ UFC/ mL y *S. thermophilus* entre 5.40 log₁₀ UFC/ mL y 8.15 log₁₀ UFC/ mL, como valores mínimos y máximos respectivamente).

Para identificar si existía una diferencia significativa en el comportamiento entre los cultivos iniciadores y los microorganismos que los componen en relación con las condiciones de fermentación, se realizó un ANOVA entre las especies para Y y para L, y entre Y y L, utilizando las mismas corridas planteadas en el diseño de superficie de respuesta. Se identificaron diferencias significativas ($p < 0.01$) entre las especies características de Y y L, es decir, el conteo de lactobacilos y estreptococos fue diferente para cada uno de los cultivos iniciadores, sin embargo, de forma individual (para cada cultivo iniciador), el conteo de microorganismos no presentó diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la cantidad de lactobacilos y estreptococos, por lo que se puede

afirmar que existe un crecimiento independiente y diferente para ambos cultivos iniciadores.

Se presentaron diferentes comportamientos en los tiempos de proceso durante la acidificación ya que la cantidad de inóculo iniciador de Y fue más alta con el fin de alcanzar rendimientos similares para las tasas de acidificación de L, puesto que en coincidencia con resultados de otros autores (Ray, Jezeski y Busta, 1971) los productos liofilizados presentan fases lag más larga implicando tiempos de procesos más largos antes de alcanzar la concentración máxima. De igual forma, se afirma que las células liofilizadas obtienen concentraciones de biomasa final más bajas en un período de tiempo determinado con respecto a las células húmedas porque inician con menores cantidades de microorganismos al ser productos con menor número de células viables (Tsaousi, Dimitrellou y Koutinas 2008).

En la Tabla 5 y 6, se observan los resultados de modelo de crecimiento primario para los cultivos iniciadores Y y L, respectivamente.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de crecimiento para cultivo iniciador L

Std	Cultivo Iniciador L									
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>					<i>Streptococcus thermophilus</i>				
	CC (log ₁₀ UFC/ mL)	Tmáx (h ⁻¹)	CI (log ₁₀ UFC/ mL)	R ²	SE	CC (log ₁₀ UFC/ mL)	Tmáx (h ⁻¹)	CI (log ₁₀ UFC/ mL)	R ²	SE
1	2.670 ± 0.184	0.460	4.6396	0.972	0.170	2.640 ± 0.259	0.384	4.904	0.985	0.117
2	2.250 ± 0.084	0.484	4.726	0.928	0.223	2.670 ± 0.170	0.582	4.888	0.998	0.042
3	1.970 ± 0.102	0.535	4.340	0.912	0.253	1.890 ± 0.307	0.448	5.670	0.874	0.259
4	1.970 ± 0.102	0.535	4.340	0.912	0.253	1.890 ± 0.307	0.448	5.670	0.874	0.259
5	2.590 ± 0.076	0.712	3.891	0.981	0.144	2.360 ± 0.181	0.665	5.174	0.986	0.117
6	2.020 ± 0.087	0.457	4.550	0.877	0.304	2.810 ± 0.050	0.481	5.670	0.945	0.231
7	2.750 ± 0.152	0.733	3.961	0.981	0.157	2.480 ± 0.065	0.587	4.472	0.969	0.160
8	2.590 ± 0.076	0.712	3.891	0.981	0.144	2.360 ± 0.181	0.665	5.174	0.986	0.117
9	1.970 ± 0.102	0.535	4.340	0.912	0.253	1.890 ± 0.307	0.448	5.670	0.874	0.259
10	1.630 ± 0.095	0.501	5.056	0.969	0.125	2.880 ± 0.318	0.705	4.472	0.971	0.187
11	2.160 ± 0.247	0.464	5.504	0.976	0.128	2.180 ± 0.077	0.543	5.720	0.97	0.142
12	1.730 ± 0.085	0.429	5.100	0.958	0.132	2.880 ± 0.069	0.625	4.835	0.985	0.259
13	2.670 ± 0.184	0.460	4.640	0.972	0.170	2.640 ± 0.259	0.384	4.904	0.985	0.117
14	2.020 ± 0.087	0.457	4.550	0.877	0.304	2.810 ± 0.050	0.481	4.630	0.945	0.231
15	1.970 ± 0.102	0.535	4.340	0.912	0.253	1.890 ± 0.307	0.448	5.670	0.874	0.259
16	1.630 ± 0.095	0.501	5.056	0.969	0.125	2.880 ± 0.318	0.705	4.472	0.971	0.187

Std: Número de Corrida

CC: Crecimiento Microbiano (log₁₀ UFC / mL)

Tmáx: Tasa Máxima de Crecimiento

CI: Concentración Inicial (log₁₀ UFC / mL)R²: Coeficiente de Regresión

SE: Error estándar del Ajuste

La tasa máxima de crecimiento fue independiente para cada concentración de cultivo iniciador y no presentó diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los diferentes microorganismos de los cultivos iniciadores evaluados para cada nivel de azúcar. En promedio para *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* se obtuvieron Tmáx de 0.320 ± 0.024 , 0.308 ± 0.058 y 0.250 ± 0.080 para los niveles -1, 0 y 1, respectivamente; para *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* la Tmáx corresponde a 0.460 ± 0.012 , 0.570 ± 0.104 y 0.550 ± 0.123 para los niveles -1, 0 y 1, respectivamente; para el *S. thermophilus* de Y las Tmáx que se obtuvieron fueron 0.214 ± 0.020 , 0.296 ± 0.021 y 0.284 ± 0.071 para los niveles -1, 0 y 1, respectivamente. Finalmente para L se obtuvieron Tmáx de 0.462 ± 0.083 , 0.535 ± 0.110 y 0.635 ± 0.083 para los niveles -1, 0 y 1, respectivamente. Es de resaltar que la tasa máxima de crecimiento para *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* fue de 0.389 h^{-1} al nivel de cultivo iniciador de 1, para el *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se obtiene una mayor tasa de crecimiento 0.7331 h^{-1} a un nivel de

cultivo iniciador de 1, para el *S. thermophilus* de Y se obtiene un valor de 0.366 h^{-1} y para L de 0.7048 h^{-1} , correspondiendo a un nivel de cultivo iniciador de -1 y 0, respectivamente. Se obtuvieron mayores tasas de crecimiento en un nivel 0 de cultivo iniciador L que a un nivel -1 de Y. De acuerdo a la literatura consultada, se han reportado tasas de crecimiento de 0.2 h^{-1} para *Lb. delbrueckii* (Zhang y Vadlani, 2013) y 1.15 h^{-1} para *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Adamberg y col., 2003) y un rango de 0.2805 y 0.4672 h^{-1} para *S. thermophilus* (Oner, Erickson y Yang, 1986), por lo que los resultados para el cultivo iniciador Y se encuentran dentro de los límites reportados en la literatura, y los de L son mayores a los reportados. La diferencia de las tasas de crecimiento (número de microorganismos) entre los lactobacilos y los estreptococos se debe principalmente a que después de aproximadamente 3 horas de fermentación, el número de los dos microorganismos debe ser igual (Davis, Ashton y McCaskill, 1971), valores que coinciden con los resultados obtenidos en este trabajo

(Tabla 5 y 6), con más tiempo de fermentación, la tasa de crecimiento de *S. thermophilus* disminuye, mientras que el *Lactobacillus* continúa reduciendo el pH mediante la producción de ácido láctico (Davis, Ashton y McCaskil, 1971). Sin embargo, es importante aclarar que cada cepa tiene una tasa de acidificación específica, para el cultivo iniciador Y se alcanza un T_m de 281.25 min y una $T_{máx}$ para el *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* de 0.389 h^{-1} y de 0.369 h^{-1} para el *S. thermophilus*, en cambio para el cultivo iniciador L se alcanza un T_m de 210 min y una $T_{máx}$ para *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* de 0.733 h^{-1} y de 0.705 h^{-1} para el *S. thermophilus*, por lo que se puede afirmar que algunos microorganismos pueden alcanzar una tasa específica de acidificación a diferentes tiempos (Law y Tamime, 2010) y condiciones específicas de proceso.

Adicional a lo mencionado anteriormente y desde la perspectiva económica e industrial, es de resaltar que para la producción de yogurt, es mucho más importante la tasa de producción de ácido y metabolitos asociados al proceso, que el recuento de células viables, debido a que la tasa de acidificación afecta el tiempo de procesamiento requerido (Zare y col., 2012). Sin embargo, se deben alcanzar recuentos mínimos de microorganismos en el producto final para garantizar el cumplimiento de la normatividad que rige la producción de productos lácteos fermentados a nivel nacional.

Conclusiones

Por medio de la metodología de superficie de respuesta de optimización que permite la variación simultánea de diferentes factores (% de azúcar añadido y concentración del cultivo iniciador), se logró identificar las variables que pueden ser moduladas durante la producción de yogurt con el fin de obtener características potencialmente deseables usando los cultivos iniciadores YOFLEX® y YO-MIXTM 204, donde la V_m y T_m describen la velocidad y el tiempo de acidificación, variables que tienen un impacto importante para la industria. Por último, se consiguió identificar mediante el modelo de crecimiento primario la tasa de crecimiento para cada cultivo iniciador dando como resultado menores tasas de crecimiento para los estreptococos. Es así como la estandarización de procesos productivos que involucran sistemas de optimización y modelos de crecimiento en productos lácteos, pueden influir en el desarrollo del sector.

Nomenclatura

UFC/g	unidades formadoras de colonia por gramo
UFC/mL	unidades formadoras de colonia por mililitro
h	horas
V_m	tasa o Velocidad máxima de acidificación
T_m	tiempo en que se alcanza V_m
T_e	tiempo total de acidificación
ΔpH	cambio de pH
dT	cambio de tiempo
DCU	por sus siglas en inglés, Unidades de Cultura Directa

Agradecimientos

Los autores agradecen a Alpina Productos Alimenticios S. A. por la financiación de este proyecto de investigación presentado a la Convocatoria 548 de 2012 de Colciencias (Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colombia) “para registrar y calificar los proyectos de investigación o de desarrollo tecnológico en los cuales se harán inversiones o donaciones a partir y se asignarán los respectivo cupos de deducibilidad”.

Referencias

- Adamberg, K., Kask, S., Laht, T.M., Paalme, T. (2003). The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 171-83.
- Alimentos I. (2010). Revista de Alimentos. Aumenta el mercado del yogurt en el mundo. Disponible en: www.revistaalimentos.com.co/news/575/443/Aumenta-el-mercado-del-yogurt-en-. Accedido: 28 de Octubre de 2012.
- Ascon-Reyes, D.B., Ascon-Cabrera, M.A., Cochet N., y Lebeault, J.M. (1995). Indirect conductance for measurements of carbon dioxide produced by *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophiles* TJ 160 in pure and mixed cultures. *Journal of Dairy Science* 78, 8-6.
- Baranyi, J. y Roberts, T. (1995). Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology* 26, 199-218.
- Beal, C., Skokanova, J., Latrille, E., Martin, N., y Corrieu, G. (1999). Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and

- viscosity of stirred yogurt. *Journal of Dairy Science* 82, 673-681.
- Beletsiotis, E., Ghikas, D. y Kalantzi, K. (2011). Incorporation of microbiological and molecular methods in HACCP monitoring scheme of molds and yeasts in a Greek dairy plant: A case study. *Procedia Food Science* 1, 1051-1059.
- Boza, Y., Barbin, D., Scamparini, A. R. P. (2004). Effect of spraydrying on the quality of encapsulated cells of *Beijerinckia* sp. *Process Biochemistry* 39, 1275-284.
- CODEX. (2010). Norma CODEX para leches fermentadas. CODEX Stan 243-2003.
- Corona-González, R.I., Ramos-Ibarra, J.R., Gutiérrez-González, P., Pelayo-Ortiz, C., Guatemala-Morales, G.M. y Arriola-Guevara, E. (2013). The use of response surface methodology to evaluate the fermentation conditions in the production of Tepache. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12, 19-28.
- Davis, J., Ashton, T. y McCaskil, M. (1971). Enumeration and viability of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophiles* in yogurt. *Dairy Industries* 36, 569 - 573.
- De Brabandere, A. G. y De Baerdemaeker, G. J. (1999). Effects of process conditions on the pH development during yogurt fermentation. *Journal of Food Engineering* 41, 221-227.
- Díaz-Jiménez, B., Sosa-Morales, M. E. y Vélez-Ruiz, J. F. (2004). Efecto de la adición de fibra y la disminución de grasa en las propiedades fisicoquímicas del yogur. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 3, 287-305.
- Fox, P.F. (1989). En: The milk protein system. Developments in Dairy Chemistry. Functional Milk Proteins. *Applied Science* 4, 1-53.
- Gougouli, M., Kalantzi, K., Beletsiotis, E. y Koutsoumanis, K. P. (2011). Development and application of predictive models for fungal growth as tools to improve quality control yogurt production. *Food Microbiology* 28, 1453-462.
- Hardie, J. M. (1986). Genus *Streptococcus*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 2, Williams & Wilkins, Baltimore, 1043-070.
- Hernández-Díaz, W.N., Hernández-Campos, F. J. , Vargas-Galarze, Z., Rodríguez-Jiménez, G.C. y García-Alvarado, M.A. (2013). Coffee Grain Rotary Drying Optimization. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12, 315-325.
- Higashio, K., Yoshioka, Y., y Kikuchi, T. (1977). Journal of Agricultural Chemical Society of Japan, 51, 209.
- Hui, Y. H., Lisbeth Meunier-Goddik, Jytte Josephsen, Wai-Kit Nip, y Peggy S. Stanfield. (2003). *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*. Taylor & Francis.
- Hutkins, R.W. y Morris, H.A. (1987). Carbohydrate metabolism by *Streptococcus thermophilus*: a review. *Journal of Food Protection* 50, 876 - 884.
- Kandler, O. y Weiss, N.(1986). Genus *Lactobacillus*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 2, Williams & Wilkins, Baltimore, 209-234.
- Kristo, E., Biliaderis, C. y Tzanetakis, N. (2003). Modelling of the acidification process and rheological properties of milk fermented with a yogurt starter culture using response surface methodology. *Food Chemistry* 83, 437-446.
- Law, Barry A. y Tamime, A. Y. (2010). *Technology of cheesemaking*. Editorial Wiley-BlackWell, Londres.
- Little, T. M. y Hills, F. J. (1978). *Agricultural Experimentation Design and Analysis*. Editorial John Wiley and Sons, New York, Estados Unidos.
- Marth, E. y Steele, J. (2001). *Applied Dairy Microbiology*. Editorial CRC Press.
- Martínez Castillo, F. A., Balciunasa, E. M., Salgado, J.M., Domínguez, J.M., Convertic, A. y Oliveira, R.P. (2013). Lactic acid properties, applications and production: A review. *Food Science and Technology* 30, 70 - 83.
- Martinussen, J., Solem, C., Holm, A. K. y Jensen, P. R. (2013). Engineering strategies aimed at control of acidification rate of lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 24, 124-129.

- Oner, M.D., Erickson, L.E. y Yang, S.S. (1986). Analysis of exponential growth data for yoghurt cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 28, 895-901.
- Poolman, B., Royer, T.J., Mainzer, S.E. y Schmidt, B.F. (1989). Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*: a hybrid protein with homology to the melibiose carrier and enzyme III of phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase systems. *Journal of Bacteriology* 171, 244 - 253.
- Ramírez-Sucre, Manuel Octavia y Vélez-Ruiz, Jorge Fernando. (2013). Physicochemical, rheological and stability characterization of a caramel flavored yogurt. *Food Science and Technology* 51, 233 - 241.
- Rao, K. J., Kim, C.-H. y Rhee, S.-K. (2000). Statistical optimization of medium for the production of combinant hirudin for *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. *Process Biochemistry* 35, 639 - 647.
- Ray, B., Jezeski, J. J. y Busta, F. F. (1971). Repair of injury in freeze-dried *Salmonella anatuml*. *Applied Microbiology* 22, 401 - 407.
- Rosso, J., Lobry, J.R., Bajard, S. y Flandrois, J.P. (1995). Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 610 - 616.
- Schnürer, J. y Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology* 16, 70-78.
- Sun-Waterhouse, D., Zhou, J., & Wadhwa, S. S. (2013). Drinking yoghurts with berry polyphenols added before and after fermentation. *Food Control* 32, 450-460.
- Tamillow, K. (2012). América Economía. El boom del consumo de yogurt en Latinoamérica. Disponible en: <http://www.americaeconomia.com/analisis-opinion/el-boom-del-consumo-de-yogurt-en-latinoamerica>. Accesado: 12 de Julio de 2013.
- Tamime, A. Y. (2006). *Probiotic dairy products*. Oxford, UK: Blackwell Publication.
- Tamime, A. Y. y Robinson, R.K. (2000). *Yoghurt. Science and Technology* (Segunda Edición). CRC Press, Cambridge.
- Tamime, A. Y. y Robinson, R. K. (1985). *Yoghurt. Science and Technology* (Primera Edición). Pergamon, Press, Oxford.
- Tsaousi, K., Dimitrellou, D. y Koutinas, A. A. (2008). Low-temperature thermal drying of *Saccharomyces cerevisiae* starter culture for food production. *Food Chemistry* 110, 547-553.
- Téllez-Mora, P., Peraza-Luna, F. A., Feria-Velasco, A. y Andrade-González, I. (2012). Optimización del proceso de fermentación para la producción de tequila, utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11, 163 - 176.
- Thomas, T.D. y Crow, V.L. (1983). Lactose and sucrose utilization by *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiology Letters* 17, 13 - 17.
- Torriani, S., Gardini, F., Guerzoni, M. E. y Dellaglio, F. (1996). Use of Response Surface Methodology to Evaluate some Variables Affecting the Growth and Acidification Characteristics of Yoghurt Cultures. *International Dairy Journal* 6, 625 - 636.
- Walstra, P., Wouters, J. T.M. y Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology* (Segunda Edición). Estados Unidos: Taylor & Francis Group.
- Zare, F., Champagne, C. P., Simpson, B. K., Orsat, V. y Boye, J. I. (2012). Effect of the addition of pulse ingredients to milk on acid production by probiotic and yoghurt starter cultures. *LWT - Food Science and Technology* 45, 155 - 160.
- Zhang, Y. y Vadlani, P. (2013). D-Lactic acid biosynthesis from biomass-derived sugars via *Lactobacillus delbrueckii* fermentation. *Bioprocess and Biosystems*, 1 - 8.
- Zourari, A., Accolas, J.P. y Desmazeaud, M. J. (1992). Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review. *Lait* 72, 1 - 34.