

## **I. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Materia Prima**

#### **5.1.1 Leche**

Se empleó leche en polvo de la marca Nido<sup>®</sup> y Svelty<sup>®</sup>, para ajustar a los diferentes niveles de grasa requeridos (1, 2 y 3%). Para yogurt al 1% de grasa, se emplearon 36.8 g de leche Nido en 200 mL de agua y 95.6 g de leche Svelty en 700 mL de agua, para yogurt 2 % de grasa, se emplearon 112.5 g de leche Nido 700 mL de agua y 28.3 g de leche Svelty en 200 mL de agua, finalmente para yogurt con 3 % de grasa se emplearon 130 g de leche Nido en 900 mL de agua.

#### **5.1.2 Microorganismos iniciadores de la fermentación**

Proporcionados por la empresa Dantec de México que son un cultivo liofilizado que se adiciona directamente, llamado Jo-Mix<sup>®</sup> VM 1-30 Visbyvac DIP que contiene *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius spp. thermophilus*.

#### **5.1.3 Fuente de fibra**

Se utilizaron como fuente de fibra dos suplementos alimenticios; linaza canadiense de la marca Northern Health en presentación de 425 g y linaza mexicana de la marca Nutrisa en presentación de 500 g, ambas compradas en tiendas naturistas.

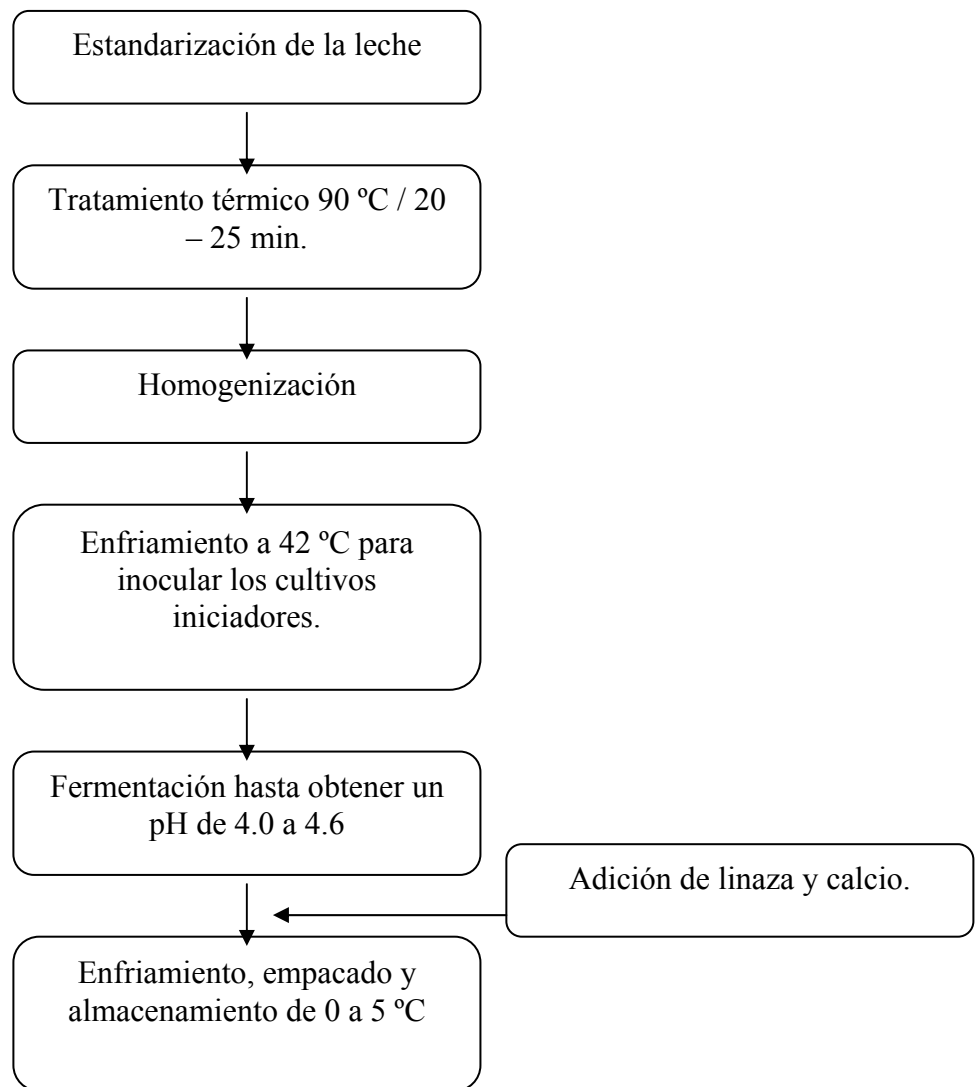
#### **5.1.4 Sal o Fuente de Calcio**

La fuente que se utilizó para proporcionar mayor contenido de calcio en el yogurt fue el citrato de calcio tetrahidratado de la marca Omnicem<sup>®</sup>, por ser una sal orgánica que se

absorbe intestinalmente mejor que las sales inorgánicas y porque su efecto en el sabor no es notorio.

## 5.2 Métodos

La Figura 4 muestra el proceso de elaboración de yogurt en este trabajo.



**Figura 4.** Proceso de elaboración de yogurt.

El producto se almacenó en envases de plástico a 5 °C durante 4 semanas, examinando periódicamente las características fisicoquímicas, así como características sensoriales (color, aroma, consistencia, sabor y aceptabilidad general) y propiedades reológicas.

Las mediciones de las diferentes propiedades fisicoquímicas se realizaron por duplicado, en donde se obtuvo el promedio y la desviación estándar de cada propiedad, tales mediciones se llevaron a cabo por 28 días, tomando como tiempo 0 el día en que se elaboró el yogurt, tiempo 1 a los 7 días, tiempo 2 a los 14 días, tiempo 3 a los 21 días y tiempo 4 a los 28 días.

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente a través del programa Minitab, mediante un análisis de varianza (ANOVA), utilizando una prueba de Tukey, con nivel de confianza del 95 %, para determinar si hubo diferencia significativa.

### **5.2.1 pH**

Para realizar esta medición se usó el potenciómetro digital Beckman®, el cual fue calibrado previamente con buffer a pH = 4 y pH = 7. El valor se obtuvo introduciendo directamente el electrodo dentro de la muestra.

### **5.2.2 Acidez titulable**

Se determinó de acuerdo al método 16.023 (A.O.A.C., 1984). Basado en una titulación con NaOH 0.1 N. Se colocaron aproximadamente 5 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, posteriormente se añadió agua destilada y se agitó vigorosamente, se incorporaron tres gotas de fenolftaleína al 1% y se tituló con NaOH 0.1 N, hasta obtener una coloración rosada. La acidez se expresó como porcentaje de ácido láctico, teniendo la siguiente relación:

$$1\text{mL de NaOH } 0.1\text{N} = 0.009\text{g de ácido láctico}$$

El porcentaje de acidez se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Acidez} = \frac{(\text{mL de NaOH}) * (\text{N de NaOH}) * 9}{\text{Peso de la muestra}} * 100$$

### 5.2.3 Sinéresis

La sinéresis se determinó sobre la base de la técnica de Guinee *et al.*, (1995). Se pesaron 10 g de yogurt a 12 °C en un tubo de centrifuga y se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 20 minutos. El peso del sobrenadante obtenido se empleó para calcular el porcentaje de sinéresis mediante la expresión siguiente:

$$\text{Sinéresis} = \frac{\text{Peso del sobrenadante}}{\text{Peso de la muestra}} * 100$$

### 5.2.4 Color

Se determinó a través de un colorímetro Gardner Colorgard System/05<sup>®</sup>, midiéndose la reflectancia de cada muestra, antes de medir el color de los sistemas, el colorímetro se calibró con 2 mosaicos (negro y blanco), una vez calibrado se colocaron aproximadamente 10 g de muestra en un recipiente de cuarzo transparente que permitió el paso de la luz, obteniendo los parámetros L, a y b de la escala de Hunter.

El cambio neto de color ( $\Delta E$ ). Se calculó con la siguiente ecuación:

$$\Delta E = \sqrt{(L_c - L_m)^2 + (a_c - a_m)^2 + (b_c - b_m)^2}$$

donde el subíndice c significa que es del control y el subíndice m significa que es de la muestra.

### 5.2.5 Humedad

Para cuantificar la cantidad de sólidos se utilizó el método 16.032 (A.O.A.C., 1984) que consiste en pesar aproximadamente 7 g de muestra en cajas Petri a peso constante, las cuales son colocadas en un baño María para evaporar de la muestra la mayor cantidad de agua posible, posteriormente se introducen en una estufa de vacío Cole Palmer (modelo 05053 – 10) durante 5 horas a una temperatura de 75 °C y a una presión de vacío de 15 a 20 mm de Hg, finalmente las cajas se enfrían en un desecador y se pesan para que por diferencia de pesos se obtenga el contenido de sólidos.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso de charola final} - \text{Peso de charola inicial}}{\text{g muestra}} \times 100$$

### 5.2.6 Densidad

La medición de esta propiedad, se realizó a través del un método gravimétrico, empleando picnómetros de metal (de Grease), donde se pesan el picnómetro vacío, el picnómetro con agua destilada y el picnómetro con yogurt.

La densidad se obtiene con la siguiente ecuación:

$$\rho_{\text{yogurt}} = \frac{\text{Peso (pic + yogurt)} - \text{Peso (pic vacío)}}{\text{Peso (pic + agua)} - \text{Peso (pic vacío)}}$$

### 5.2.7 Reología

Para conocer los parámetros reológicos se empleó el viscosímetro digital Brookfield DV-I (Brookfield Engineering Laboratorios Inc.), en donde se tomaron mediciones a diferentes velocidades de 0.5 a 100 rpm y diferentes semanas de almacenamiento

(semana 0, 2 y 4), empleando para cada medición 350 mL de producto almacenado a las diferentes semanas.

Las muestras se colocan en vasos de 400 mL y se utilizó la aguja HA/HB-2, en todos los sistemas.

Para la obtención de la razón de corte se utilizó la siguiente ecuación:

$$\gamma = \frac{2\omega R_c^2}{(R_c^2 - R_b^2)}$$

y

$$\omega = \frac{2\pi}{60} N$$

donde:  $\gamma$  = Razón de corte (1/s).  
 $R_c$  = Radio del recipiente (3.7 cm).  
 $R_b$  = Radio de la aguja (2.35 cm).  
 $\omega$  = Velocidad angular de la aguja (rad/s).  
 $N$  = Velocidad de la aguja (rpm).

El esfuerzo cortante se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\tau = \frac{T}{2\pi R_b^2 L}$$

donde:  $\tau$  = Esfuerzo cortante (dinas/cm<sup>2</sup>).  
 $T = 673.7$  (dinas cm) \* Lectura (%).  
 $L$  = Longitud efectiva de la aguja (4.92 cm).  
 $R_b$  = Radio de la aguja (2.35 cm)

En este trabajo se utilizó el modelo de la Ley de Potencia y el modelo de Herschel Bulkley, donde la ecuación para Ley de Potencia es:

$$\tau = K \gamma^n$$

Donde:

$\gamma$  = Razón de corte o velocidad de deformación (1/s).

$\tau$  = Esfuerzo cortante (dinas/cm<sup>2</sup> o Pa).

$K$  = Coeficiente de consistencia ((dinas/cm<sup>2</sup>)\* s<sup>n</sup> o Pa\*s<sup>n</sup>).

$n$  = Índice de flujo (adimensional).

Cuando se aplica el modelo de la ley de potencia, se debe graficar log  $\gamma$  contra log  $\tau$ , y al linealizar se obtiene la pendiente y el intercepto; la pendiente equivale a  $n$  (índice de flujo) y el intercepto a log  $K$ , donde el coeficiente de consistencia es igual al antilog  $K$ .

La ecuación para el modelo Herschel Bulkley es:

$$\tau = \tau_0 + K \gamma^n$$

Donde:

$\gamma$  = Razón de corte o velocidad de deformación (1/s).

$\tau$  = Esfuerzo cortante (dinas/cm<sup>2</sup> o Pa).

$K$  = Coeficiente de consistencia ((dinas/cm<sup>2</sup>)\* s<sup>n</sup> o Pa\*s<sup>n</sup>).

$n$  = Índice de flujo (adimensional).

$\tau_0$  = Esfuerzo de cedencia

Se aplicaron las pruebas de bondad de ajuste PEM (porcentaje de error medio) y RMSE (raíz cuadrada del error medio) a ambos modelos, para verificar que tan eficaz es

el ajuste de cada modelo para el comportamiento reológico del yogurt y para conocer cual modelo fue mejor.

$$PEM = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \left( \frac{|\tau_{\text{exp}} - \tau_{\text{pred}}|}{\tau_{\text{exp}}} \right)$$

$$RMSE = \left[ \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\tau_{\text{exp}} - \tau_{\text{pred}})^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

### **5.2.8 Determinación de fibra cruda.**

#### **Método 7.073 (A.O.A.C. 1984).**

Para su determinación fue necesario montar un sistema digestor que consiste de un refrigerante recto montado verticalmente a un matraz esmerilado de fondo plano de 500 mL, colocado sobre un nido de calentamiento, un soporte universal, pinzas para detener el refrigerante y mangueras para mantener una circulación de agua a través del refrigerante.

Posteriormente, ya montado el equipo se pesaron las muestras a analizar (20 g de yogurt) y se colocaron en el matraz de digestión junto con 200 mL de ácido sulfúrico al 1.25 % y 5 perlas de ebullición, comenzando a hervir la muestra con el ácido se dejó 30 minutos y se prosiguió a filtrar la mezcla a través de una tela de algodón, el residuo se lavó con agua destilada caliente, posteriormente se transfirió al matraz digestor y se realizó la digestión similar a la del ácido sulfúrico solo que ahora con hidróxido de sodio al 1.25 %, se lavó el residuo de manera similar a la indicada para el primer filtrado.

Una vez realizado lo anterior, se lavó nuevamente el residuo pero ahora con etanol caliente y transfirió a un crisol (a peso constante), el cual se colocó en una estufa



(110°C) de 4 a 6 horas, transcurrido este período se enfrió el crisol en un desecador durante 30 minutos, se pesó y se llevó a una mufla a 600°C por 5 horas y nuevamente se transfirió a un desecador, donde se mantuvo ahí por 30 minutos y se peso. El % de fibra se obtuvo por la siguiente ecuación:

$$\%Fibra\ cruda = \frac{Peso\ crisol\ después\ de\ la\ estufa - Peso\ crisol\ después\ de\ la\ mufla}{Peso\ de\ la\ muestra} * 100$$

### **5.2.9 Determinación de fibra dietética**

#### **Método gravimétrico-enzimático 45.4.07 (A.O.A.C, 1995)**

##### **5.2.9.1 Desengrasado**

A muestras por duplicado de alimento deshidratado, extraerle la grasa si contiene más del 10%, colocando para ello 10 g de muestra en un vaso de precipitado de 100 mL previamente tarado, añadir 25 mL de éter de petróleo y agitar durante 15 minutos mediante un agitador magnético. Dejar reposar durante un minuto, luego decantar la capa sobrenadante clarificada. Repetir la extracción dos veces más con éter de petróleo. Colocar el vaso en una estufa y secar el producto desengrasado bajo vacío a 70 °C durante toda la noche. Enfriar en un desecador por 30 minutos. Almacenar la muestra ya seca en el desecador hasta llevar a cabo su análisis.

##### **5.2.9.2 Determinación de fibra dietética**

Se Pesaron por duplicado, con una aproximación de 0.1 mg, muestras de 1g dentro de vasos de precipitado largos de 400 mL. Se adicionaron 50 mL de buffer de fosfato (0.08 M, pH 6.0) a cada vaso. Se checó el pH a 6.0 y se ajustó si es necesario a pH ± 0.2.

Se adicionaron 0.1 mL de solución de  $\alpha$ -amilasa. Se cubrió el vaso con una hoja de aluminio y se colocó en baño de ebullición por 30 minutos. Se agitó ligeramente cada 5 minutos. Las soluciones se enfriaron a temperatura ambiente, se ajustó el pH a  $7.5 \pm 0.2$ , por adición de 10 mL de solución NaOH 0.275 N. Inmediatamente se adicionaron 5 mg de proteasa, se cubrió el vaso con aluminio e incubó a 30 minutos  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación continua. Se enfrió y adicionaron 10 mL de HCl 0.325 M, se midió el pH y adicionaron gotas de ácido. El pH final fue de 4.0 a 4.6. Se adicionaron 0.3 mL de amilogucosidasa, se cubrió nuevamente con aluminio e incubó 30 minutos a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación continua.

Se retiraron los vasos de baño de agua y añadieron enseguida a cada uno 280 mL de etanol al 95 % precalentado a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se dejó que se formara el precipitado a temperatura ambiente durante 60 minutos.

Mediante un embudo, bomba de vacío y papel Whatman # 4, se succionó el precipitado resultante de la digestión enzimática, así mismo se lavó el residuo sucesivamente con 60 mL de etanol al 78%, 20 mL de etanol al 95 % y 20 mL de acetona G.R.

Se transfirió el papel filtro junto con el residuo a un recipiente pequeño y se dejó secar toda la noche en un horno con vacío a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se enfrió en un desecador y se pesaron los residuos restando el peso del papel filtro. Se analizó el residuo de una de las muestras para proteína, usando  $N_2 \times 6.25$  como factor de conversión.

El segundo residuo se incineró en un crisol (peso constante) por 5 horas en una mufla a  $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se enfrió el crisol en un desecador y se peso. Finalmente se calculó el porcentaje de fibra dietética total usando la siguiente ecuación.

$$\% TDF = \frac{[\text{Peso del residuo} - P - A]}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

Donde:

TDF = Fibra dietética total

P = Peso de proteína

A = Peso de ceniza

### **5.2.10 Determinación de calcio.**

#### **Método 33.7.08 (A.O.A.C, 2000).**

La determinación del contenido de calcio en el yogurt fue determinado mediante espectrofotometría de absorción atómica con un equipo SpectraAA 220 FS (Atomic Absorption Spectrometer) de la marca Varian®, el cual se encuentra en el laboratorio del departamento de Química y Biología, UDLA-P.

Se prepararon estándares con una solución stock de calcio con las siguientes concentraciones: 0, 1, 2, 3, 4 y 5 ppm a los cuales se les adicionó cloruro de estroncio, (10 mL), cloruro de potasio (10 mL) y ácido nítrico 1:1 (0.4 mL).

Las muestras de yogurt se prepararon de la siguiente forma: en crisoles a peso constante se colocaron 20 g de yogurt para ser secado en una estufa a 110 °C durante un día para eliminar la humedad, posteriormente la muestra fue llevada a incineración en una mufla a 600 °C por 12 horas. De las cenizas obtenidas sólo se pesaron 0.05 g aproximadamente y se acidificaron con 2 mL de HNO<sub>3</sub> 1:1, posteriormente se filtran con papel Whatman No. 4 y se aforaron a 50 mL con agua destilada. De este filtrado se tomaron 2 mL y se les adicionó 5 mL de SrCl<sub>2</sub>, 5 mL de KCl y 0.2 mL de HNO<sub>3</sub> 1:1. Estas soluciones y los estándares (soluciones a diferentes ppm mostradas en el Apéndice C), después de preparadas permanecieron en refrigeración, hasta la lectura en el espectrofotómetro.

La determinación de calcio se realizó mediante una flama de óxido nitroso-acetileno, utilizando una longitud de onda de 422.7 nm y un paso de banda de 0.5 nm.

Con los estándares se obtuvo una curva de calibración de acuerdo a las diluciones realizadas y con las lecturas proporcionadas por el equipo se obtuvieron los resultados de mg de calcio en la muestra.

### **5.2.11 Determinación de grasa**

#### **Método 31.4.02 (A.O.A.C, 2000).**

El contenido de grasa fue determinado por el método de Soxhlet, que consiste en poner a peso constante un matraz Soxhlet, pesar 5 g de muestra, secarla por 1 día en una estufa a 40 °C, ya seca se envuelve en papel filtro y se coloca en un cartucho de extracción, se monta el equipo y se añaden 150 mL de éter de petróleo al matraz.

Se enciende el equipo y se deja hervir por 8 horas, terminada la extracción se apaga el equipo y se evapora el solvente en un baño maría. El solvente residual se evapora, colocando el matraz en una estufa a 110 °C por 15 minutos; se enfría en un desecador y se calcula el % de grasa por diferencia de pesos.

$$\% \text{ Grasa} = \frac{\text{Peso de matraz final} - \text{Peso de matraz inicial}}{\text{g muestra}} \times 100$$

### **5.2.12 Determinación proteína por micro Kjeldahl.**

#### **Método 12.1.07 (A.O.A.C, 2000)**

##### **5.2.12.1 Digestión**

Pesar 0.2 g de muestra y 0.8 g de mezcla digestora en un matraz Kjeldahl, adicionar lentamente y dentro de una campana de extracción, 4 mL de ácido sulfúrico concentrado, haciéndolo resbalar por el cuello del matraz. Enseguida encender el extractor Kjeldahl y colocar el matraz sobre una de las parrillas, de manera que la boca del matraz quede dentro de uno de los orificios del extractor de vapores.

Mantener el calentamiento suave (No. 4), durante el tiempo que sea necesario hasta que la solución contenida en el matraz se aclare, transcurrido este período, apagar la parrilla y dejar que el matraz se enfríe.

Encender el aparato de destilación micro Kjeldahl a 80 °C para que se vaya alcanzando la temperatura.

### **5.2.12.2 Neutralización**

Tan pronto como el matraz se enfríe, adicionar lentamente gota por gota 12 mL de NaOH al 45 % (esto debe hacerse bajo la llave del agua) y 10 mL de agua destilada.

### **5.2.12.3 Destilación**

Una vez alcanzada la temperatura del destilador, se enjuaga éste con agua destilada y enseguida se agrega la muestra antes mencionada, en la alargadera final que tiene el refrigerante introducir un matraz de 50 mL que contiene 5 mL de ácido bórico al 4% y tres gotas de indicador rojo de metilo. Abrir la llave de agua de entrada al refrigerante y verificar que esté circulando adecuadamente, la destilación se debe realizar hasta que el matraz contenga 40 mL de la mezcla ya destilada. Una vez que esto se haya logrado, remover el matraz receptor.

### **5.2.12.4 Titulación**

Valorar el destilado obtenido con solución de HCl 0.1 N. Determinar el contenido de proteína en la muestra, siguiendo la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Proteína} = \frac{6.25 (\text{Factor de } N) * 0.014 * 0.1 (N \text{ del ácido}) * \text{mL HCl gastados}}{\text{g muestra}} \times 100$$

### **5.2.13 Estandarización del producto**

La estandarización se basó en pruebas sensoriales de aceptación determinando la concentración adecuada de cada uno de los parámetros a evaluar. La selección adecuada se determinó con la ayuda de jueces no entrenados para seleccionar el producto preferido, ordenándola de la más preferida a la menos preferida usando una prueba hedónica (Apéndice D), se realizaron en dos etapas, la primera a la semana 0 y la segunda a la semana 2.