



**Universitat Autònoma
de Barcelona**



**Universidad Autónoma de Barcelona
Facultad de Veterinaria
Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos**

“Trabajo presentado para la superación de los 15 créditos del Módulo Trabajo Fin de Máster
del **Máster Oficial en Calidad de Alimentos de Origen Animal**”

**Efecto de las concentraciones de grasa y proteína en la
determinación del pH mediante dispersión de luz en la
elaboración de yogur**

Autor: Roxana Benavides Guerrero
Directores: Manuel Castillo Zambudio
Anna Zamora Viladomiu
Oscar Arango Bedoya
Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), noviembre 2020

Declaro ser la autora de este Trabajo Fin de Máster que se presenta para obtener el grado de Maestría en Calidad de Alimentos de Origen Animal en la Universidad Autónoma de Barcelona, España. Este trabajo no ha sido presentado antes para obtener ningún grado o examen en cualquier otra universidad.

Roxana Benavides Guerrero

Bellaterra, 18 de noviembre de 2020

Los Doctores Oscar Arango Bedoya (Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia), Manuel Castillo Zambudio y Anna Zamora Viladomiu (Área de Tecnología de los Alimentos del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Barcelona).

INFORMAN

Que el trabajo titulado: *“Efecto de las concentraciones de grasa y proteína en la determinación del pH mediante dispersión de luz en la elaboración de yogur”* ha sido realizado bajo nuestra supervisión y tutela por Roxana Benavides Guerrero dentro del módulo “Trabajo Fin de Máster” del Máster en Calidad de Alimentos de Origen Animal de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente en Bellaterra (Cerdanyola del Vallés) a 18 de noviembre de 2020.

Manuel Castillo Zambudio

Anna Zamora Viladomiu

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Oscar Arango', with a large, sweeping horizontal stroke above the name.

Oscar Arango Bedoya

Agradecimientos

Gracias infinitas a Dios, sin Él nada es posible.

Al Dr. Manuel Castillo Zambudio, por su amabilidad, paciencia y sus innumerables conocimientos compartidos.

A la Dra. Anna Zamora Viladomiu, por su amabilidad, enseñanzas y supervisión en este proceso.

Al Dr. Oscar Arango Bedoya, quien deposito su confianza y me dio la oportunidad de aprender en este gran proyecto.

Al Departamento de Ciencia de los Alimentos.

Al Centro de Estudios Interdisciplinarios Básicos y Aplicados - CEIBA.

Gratitud eterna a mis pilares, quienes me formaron para ser una mujer de bien, mis padres Oscar y Amanda.

A mis profesores gracias por su tiempo, por su apoyo y enseñanzas.

A mis amigos de momentos imborrables, siempre en mi corazón.

Roxana Benavides Guerrero

ÍNDICE

ABSTRACT	1
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. MATERIAL Y MÉTODOS	6
2.1 Diseño experimental	6
2.2 Estandarización de la leche	6
2.3 Preparación del inóculo	8
2.4 Procedimiento de los ensayos	8
2.5 Monitorización de la ratio de dispersión de luz NIR y del pH en continuo	9
2.5.1 Determinación de los parámetros de dispersión de luz NIR	9
2.5.2 Ajuste del voltaje de ganancia	10
2.5.3 Medición de pH en continuo	10
2.6 Medidas de reología	10
2.7 Análisis fisicoquímicos	11
2.8 Procedimiento de calibración y validación de los modelos de predicción de pH y de G'	11
2.9 Análisis estadístico	11
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
3.1 Composición de las muestras	13
3.2 Efecto de la concentración de proteína y grasa sobre la coagulación ácida del yogur	13
3.3 Calibración y validación del modelo de predicción de pH	19
3.3.1 Calibración y validación del modelo con datos de la monitorización <i>in-line</i> sin ajuste del voltaje inicial (cubeta 1)	19
3.3.2 Calibración y validación del modelo con datos de la monitorización <i>in-line</i> con ajuste del voltaje inicial (cubeta 2)	21
3.3.3 Calibración y validación del modelo con datos de la monitorización <i>off-line</i>	23
3.4 Calibración y validación del modelo de predicción del módulo elástico (G')	25
CONCLUSIONES	28
REFERENCIAS	29

LISTADO DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de la varianza
CCP	Fosfato cálcico coloidal
CV	Coefficiente de variación
G	Concentración de grasa en la leche
G'	Modulo de almacenamiento o módulo elástico
$G'_{pH4,6}$	Valor del módulo elástico a pH = 4,6
GLM	Modelo lineal general
min	Minutos
n	Número de réplicas en diseño factorial aleatorizado
N	Número total de observaciones en diseño factorial aleatorizado
Nc	Número de observaciones de calibración
Nv	Número de observaciones de validación
NIR	Infrarrojo próximo
P	Concentración de proteína en la leche
Pa	Pascales
pH_{min}	pH mínimo de validación
R	Ratio de dispersión de luz
R^2	Coefficiente de determinación
$R_{pH4,6}$	Valor de R a pH = 4,6
s	Segundos
SEP	Error estándar de predicción
t	Tiempo
$t_{pH4,6}$	Tiempo a pH = 4,6
T	Temperatura
V_0	Voltaje inicial

ABSTRACT

Industrial yogurt production is generally controlled by measuring discontinuously the pH of samples every 10-15 min, which presents logistical and hygienic drawbacks. Arango (2015) proposed mathematical models that allow the *in-line* estimation of pH and elastic modulus (G') during yogurt fermentation, using the NIR light scattering ratio at 880 nm, these models were calibrated and validated for yogurts made with different levels of inulin as a fat substitute, finding promising results. Therefore, the objective of this work was to validate the aforementioned mathematical models to predict pH and G' in yogurts made with different concentrations of protein (3.1, 3.6 and 4.1%) and fat (0.5, 1.5 and 3.6%). The pH data measured both *in-line* and *off-line* (i.e., sampling) were used. The results showed that correcting the initial voltage to a constant value improved the fit of the pH prediction model, since the values of the standard error of prediction (SEP) for validation decreased in 6 of the 9 treatments (66.7%) compared to those obtained without adjusting the voltage. The global results showed that the prediction models of pH and G' had adequate goodness. However, additional work is still required to obtain prediction values of the final pH and elastic modulus with the precision that is required for its implementation at an industrial level.

Keywords: yogurt, fermentation, pH, elastic modulus, prediction, validation, light scattering, NIR, voltage.

RESUMEN

La producción de yogur a nivel industrial se controla mediante la medición de muestras discontinuas de pH cada 10-15 min, lo que presenta inconvenientes logísticos e higiénicos. Arango (2015) propuso sendos modelos matemáticos que permiten la estimación *in-line* del pH y del módulo elástico (G') durante la fermentación de yogur, usando la ratio de dispersión de luz NIR a 880 nm. Dichos modelos fueron calibrados y validados para yogures elaborados con diferentes niveles de inulina como sustituto de grasa, encontrando resultados prometedores. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue validar los modelos matemáticos mencionados para predecir el pH y G' en yogures elaborados con diferentes concentraciones de proteína (3,1; 3,6 y 4,1%) y grasa (0,5; 1,5 y 3,6%). Se usaron datos de pH medidos tanto en línea como de forma externa (i.e., muestreo). Los resultados mostraron que corregir el voltaje inicial a un valor constante mejoró el ajuste del modelo de predicción del pH, ya que los valores del error estándar de predicción (SEP) para la validación disminuyeron en 6 de los 9 tratamientos (66,7%) comparado con los obtenidos sin ajustar el voltaje. Los resultados globales mostraron que la bondad de ajuste de los modelos de predicción de pH y G' fueron adecuados. Sin embargo, aún se requiere trabajo adicional para llegar a obtener valores de predicción del pH y G' finales con la precisión que se requiere para su implementación a nivel industrial.

Palabras clave: yogur, fermentación, pH, modulo elástico, predicción, validación, dispersión de luz, NIR, voltaje.

1. INTRODUCCIÓN

El yogur es uno de los productos lácteos más consumidos a nivel mundial por su sabor aromático y consistencia. Además presenta un alto contenido de nutrientes que contribuye de manera significativa a la ingesta, entre ellos micronutrientes como riboflavina, vitaminas B₆ y B₁₂, calcio, potasio, zinc y magnesio (Shao et al., 2007; Tremblay and Panahi, 2017).

La formación del gel durante la fermentación de la leche se debe básicamente a la desestabilización del complejo de caseína, siendo un proceso irreversible. A medida que el pH disminuye de ~6,6 a ~4,6, la carga negativa neta de las micelas, y por tanto la repulsión electrostática, decrecen, al tiempo que la solubilización del fosfato cálcico coloidal (CCP) aumenta, debilitando la estructura interna de las micelas de caseína. Cuando el pH es cercano al punto isoeléctrico de la caseína, la atracción entre micelas de caseína aumenta debido al incremento de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. El proceso de acidificación resulta en la formación de una red tridimensional conformada por agregados y cadenas de caseína (Lee y Lucey, 2004; Tamime and Robinson, 2007; Lucey, 2017).

Las propiedades reológicas de los geles ácidos pueden verse afectadas por la composición de la leche, la temperatura y tiempo de pretratamiento térmico, así como por la temperatura de incubación, el pH, la fuerza iónica, el tipo y cantidad del cultivo iniciador y el contenido de caseínas, que afectan directamente a la velocidad de acidificación (Xu et al., 2008; Lucey 2017). La microestructura del yogur tiene un efecto en su textura y atributos sensoriales; una textura firme puede ser causada por un contenido alto de sólidos (interacción proteína y grasa) y un cuerpo débil a un bajo contenido de sólidos (grasa) (Langton et al., 1996).

La norma de calidad para la elaboración y comercialización del yogur (RD 271/2014) estipula que el contenido mínimo de grasa será del 2% para los yogures enteros, mientras que para yogures semidesnatados entre 0,5% y 2%, y para yogures desnatados inferior a 0,5%. Todos los yogures deberán tener un pH igual o inferior a 4,6, por lo que cuando alcanzan dicho valor, se da por finalizada la fermentación y se aplica inmediatamente frío para detenerla. La fabricación de yogur se ha estandarizado mucho debido a los avances en microbiología, enzimología, bioquímica y bioingeniería (Tolosa et al., 2006).

Muchos de los factores indicados anteriormente pueden afectar marcadamente a la cinética de descenso de pH y la coagulación ácida, como la variación en la composición de las materias primas, el comportamiento irregular de los microorganismos iniciadores, la temperatura de incubación, las condiciones de elaboración, así como la homogenización, el

pretratamiento térmico de la leche, junto con otras variables del proceso, que pueden incluso dar lugar a defectos en el producto (Tamime y Robinson, 2007). Estos factores causan, por tanto, gran variación en el tiempo al cual se alcanza el valor máximo permitido de pH para detener el proceso de fermentación. La determinación del punto final de la coagulación ácida es esencial para la fabricación de yogur, ya que tiene efectos no solo sobre la seguridad del producto, sino también sobre sus características fisicoquímicas, sensoriales y en los costos de producción (Soukoulis et al., 2007).

En la actualidad, la determinación del punto final en el proceso de elaboración del yogur se realiza tomando muestras sucesivas del tanque de fermentación para medir el pH, lo que implica una cantidad considerable de trabajo manual, consumo de tiempo y riesgo de contaminación del lote (Arango et al., 2020). La medición continua de pH en plantas industriales se ve afectada por la adhesión de proteínas a la sonda, lo que distorsiona las mediciones, dificulta el mantenimiento y genera un riesgo de rotura de los electrodos, que de hecho, impide su uso (De Brabandere and De Baerdemaeker, 1999). Aunque se han desarrollado sondas de pH irrompibles, éstas requieren operaciones de limpieza y calibración mediante sistemas automatizados antes de cada producción, lo que resulta altamente dispendioso y engorroso.

Arango (2015), estudió la utilización de un sensor de dispersión de luz NIR para la monitorización en línea de la coagulación del yogur con distintos niveles de sustitución de grasa por inulina. En dicho trabajo se encontró que la ratio de dispersión de luz evolucionó en función de la curva de acidificación, a partir de lo cual se propuso un modelo matemático para estimar los valores de pH al final de la fermentación. El modelo óptico fue calibrado y validado en las condiciones experimentales empleadas, logrando predecir la evolución del pH desde 5,2 hasta 4,6 con un R^2 mayor de 0,993 y un SEP entre 0,11 y 0,02 unidades de pH, demostrando que este es un método prometedor para el control en línea del pH a nivel industrial (Arango et al., 2020).

Sin embargo, a pesar de tales prometedores resultados, es necesario evaluar la bondad del modelo bajo las distintas condiciones de elaboración del yogur, como la variación en la temperatura de incubación, la concentración de proteína, de grasa, y de inóculo, entre otras.

Liu (2019) evaluó la aplicabilidad del modelo para la predicción del pH durante la fermentación del yogur elaborado a partir de leche desnatada con dos concentraciones de proteína (3,5% y 4,0%) e incubado a dos temperaturas (43 y 46 °C). Además, evaluó si el ajuste de ganancia del voltaje inicial en el sensor óptico (realizados por dos métodos distintos)

permitiría la mejora de las predicciones de pH obtenidas con el método por Arango (2015). Los resultados mostraron que la temperatura fue el principal factor que afectó la precisión del ajuste del modelo, encontrando un mejor ajuste a 43 °C que a 46 °C. Se observó que es recomendable realizar el ajuste inicial en la ganancia del voltaje. En los resultados del proceso de validación del modelo, Liu (2019) obtuvo valores de SEP $\leq 0,09$ unidades de pH y CV $\leq 1,82\%$.

Arango (2015), además, propuso un modelo matemático que permitiera predecir los valores del módulo elástico (G') del yogur en función de la ratio de dispersión de luz, dado que R se correlaciona con el proceso de endurecimiento del gel en tiempo real, los resultados fueron prometedores y hasta la fecha no se ha podido evaluar el modelo con diferentes concentraciones de proteína y grasa.

Es necesario entonces continuar realizando estudios que permitan determinar la capacidad de los modelos para predecir tanto pH como G' durante la fermentación del yogur bajo condiciones cambiantes en los factores de producción, con el fin de evaluar y, en su caso, reducir el efecto de tales factores en la ratio de dispersión de luz o para introducirlos en el modelo de predicción. Por esta razón, el objetivo de la presente investigación fue estudiar el efecto combinado de las concentraciones de proteína y grasa sobre la ratio de dispersión de luz durante la fermentación del yogur, a fin de calibrar y validar los modelos de predicción de pH y G' . Adicionalmente, es necesario añadir que, dado que a nivel industrial la fermentación se controla tomando mediciones de pH de forma sucesiva, pero discontinua, en este estudio la calibración y validación del modelo de predicción se realizó no solo con datos de pH tomados de forma continua sino también discontinua.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Diseño experimental

Se utilizó un diseño factorial aleatorizado con tres réplicas independientes ($n = 3$) para estudiar el efecto de tres niveles de concentración de grasa (0,5; 1,5 y 3,6%) y proteína (3,1; 3,6 y 4,1%) en el proceso de fermentación del yogur y evaluar los modelos de predicción de pH y G' , a una temperatura constante de 43 °C. Con este diseño se realizaron un total de $N = 3^2 \cdot 3 = 27$ ensayos.

El proceso de coagulación ácida se monitorizó de forma continua (*in-line*) y discontinua (*off-line*), utilizando respectivamente un sensor de dispersión de luz NIR (CoAguLab), equipado con electrodos de pH, y un pH-metro externo similar a los utilizados durante la fabricación industrial de yogur para la toma de datos cada ~10 min. En paralelo, se monitorizó la evolución del módulo elástico del yogur utilizando reología oscilatoria de baja amplitud. Las mediciones continuas y discontinuas del pH, así como las de G' se correlacionaron con las lecturas de la ratio de dispersión de luz (R) para realizar calibración y validación de los modelos de predicción de pH y G' propuestos por Arango (2015), bajo condiciones variables de concentración de proteína y grasa.

Se realizó el ajuste del voltaje inicial, tras depositar la muestra de leche (sin el inóculo) en el sensor óptico, siguiendo dos sistemas diferentes de ajuste en el voltaje inicial del sensor óptico (ajuste antes de cada ensayo con la misma leche a monitorizar -en adelante, “con ajuste de voltaje previo”- y ajuste con leche de referencia pero solo al inicio de cada réplica del experimento -en adelante, “sin ajuste de voltaje previo”), con el fin de averiguar cuál de las opciones de ajuste evaluadas resultaba más útil para mejorar la predicción de los modelos.

2.2 Estandarización de la leche

Para el experimento se utilizaron, como materia prima, leches comerciales UHT (Marca Hacendado), entera, semidesnatada y desnatada. Se adquirió un solo lote comercial de cada tipo de leche para todo el estudio, con el fin de minimizar la variabilidad del experimento. La leche estaba envasada en envases multicapa de Tetra Brik® con un volumen de 1 L y se mantuvo almacenada a temperatura ambiente (~20 °C) hasta su uso a lo largo del experimento. La nata comercial homogeneizada (Marca Consum) utilizada para añadir grasa a la leche, venía también en envases Tetra Brik® de 250 mL que se mantuvieron a ~20 °C hasta su apertura, a razón de uno por semana. Una vez abierto cada envase, se distribuyó, dentro de una cabina de flujo laminar, la nata en distintos envases estériles de plástico de ~5 mL, que se almacenaron en una

cámara de refrigeración (~4 °C) hasta su empleo. Como fuente de proteína, así como para preparación de los cultivos madre, se usó leche en polvo desnatada deshidratada a baja temperatura (Chr. Hansen, Hoersholm, Dinamarca), la cual se distribuyó en envases de plástico estériles de 80 mL cerrados herméticamente, recubierta con papel de aluminio, y se mantuvo almacenada a temperatura ambiente (~20 °C), para ser usada en cada ensayo. La composición de proteína y grasa de las materias primas se analizó mediante los métodos que se describen en la sección 2.7. Los datos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de proteína y grasa de las materias primas utilizadas en el experimento¹.

Concentración (%)	Leche UHT				
	Entera	Semidesnatada	Desnatada	Leche en polvo	Nata
Proteína	3,40 ± 0,01	3,40 ± 0,01	3,50 ± 0,00	32,50 ± 0,00	2,70 ± 0,02
Grasa	3,60 ± 0,07	1,50 ± 0,07	0,30 ± 0,07	1,25 ^a	18,00 ± 0,50
Lactosa²	4,6	4,8	4,7	48	4,0

¹ Información analizada en el experimento. ² Información declarada en la etiqueta del producto.

Los diferentes niveles de proteína y grasa fueron ajustados, en función del diseño experimental, por medio de balances de masa, usando un sistema de ecuaciones con la herramienta *Solver* de Microsoft Office Excel (Versión 2018 de Microsoft Office, Microsoft Corporation, W, EE.UU).

Para cada ensayo se prepararon 850 mL según el procedimiento descrito a continuación: se pesó la cantidad calculada para cada tratamiento de leche en polvo y/o nata en un vaso de precipitados de 1 L. Después se añadió la leche UHT previamente pesada y atemperada en baño térmico (Thermo Electron, Karlsruhe, Alemania; resolución ± 0,1 °C) a ~ 40 °C y se llevó a una placa de calefacción con agitación (LBX H20 Series, Lbx Instruments, España). La muestra se protegió con papel de aluminio para minimizar la evaporación. En la placa se elevó la temperatura de la muestra hasta 90 °C durante 5 min, al cabo de los cuales se enfrió por inmersión en agua con hielo hasta ~21 °C. El control de temperatura se realizó con un termómetro digital (EcoScan Temp 6, PT100 Thermometer, Eutech Instruments, Holanda; resolución ± 0,1 °C). Posteriormente se pesó nuevamente la muestra y se añadió agua destilada para reponer el agua evaporada durante el tratamiento térmico. La muestra se dejó en cámara de refrigeración a ~4 °C durante ~12 horas, hasta su uso. De cada muestra de leche preparada

se tomaron 750 mL para el ensayo y el resto se empleó para el análisis químico, según los procedimientos indicados.

2.3 Preparación del inóculo

Se reconstituyó leche en polvo desnatada con 12% de sólidos, que posteriormente se trasladó a envases Pyrex de 100 mL y se autoclavó (J. P. Selecta, AYTESTER-E, Barcelona, España) a 121 °C por 15 min. Finalmente se envolvieron las botellas en papel de aluminio y se almacenaron en la cámara de refrigeración a ~4 °C hasta su utilización. Se preparó suficiente leche para generar los cultivos madre de todo el experimento.

Para cada ensayo se inoculó una de estas botellas con un cultivo liofilizado comercial de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (YO-MIX 496 LYO 100 DCU, Danisco, Sassenage, Francia), adicionando 130 mg L⁻¹ a la leche. Cada cultivo madre se incubó en un baño termostático a 43 °C, por ~3 h hasta pH = 5,0, como inóculo del ensayo al 2%.

2.4 Procedimiento de los ensayos

Para cada ensayo, se atemperó la muestra de leche preparada el día anterior (ver sección 2.2) a 43 °C, temperatura a la que se llevó a cabo la fermentación láctica. Como se muestra en la Fig. 1, se añadieron 15 mL del cultivo madre a 750 mL de leche (2%) estandarizada según el tratamiento del ensayo a realizar y la mezcla se agitó vigorosamente por 1 min. Se tomaron dos alícuotas de 80 mL y se depositaron en cada una de las cubetas del equipo NIR (CoAguLab, Reflectronics, Inc., Lexington, KY, EE. UU.), activándose la adquisición de datos. El funcionamiento de dicho sistema de medida se describirá en la sección 2.5. En el menor tiempo posible, ~3 min, se tomaron otros 40 mL y se depositaron en la sonda cilíndrica, previamente atemperada de un reómetro RheoWin (Thermo-Haake RS1 GmbH, Karlsruhe, Alemania), para la determinación del módulo elástico según lo descrito en la sección 2.6. Se cronometró el tiempo transcurrido entre la puesta en marcha del sistema óptico y la del sistema reológico. Los lapsos de tiempo transcurridos, en cada ensayo, entre el inicio de los registros en los instrumentos de monitorización de la coagulación indicados, fueron incorporados manualmente a los perfiles correspondientes de coagulación.

La muestra restante se colocó, distribuida a partes iguales, en dos vasos de precipitados (200 mL c/u) cubiertos con parafilm, que se depositaron en un baño termostático a 43 °C, para la monitorización del pH externo, que se realizó cada 10 min, utilizando una sonda de pH

estándar (Crison Modelo pH BASIC 20, Crison Instrument, Suiza) calibrado a dos puntos, mediante tampones de pH = 7,00 y pH = 4,01 atemperados a la temperatura de trabajo.

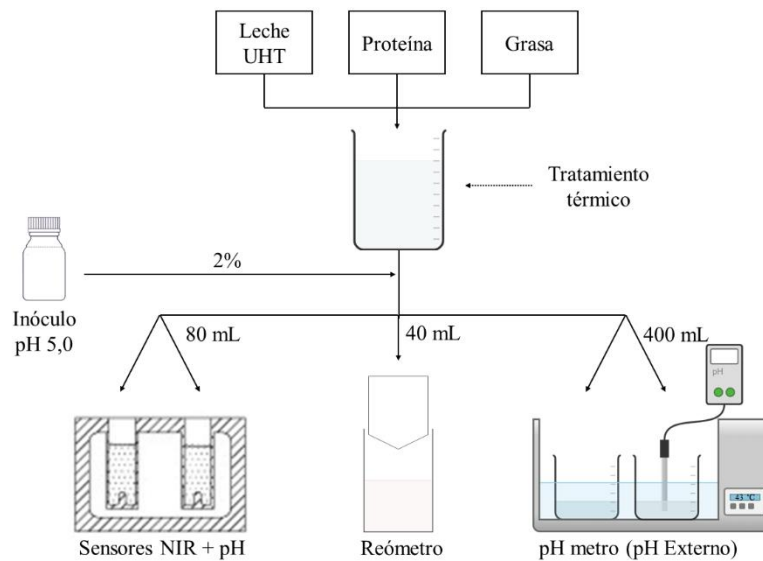


Figura 1. Distribución de la muestra de leche en los ensayos para la determinación simultánea de pH *in-line* y *off-line* y del módulo elástico en yogur.

2.5 Monitorización de la ratio de dispersión de luz NIR y del pH en continuo

2.5.1 Determinación de los parámetros de dispersión de luz NIR

El CoAguLab, equipo empleado para la monitorización de la dispersión de luz, cuenta con dos cubetas que permiten monitorizar la coagulación de la leche. El equipo mide simultáneamente la dispersión de luz NIR, la temperatura y el pH. Cada cubeta cuenta con un diodo (LED) que emite luz a 880 nm, la cual es transmitida a través de una fibra óptica hasta la muestra y la luz dispersada a 180° retorna hasta un detector de silicio mediante otra fibra óptica adyacente. La luz dispersada es convertida en una señal de voltaje. Esta se mide cada dos segundos y el promedio de tres mediciones se registra generando un dato cada seis segundos. Al inicio de la coagulación se promedian los diez primeros registros de voltaje (primer min de datos) para calcular el voltaje inicial (V_0). El voltaje medido cada 6 segundos, V_t , es dividido por V_0 para obtener la ratio de dispersión de luz (R) (Tabayehnejad et al., 2012). A partir de R se determinó $R_{pH4,6}$ que se corresponde con el valor de R cuando el gel alcanza un pH de 4,6 (electrodo de la cubeta 2). El porcentaje de respuesta se calculó como $100 \cdot (R_{pH4,6} - 1) / 1$.

2.5.2 Ajuste del voltaje de ganancia

Al inicio de cada réplica (día cero) se ajustó el voltaje inicial a 2,00 V en ambas cubetas, con la leche de más alta concentración (4,1% de proteína y 3,6% de grasa). El ajuste se realizó a la temperatura de trabajo, una vez alcanzado el equilibrio térmico. Posteriormente, de acuerdo con el ensayo que correspondía cada día, se ajustó el voltaje de la cubeta 2 a 2,00 V (la cubeta 2 se referirá como cubeta con “ajuste de voltaje previo”), mientras que la cubeta 1 se dejó variar libremente hasta finalizar cada réplica. Dicha cubeta fue calibrada a 2,00 V tan solo al inicio de cada réplica (la cubeta 1 se referirá como cubeta “sin ajuste de voltaje previo”).

2.5.3 Medición de pH en continuo

Los cambios de pH en las muestras se monitorizaron usando electrodos (Thermo Scientific Orion 8104BN ROSS, Suiza) previamente calibrados, instalados en la parte superior de cada cubeta del sensor óptico y conectados al sistema de detección y procesamiento de señales del mismo equipo. La calibración se realizó a dos puntos, mediante tampones de pH = 7,00 y pH = 4,01 atemperados a la temperatura de trabajo. La adquisición de datos para el desarrollo del modelo óptico de predicción del pH se hizo continua y simultáneamente a los datos de dispersión de luz (R), en función del tiempo (i.e.; un registro cada 6 s; media de 3 determinaciones). Finalmente, se definió el parámetro $t_{pH4,6}$ que se corresponde con el tiempo requerido hasta que el gel ácido alcanza un valor de pH de 4,6 (electrodo de la cubeta 2).

2.6 Medidas de reología

La coagulación ácida se monitorizó mediante reología oscilatoria de pequeña amplitud utilizando un reómetro ThermoHaake RS1 (Thermo-Haake GmbH, Karlsruhe, Alemania), acoplado a un baño termostático Haake SC100 (ThermoScientific, resolución $\pm 0,02$ °C) para el control de temperatura y a un compresor CARAT 106/E (FIAX S.P.A., Bologna, Italia). Se utilizó una geometría de dos cilindros concéntricos (Z34) con diámetros de 34,00 mm y 36,88 mm para los cilindros interno y externo, respectivamente. La frecuencia fue de 1 Hz. Tras la adición del inóculo se depositaron 40 mL de leche, atemperada a 43 °C en el cilindro del reómetro e, inmediatamente después, una capa delgada de aceite vegetal en la superficie para evitar pérdidas por evaporación. Los datos reológicos se almacenaron cada ~ 7 s mediante el programa Rheowin 3 Job Manager (Haake Rheowin Job Manager 3.61 2007, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Alemania) instalado en un ordenador conectado al reómetro. El parámetro que se determinó fue el módulo elástico (G') del gel, y a partir de él, se definió el parámetro

$G'_{pH4,6}$, correspondiente al valor de G' observado cuando el gel ácido alcanzó un valor de $pH = 4,6$ (electrodo de la cubeta 2).

2.7 Análisis fisicoquímicos

La leche y nata de partida, además de la reconstituida para los ensayos, fue sometida a análisis de proteína mediante el método Kjeldahl (ISO 8968-1), sólidos totales mediante secado a peso constante en estufa (ISO 6731) y grasa mediante el método Gerber (ISO 2446).

2.8 Procedimiento de calibración y validación de los modelos de predicción de pH y de G'

Arango (2015) desarrolló sendos modelos para la estimación del pH y de G' durante la fermentación del yogur en función de la ratio de dispersión de luz NIR ($pH = f(R)$ y $G' = f(R)$), los cuales fueron calibrados y validados con los datos obtenidos en este estudio. Se trabajó con los valores de pH en un rango de 5,2 a 4,6 para el análisis estadístico (calibración y validación) y con valores de $G' > 30$ Pa. Para cada tratamiento, tanto para los modelos de pH como de G' , se realizó la calibración de los parámetros del modelo usando dos réplicas (datos dispuestos consecutivamente) y se validó con la réplica restante. Se probaron tres posibles combinaciones de dos réplicas para la calibración (réplica uno-dos, dos-tres y uno-tres), mientras que la réplica no empleada en cada uno de los tres casos se utilizó para la validación, obteniéndose así tres calibraciones y tres validaciones por cada tratamiento. La calibración se realizó con el software CurveExpert (CurveExpert Basic, Versión 2.2.1., Daniel G. Hyams, Hyams Development, EE.UU) que permitió estimar los cuatro coeficientes o parámetros de regresión contenidos el modelo matemático de pH (a, b, c y d) que, por motivos de confidencialidad, se presentan codificados del 1 al 4 (la asignación de las letras y los códigos se estableció aleatoriamente al inicio del análisis de datos). De forma análoga, se estimaron y codificaron aleatoriamente los tres coeficientes de regresión del modelo de predicción de G' (a, b, c).

2.9 Análisis estadístico

El análisis de varianza (ANOVA) se realizó usando el procedimiento Modelo Lineal General (GLM) para determinar si había efectos significativos de los factores experimentales, proteína (P) y grasa (G), así como su interacción sobre los coeficientes del modelo matemático de pH, así como sobre los parámetros ópticos y reológicos evaluados. El ANOVA se analizó mediante el programa estadístico Statgraphics Centurion© versión XVI (Statgraphics Technologies, Inc., EE. UU). El criterio para decidir la significación estadística fue $p < 0,05$. La comparación de medias se realizó por el método de diferencia significativa mínima de Fisher (LSD) con 5% de nivel de significación. Con respecto a los datos de calibración y validación

de los modelos de predicción de pH y G' , los datos presentados en tablas muestran las medias y desviaciones estándar de tres réplicas independientes por cada tratamiento, de acuerdo con lo expuesto en la sección 2.8.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Composición de las muestras

Se tenía previsto validar los niveles experimentales de estandarización de grasa y proteína de las muestras de leche ensayadas, así como determinar los sólidos totales resultantes, por lo que se decidió analizar la concentración de los tres componentes mayoritarios indicados, pero como consecuencia de la situación generada por la COVID-19, finalmente, no se pudo disponer a tiempo de los análisis de proteína. En la Tabla 2 se presentan los niveles “objetivo” de grasa y proteína, así como las concentraciones experimentales de grasa y sólidos totales de las muestras, que se midieron según los métodos descritos en la sección 2.7. Se puede observar que los valores finales de concentración de grasa en las muestras se ajustaron bien a los valores establecidos en el diseño experimental, siendo las concentraciones de sólidos coherentes con las aportaciones de sólidos de cada una de las materias primas, en función de los ajustes realizados en cada tratamiento.

Tabla 2. Composición de las muestras para cada tratamiento.

Tratamiento	P _{Obj} (%)	G _{Obj} (%)	G _{Exp} (%) [†]	ST _{Exp} (%) [†]
1	3,1	0,5	0,44 ± 0,01	8,45 ± 0,21
2	3,6	0,5	0,46 ± 0,01	9,72 ± 0,16
3	4,1	0,5	0,44 ± 0,01	11,19 ± 0,29
4	3,1	1,5	1,49 ± 0,06	9,41 ± 0,43
5	3,6	1,5	1,50 ± 0,07	11,04 ± 0,06
6	4,1	1,5	1,49 ± 0,01	12,53 ± 0,28
7	3,1	3,6	3,57 ± 0,01	11,67 ± 0,24
8	3,6	3,6	3,57 ± 0,03	12,98 ± 0,32
9	4,1	3,6	3,54 ± 0,04	14,30 ± 0,35

[†] Resultados expresados como media ± desviación estándar de tres réplicas. P_{Obj}, proteína “objetivo”; G_{Obj}, grasa “objetivo”; G_{Exp}, grasa experimental; ST_{Exp}, sólidos totales experimentales.

3.2 Efecto de la concentración de proteína y grasa sobre la coagulación ácida del yogur

En este estudio, la fermentación del yogur se monitorizó simultáneamente mediante dispersión de luz, reología y potenciometría con medición de pH *in-line* y *off-line*. En la Fig. 2, se puede observar la relación entre los perfiles de dispersión de luz (*R*) y los perfiles de pH vs tiempo. Los perfiles de *R* fueron más bajos a medida que aumentó la concentración de grasa. Lo anterior se debe a que los glóbulos grasos son las partículas de la leche que dispersan mayor cantidad de luz, especialmente si provienen de nata homogeneizada, al presentar los glóbulos en esos caso mayor relación superficie-volumen. Esta presencia creciente de grasa

origina un voltaje inicial (V_0) más alto y, por tanto, menores valores de R (que se determinan como V_t/V_0). En términos más intuitivos, la relativamente pequeña respuesta del sensor a la agregación micelar y el endurecimiento del gel, en comparación con la generada por la grasa, se ve interferida por la presencia de cantidades crecientes de grasa que, al dominar el fenómeno de dispersión de luz, origina una disminución relativa de la respuesta a los cambios proteicos responsables de la coagulación. Estos resultados son comparables con los Arango et al., (2020). El porcentaje de respuesta medio para las concentraciones de 0,5%, 1,5% y 3,6% fue 105%, 63% y 28%, respectivamente, lo que implica reducciones de 40% y 73% en las muestras con 1,5% y 3,6% de grasa, respecto a las muestras con 0,5% de grasa.

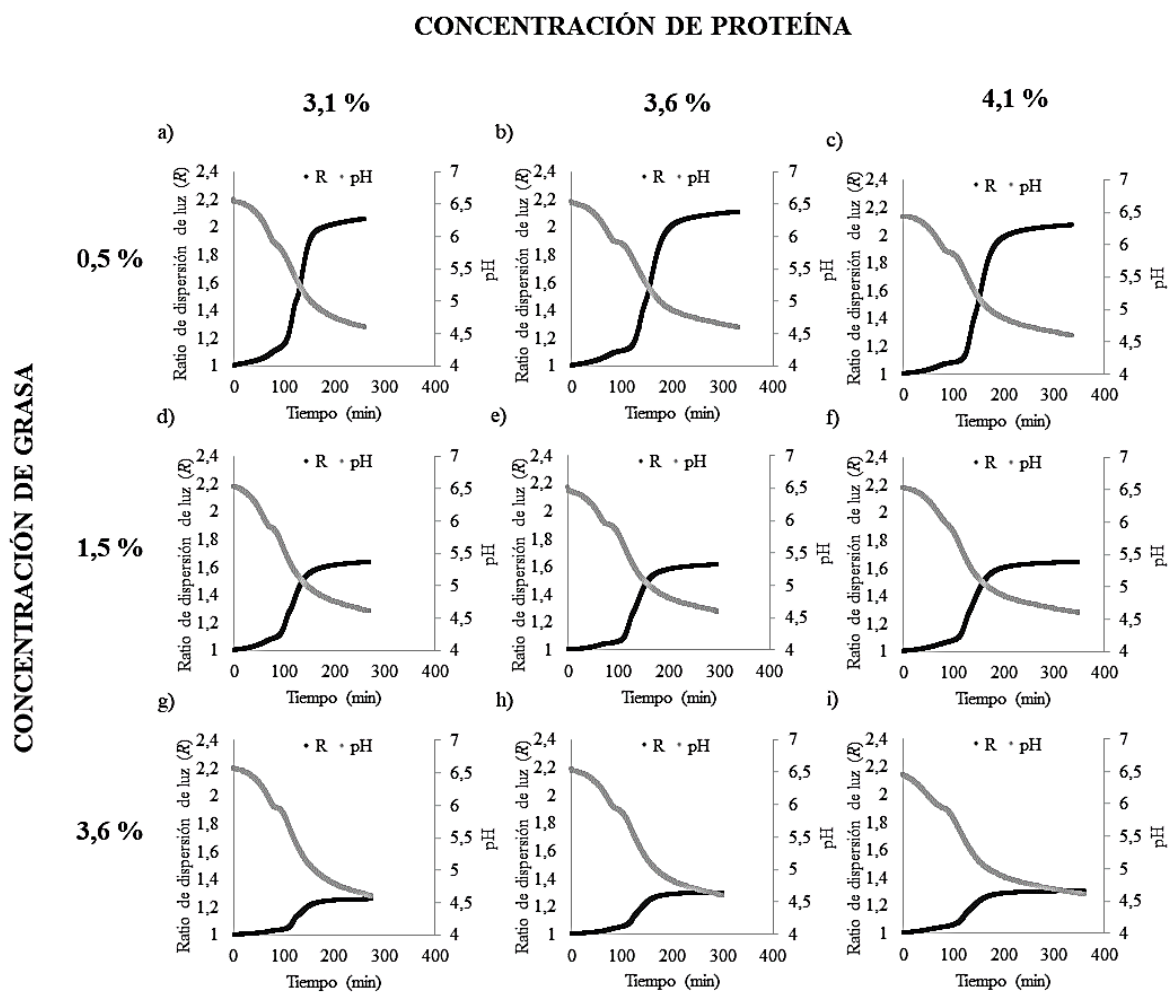


Figura 2. Relación entre la ratio de dispersión de luz (R) y los perfiles de pH en función del tiempo. Datos correspondientes a la cubeta con ajuste de voltaje previo de la réplica 2.

También se observa en la Fig. 2 que el lapso entre la adición del inóculo y el final de la fermentación (pH = 4,6) se eleva al aumentar la concentración de proteína, especialmente al comparar las concentraciones de 3,1% con las de 3,6% y 4,1%. Este efecto podría estar relacionado con la capacidad tampón aportada por el exceso de proteína (Jørgensen et al. 2019).

En la Fig. 3 se observa que la forma de las curvas de pH vs tiempo fue similar en todos los casos. Sin embargo, el pH inicial de la leche parece disminuir consistentemente con el aumento de la concentración de proteína, lo que podría estar relacionado con la adición creciente de leche en polvo para ajustar los niveles de proteína de la leche. Se observó también una notable variabilidad en la duración del proceso de fermentación hasta alcanzar pH = 4,6. En promedio, el tiempo de fermentación hasta pH 4,6 fue 302 min (5 horas), con una desviación estándar de 33 min. Según Cimander et al. (2002), la duración del proceso de fermentación de yogur puede variar desde 3,50 a 6,75 h; los resultados obtenidos coinciden con los de Lee y Lucey (2004) en yogures incubados a 40 y 45,7 °C, para muestras con diferentes niveles de inóculo (0,5, 1, 2, 3 y 4%), quienes obtuvieron tiempos totales de incubación en un rango de 4,33 a 6,53 h.

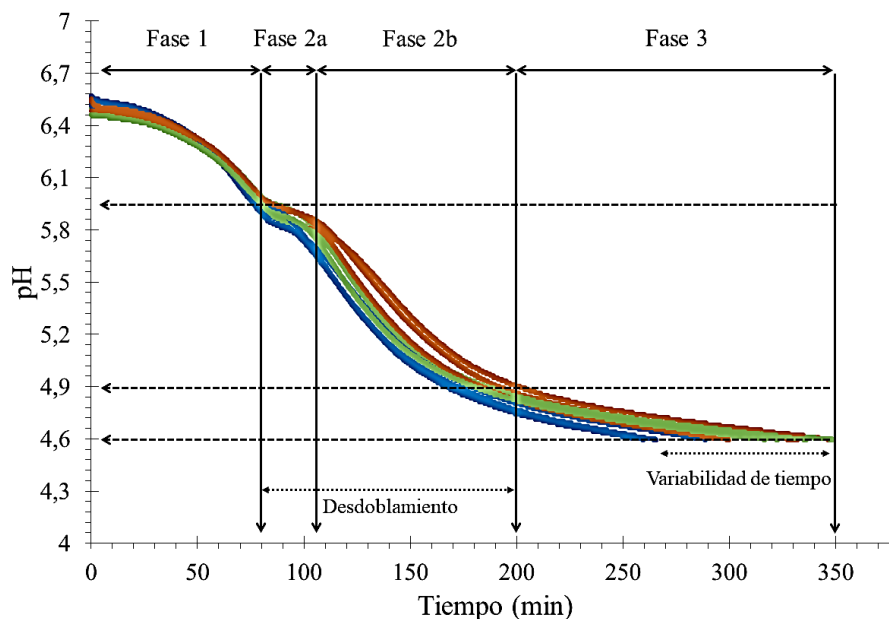


Figura 3. Curvas de pH vs tiempo para los 9 ensayos de la segunda réplica de la cubeta con ajuste de voltaje previo. Tratamientos a (●) 3,1%, (●) 3,6% y (●) 4,1% de proteína, con tres niveles de grasa (0,5%; 1,5% y 3,6%) para cada nivel de proteína.

La fermentación láctica en leche se divide, según Lucey (2017), en tres fases desde un punto de vista fisicoquímico. La primera fase va desde el momento inicial hasta un pH ~6,0, en donde la velocidad de acidificación es más lenta debido probablemente al periodo de adaptación del cultivo microbiano (fase 1, Fig. 3). En esta etapa, según Lucey (2017), el descenso de pH produce una disminución de carga neta en las micelas que disminuye la repulsión electrostática entre ellas, pero solo una pequeña parte del CCP se disuelve por encima de pH 6,0, por lo que la estructura interna micelar se mantiene bastante íntegra. La segunda etapa se inicia a pH ~6,0 (Lucey 2017) y se completa a pH ~4,9 (Tamime y Robinson, 2007; Fox et al., 2015). En esta segunda etapa continúa el proceso de neutralización de la carga negativa de las micelas por el incremento de la concentración de H⁺, que sigue reduciendo la repulsión electrostática intermicelar y comienza a generar cierta retracción de las cadenas de κ -caseína, con disminución de la repulsión estérica. A lo largo de esta etapa es cuando se produce mayoritariamente la solubilización progresiva del CCP que va desmineralizando la micela hasta disolverse por completo a pH 5,0 – 4,9. Sin embargo, en nuestro caso, la solubilización de CCP y otras sales coloidales procedentes de la caseína, que genera un efecto tampón, parece predominar más intensamente entre pH 6 y 5,7, generando un “desdoblamiento” de la fase 2 en subfases (2a y 3b, Fig. 3). Este “desdoblamiento” podría también estar asociado, al menos en parte, con los equilibrios simbióticos de las especies microbianas inoculadas con el *starter*. Inicialmente, el pH es favorable a los estreptococos, que predominan, poniendo en marcha la fermentación láctica al generar ácido fórmico que favorece el crecimiento de los lactobacilos que, a su vez, generan pequeños péptidos y aminoácidos, principalmente valina, necesarios para los estreptococos, al ser estos últimos poco proteolíticos (Fig. 4a). Pero al prolongar la acidificación, el pH se vuelve poco favorable para los estreptococos (Fig. 4b) que son progresivamente reemplazados por los lactobacilos (Walstra et al. 2006). En nuestras condiciones, la presencia de ácido fórmico en el propio inóculo podría haber sido elevada desde el principio, al ser un producto directo de la descomposición de la lactosa a través de la reacción de Maillard y habiendo preparado el cultivo madre con leche autoclavada, que sufre una intensa reacción de Maillard. Esto podría haber alterado los equilibrios microbianos en favor de los lactobacilos desde los momentos iniciales de la fermentación.

Independientemente de cuál sea exactamente la causa del desdoblamiento observado, la subfase 2a mostró un descenso relativamente más lento del pH, mientras que la 2b presentó la mayor velocidad de descenso del pH a lo largo de la fermentación. El desdoblamiento parece depender también de la concentración inicial de proteína en leche, siendo menos marcado a 3,1% de proteína que a concentraciones superiores (3,6 y 4,1%).

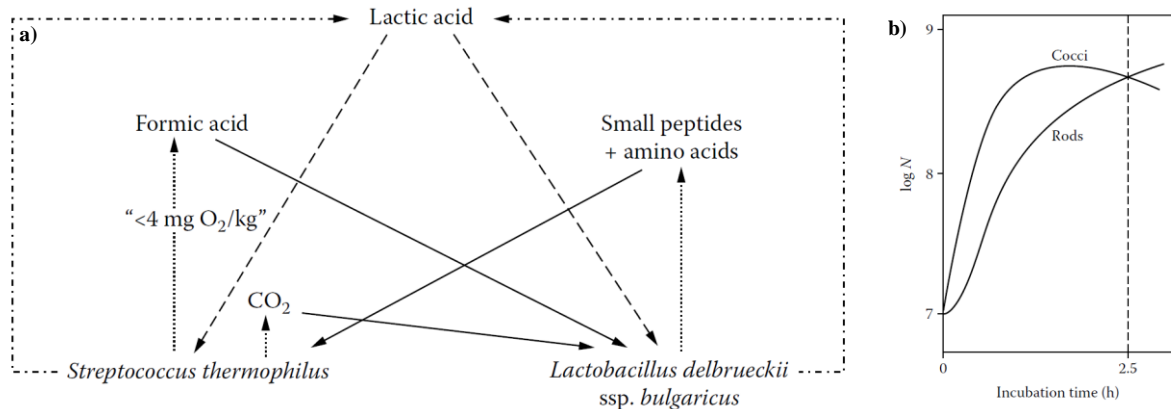


Figura 4. Cooperación simbiótica de las bacterias del inóculo en yogur. a) Diagrama de los procesos de estimulación e inhibición del crecimiento. - - - - -, formación de ácido láctico; ·········, formación de factores de crecimiento; ———, estimulación; - - - - -, inhibición. b) Crecimiento de estreptococos (cocci) y lactobacilos (rods) en yogur a una temperatura de fermentación de 45 °C en leche con tratamiento térmico intenso. Extraído de Walstra et al. (2006).

Finalmente, en la tercera fase ($\text{pH} < 4,9$; Fig. 3), la carga neta negativa micelar continuó decreciendo hasta que se alcanzó el pH isoelectrico de las caseínas, observándose que la velocidad de acidificación tendió a disminuir con el aumento en la concentración de proteína hasta $\text{pH} \sim 4,9$, punto desde donde las curvas se tornan asintóticas y la velocidad de fermentación es mucho más lenta. En esta fase, las curvas de las muestras con concentración de proteína más elevadas, (3,6% y 4,1%) se prolongan y entremezclan, finalizando con tiempos muy variables a $\text{pH} 4,6$, lo que dificulta considerablemente la modelización del tiempo de pH final ($t_{\text{pH}4,6}$).

Considerando que el objetivo principal de este experimento fue la validación de los modelos de predicción a tres niveles de proteína y tres de grasa, determinando su punto final, se procedió a realizar un ANOVA de la ratio de dispersión ($R_{\text{pH}4,6}$), tiempo ($t_{\text{pH}4,6}$) y módulo

elástico ($G'_{pH4,6}$) a pH 4,6, con datos correspondientes a la cubeta con ajuste de voltaje previo y al reómetro.

Tabla 3. Comparación de medias del tiempo de acidificación y los parámetros ópticos y reológicos a pH 4,6 en función de la concentración de proteína y grasa.

Factores	%	$t_{pH4,6}$	$R_{pH4,6}$	$G'_{pH4,6}$
Proteína	3,1	265,3 ^a	1,63 ^{ns}	120,1 ^a
	3,6	313,3 ^b	1,65 ^{ns}	156,0 ^b
	4,1	326,4 ^b	1,67 ^{ns}	200,9 ^c
Grasa	0,5	293,6 ^{ns}	2,05 ^A	103,1 ^A
	1,5	310,1 ^{ns}	1,63 ^B	136,6 ^B
	3,6	301,2 ^{ns}	1,28 ^C	237,2 ^C

Número de réplicas $n = 3$; Número total de observaciones $N = 27$. $t_{pH4,6}$, tiempo a pH = 4,6; $R_{pH4,6}$, Ratio de dispersión a pH = 4,6; $G'_{pH4,6}$, valor de G' a pH = 4,6. ^{ns}, no significativo. ^{a-c} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas en función del nivel de proteína ($p < 0,05$). ^{A-C} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas en función del nivel de grasa ($p < 0,05$).

En la Tabla 3 se puede observar que el aumento en la concentración de proteína de 3,1 a 3,6% ocasionó un incremento significativo en el tiempo de acidificación hasta pH = 4,6, pero no hubo diferencia cuando la proteína aumentó de 3,6 a 4,1%, lo cual podría estar relacionado, como se indicaba anteriormente, con la capacidad tamponante de la proteína. También se observa que en presencia de más grasa el parámetro $R_{pH4,6}$ fue menor, es decir que en las muestras con menos grasa el aumento de la ratio de dispersión de luz durante la fermentación, i.e., la respuesta óptica, fue mayor, lo cual se explicó previamente. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Arango et al. (2020) quienes observaron valores de $R_{pH4,6}$ de 2,04, 1,67 y 1,33 a concentraciones de grasa de 0,4%; 1,6% y 3,6%, respectivamente. Tanto el aumento de la concentración de proteína como el de la de grasa tuvieron efecto significativo y directamente proporcional sobre el valor de $G'_{pH4,6}$, es decir, los geles fueron más firmes al aumentar la concentración de ambos factores. El valor de $G'_{pH4,6}$ aumentó en 67% y 130%, al pasar del nivel inferior al superior de proteína y grasa, respectivamente, resultados que concuerdan con las investigaciones realizadas por Lucey et al., (2006) y Arango (2015). En ambos casos, los aumentos de G' ajusta bien a una recta con $R^2 > 0,99$. Estos resultados se explican por el hecho de que la proteína es la principal responsable de la formación y de la firmeza del gel y la grasa también participa en su estructuración, especialmente al tratarse de grasa previamente homogeneizada, recubierta en superficie por caseína y proteínas del suero, cuya presencia facilita la interacción de los glóbulos grasos con la red de caseína. Además, se puede observar que la firmeza de los yogures a pH 4,6 aumentó de forma directamente proporcional tanto con

la concentración de proteína como de grasa, coincidiendo con los resultados de Benezech y Maingonnat (1994), Aziznia et al. (2008) y Dai et al. (2016).

3.3 Calibración y validación del modelo de predicción de pH

A continuación, se describen los resultados obtenidos en el proceso de calibración y validación del modelo de predicción de pH propuesto por Arango (2015) utilizando los datos de los tres diferentes sistemas de adquisición de pH evaluados: 1) monitorización *in-line* del pH sin ajuste inicial del voltaje (cubeta 1 del sensor óptico), 2) monitorización *in-line* del pH con ajuste inicial del voltaje (cubeta 2 del sensor óptico) y 3) medición *off-line* o externa del pH.

3.3.1 Calibración y validación del modelo con datos de la monitorización *in-line* sin ajuste del voltaje inicial (cubeta 1)

La calibración y validación del modelo de predicción del pH se realizó utilizando los datos experimentales correspondientes a cada combinación de la concentración de proteína y grasa, de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 2.8. Los coeficientes de determinación (R^2), los errores estándar de predicción (SEP), los coeficientes de variación (CV), la estimación del valor de pH al momento en que el pH medido fue 4,6 (pH_{min}) y la diferencia entre los valores estimado y medido de pH a 4,6 (sesgo), se utilizaron como indicadores de la bondad de ajuste del modelo y se muestran en la Tabla 4.

En el proceso de calibración se obtuvieron valores de SEP entre 0,05 y 0,10 unidades de pH y valores de R^2 entre 0,58 y 0,79 con promedios para todos los tratamientos de 0,08 y 0,72 para SEP y R^2 , respectivamente. Como era de esperar, en la validación del modelo los valores de SEP fueron más altos, oscilando entre 0,09 y 0,21 unidades de pH, con una media de 0,14. Sin embargo, los valores de R^2 obtenidos en la validación del modelo estuvieron en un rango de 0,80 a 0,97, con una media de 0,88, siendo mayores que aquellos obtenidos en la calibración, lo cual se atribuye a que, para la obtención de los coeficientes de regresión del modelo de predicción de pH, se trabajó con dos conjuntos de datos (los datos de dos réplicas), dispuestos consecutivamente, para luego hacer la validación con la réplica restante. Los valores de pH_{min} estuvieron entre 4,59 y 4,77, con un promedio de 4,68, de modo que los sesgos de estos datos oscilaron entre -0,01 y 0,17 con una media de 0,08. En casi todos los tratamientos con excepción de uno, los valores de pH estimados con el modelo estuvieron por encima de 4,6.

Tabla 4. Resultados de ajuste del modelo de predicción de pH a diferentes concentraciones de proteína y grasa con datos sin ajuste de voltaje inicial (cubeta 1).

Tratamiento (%)		Calibración ¹			Validación ¹			Estimación de pH _{4,6} ¹	
P	G	SEP	R ²	CV	SEP	R ²	CV	pH _{min}	Sesgo pH
3,1	0,5	0,07 ± 0,02	0,79 ± 0,11	1,53 ± 0,44	0,13 ± 0,05	0,90 ± 0,10	2,70 ± 1,02	4,69 ± 0,16	0,09
3,6	0,5	0,07 ± 0,02	0,78 ± 0,12	1,50 ± 0,39	0,12 ± 0,05	0,90 ± 0,03	2,43 ± 1,08	4,69 ± 0,15	0,09
4,1	0,5	0,09 ± 0,02	0,63 ± 0,17	1,92 ± 0,50	0,21 ± 0,18	0,81 ± 0,10	4,32 ± 3,70	4,59 ± 0,34	-0,01
3,1	1,5	0,05 ± 0,02	0,90 ± 0,07	1,03 ± 0,41	0,09 ± 0,04	0,97 ± 0,02	1,80 ± 0,85	4,66 ± 0,11	0,06
3,6	1,5	0,09 ± 0,02	0,63 ± 0,16	1,95 ± 0,48	0,17 ± 0,11	0,82 ± 0,07	3,47 ± 2,20	4,65 ± 0,24	0,05
4,1	1,5	0,07 ± 0,01	0,76 ± 0,09	1,52 ± 0,26	0,13 ± 0,05	0,89 ± 0,08	2,69 ± 0,97	4,68 ± 0,17	0,08
3,1	3,6	0,08 ± 0,03	0,71 ± 0,18	1,75 ± 0,59	0,13 ± 0,06	0,93 ± 0,05	2,62 ± 1,30	4,69 ± 0,18	0,09
3,6	3,6	0,08 ± 0,05	0,68 ± 0,25	1,68 ± 0,96	0,17 ± 0,10	0,88 ± 0,04	3,63 ± 2,07	4,77 ± 0,19	0,17
4,1	3,6	0,10 ± 0,02	0,58 ± 0,17	2,03 ± 0,41	0,16 ± 0,07	0,80 ± 0,05	3,40 ± 1,38	4,71 ± 0,12	0,11
Media ± DE		0,08 ± 0,02	0,72 ± 0,15	1,66 ± 0,49	0,14 ± 0,08	0,88 ± 0,06	3,01 ± 1,62	4,68 ± 0,19	0,08

¹Resultados expresados como media ± desviación estándar de tres réplicas. P, proteína; G, grasa. SEP, error estándar de predicción (unidades pH); R², coeficiente de determinación; CV; coeficiente de variación (%); pH_{min}, valor de predicción del pH al momento en que el pH medido fue 4,6. Número de ensayos de coagulación = 27. Nc, Número de observaciones por cada calibración, 2498 < Nc < 4134. Nv, número de observaciones por cada validación, 1247 < Nv < 2199.

No en todos los tratamientos estudiados se observó un buen ajuste, entre los valores de pH medidos y los obtenidos con el modelo de predicción, a lo largo de todo el rango de pH. Un par de ejemplos de la relación entre los valores de pH estimados en la validación del modelo y los obtenidos durante la monitorización *in-line*, para observaciones comprendidas entre pH 4,9 y pH 4,6, se muestran en la Fig. 5.

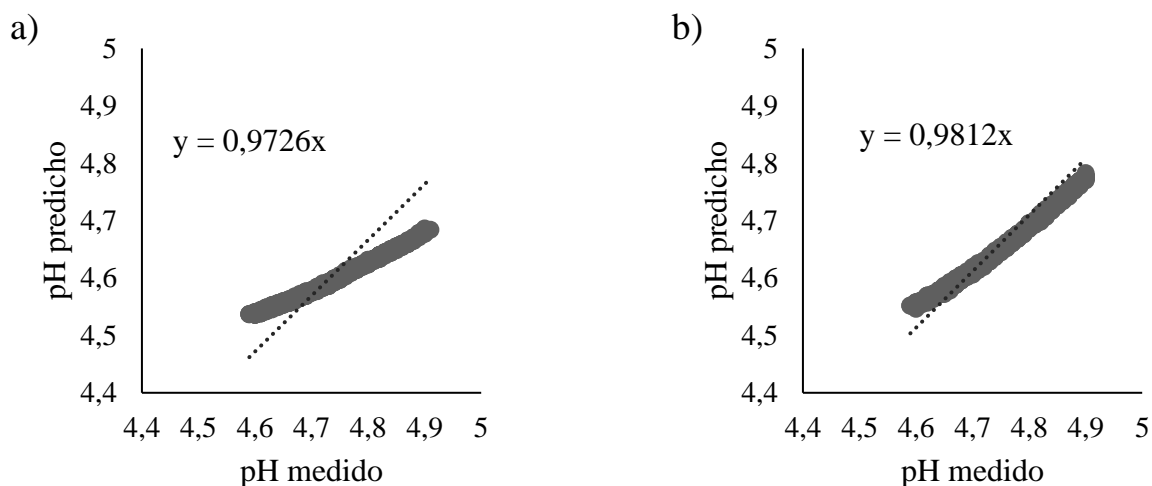


Figura 5. Validación del modelo de predicción de pH a una concentración de a) 3,6% de proteína y 0,5% de grasa (número de observaciones = 1551); b) 3,1% de proteína y 1,5% de grasa (número de observaciones = 1542). Los datos mostrados corresponden a la réplica cuyo R² fue el más cercano al de la media de las tres validaciones.

Los ensayos presentados en la Fig. 5 se seleccionaron por ser aquellos que presentaron un mejor ajuste general entre los valores de pH medidos y estimados. La Fig. 5b presenta un mejor ajuste lineal entre los valores medidos y estimados con el modelo en comparación con la Fig. 5a, donde hay cierta desviación entre los valores. Gráficamente, la Fig. 5b es similar a la obtenida por Liu (2019), para muestras con 3,5% de proteína a una temperatura de 43 °C, donde los parámetros del ajuste fueron $R^2 = 0,989$ y $SEP = 0,046$.

Pese a las desviaciones observadas, es importante resaltar que al calcular el promedio de los valores de pH_{min} entre las 3 validaciones realizadas para cada tratamiento, finalmente se obtuvieron los valores de sesgo presentados en la Tabla 4, los cuales indican un ajuste aceptable para la predicción del pH a 4,6, el pH de punto final de la fermentación.

3.3.2 Calibración y validación del modelo con datos de la monitorización *in-line* con ajuste del voltaje inicial (cubeta 2)

Tal como se describió en la sección 2.8 de la metodología, la calibración y validación del modelo se realizó también con los datos obtenidos para cada concentración de proteína y grasa, pero realizando un ajuste del voltaje inicial justo antes de comenzar la monitorización de la coagulación ácida. Los resultados se muestran en la Tabla 5. Como consecuencia de las desviaciones observadas en las validaciones de la cubeta sin ajuste de voltaje previo, se valoró el interés de iniciar las calibraciones tomando valores de pH desde 4,9 -en vez de desde 5,2 hasta 4,6, que corresponden a la fase 3 de acidificación presentada en la Fig. 3, ya que en dicha fase la curva de pH se torna más asintótica y se pensó que quizás esto mejoraría los resultados de predicción del modelo. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas en los parámetros de la bondad de ajuste de la validación, pero si hubo una disminución del valor de R^2 de la calibración, probablemente debido a la menor cantidad de observaciones que se tomaban para hacer el análisis de regresión y obtener los parámetros de calibración del modelo. Por lo tanto, se decidió seguir realizando la validación de la misma forma que en el caso de la cubeta sin ajuste de voltaje previo, es decir, tomando los datos desde pH 5,2 hasta 4,6.

Al utilizar los datos de la cubeta 2 (con ajuste inicial de voltaje) para el proceso de calibración del modelo se obtuvo que los valores de SEP fueron algo menores en 7 de 9 tratamientos, comparado con los SEP obtenidos en la calibración con datos de la cubeta sin ajuste de voltaje previo, es decir que los resultados de SEP fueron un 77,7% mejores cuando se hizo el ajuste inicial de voltaje. En el caso de la validación, los SEP mejoraron moderadamente en 6 de los 9 tratamientos (66,7%), lo cual indica que, hacer el ajuste del voltaje en la cubeta,

una vez depositada la leche, hasta un valor constante mejora ligeramente el ajuste del modelo de predicción.

La calibración del modelo con ajuste del voltaje inicial arrojó valores de SEP con un rango entre 0,03 a 0,10 y un promedio de 0,07, mientras que los valores de R^2 estuvieron entre 0,59 a 0,96, con una media de 0,75. En la validación, los promedios de SEP y R^2 fueron 0,14 y 0,86, respectivamente, mientras que el sesgo en la estimación del pH a 4,6 osciló entre -0,02 y 0,18 unidades de pH. Estos resultados son similares a los observados por Arango (2015), quien para una muestra con 3,6% de grasa, 1,6% de inulina y 4,0% de proteína, obtuvo un SEP de 0,023 unidades de pH y un R^2 de 0,995.

Tabla 5. Resultados de ajuste del modelo de predicción de pH a diferentes concentraciones de proteína y grasa correspondiente a datos con ajuste de voltaje inicial (cubeta 2).

Tratamiento (%)		Calibración ¹			Validación ¹			Estimación de pH _{4,6} ¹	
P	G	SEP	R^2	CV	SEP	R^2	CV	pH_{min}	Sesgo pH
3,1	0,5	0,07 ± 0,02	0,82 ± 0,10	1,41 ± 0,39	0,11 ± 0,05	0,92 ± 0,06	2,34 ± 1,03	4,69 ± 0,14	0,09
3,6	0,5	0,04 ± 0,01	0,94 ± 0,04	0,77 ± 0,23	0,06 ± 0,03	0,98 ± 0,01	1,34 ± 0,63	4,63 ± 0,11	0,03
4,1	0,5	0,07 ± 0,02	0,81 ± 0,11	1,36 ± 0,48	0,11 ± 0,05	0,89 ± 0,09	2,39 ± 1,14	4,72 ± 0,14	0,12
3,1	1,5	0,03 ± 0,02	0,96 ± 0,03	0,63 ± 0,35	0,08 ± 0,05	0,98 ± 0,01	1,58 ± 1,09	4,58 ± 0,19	-0,02
3,6	1,5	0,08 ± 0,02	0,70 ± 0,15	1,72 ± 0,46	0,14 ± 0,07	0,80 ± 0,15	2,99 ± 1,40	4,76 ± 0,14	0,16
4,1	1,5	0,07 ± 0,02	0,78 ± 0,09	1,47 ± 0,32	0,17 ± 0,13	0,90 ± 0,08	3,65 ± 2,80	4,56 ± 0,32	-0,04
3,1	3,6	0,10 ± 0,03	0,59 ± 0,23	2,11 ± 0,70	0,22 ± 0,16	0,86 ± 0,02	4,63 ± 3,37	4,62 ± 0,35	0,02
3,6	3,6	0,10 ± 0,03	0,59 ± 0,20	2,07 ± 0,55	0,18 ± 0,09	0,61 ± 0,42	3,83 ± 1,89	4,55 ± 0,18	-0,05
4,1	3,6	0,10 ± 0,03	0,58 ± 0,19	2,01 ± 0,53	0,16 ± 0,08	0,82 ± 0,09	3,33 ± 1,67	4,78 ± 0,16	0,18
Media ± DE		0,07 ± 0,02	0,75 ± 0,13	1,51 ± 0,44	0,14 ± 0,08	0,86 ± 0,10	2,90 ± 1,67	4,65 ± 0,19	0,06

¹Resultados expresados como media ± desviación estándar de tres réplicas. P, proteína; G, grasa. SEP, error estándar de predicción (unidades pH); R^2 , coeficiente de determinación; CV; coeficiente de variación (%); pH_{min} , valor de predicción del pH al momento en que el pH medido fue 4,6. Número de ensayos de coagulación = 27. Nc, número de observaciones por cada calibración, 2501 < Nc < 4171. Nv, número de observaciones por cada validación 1247 < Nv < 2189.

En la Fig. 6 se muestran los ajustes entre el pH estimado y el pH medido para los mismos ensayos que el caso de la Fig. 5. La estimación del pH final para la muestra de la Fig. 6a fue 4,63 y para la Fig. 6b fue 4,58; en ambos casos el ajuste entre los valores medidos y los estimados fue bastante bueno. Sin embargo, al igual que se comentó anteriormente, esta situación no se presentó en todas las muestras. Estos resultados son comparables con los de Liu (2019), quien encontró que el mejor ajuste del modelo de predicción de pH fue el correspondiente a las muestras de leche desnatada con una concentración de proteína de 3,5%.

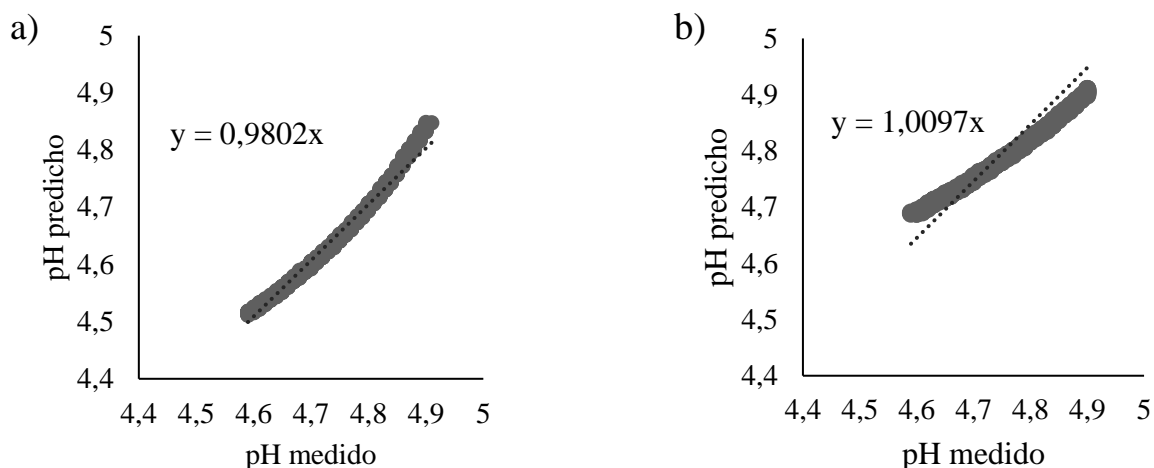


Figura 6. Validación del modelo de predicción de pH a una concentración de a) 3,6% de proteína y 0,5% de grasa (número de observaciones = 1710); b) 3,1% de proteína y 1,5% de grasa (número de observaciones = 1489). Los datos mostrados corresponden a la réplica cuyo R^2 fue más el cercano al de la media de las tres validaciones.

3.3.3 Calibración y validación del modelo con datos de la monitorización *off-line*

Los valores de pH obtenidos por este método fueron discontinuos (cada ~10 min) y se correlacionaron con los datos de la ratio de dispersión de luz (R) adquiridos en la cubeta con ajuste previo.

Siguiendo el mismo procedimiento discutido en las secciones 3.3.1 y 3.3.2, los valores medios de las calibraciones y validaciones correspondientes a las tres réplicas obtenidas a diferente concentración de proteína y grasa se muestran en la Tabla 5. Cabe señalar que, como se comentó en la metodología, durante el experimento se tomaron los datos de pH externo en dos vasos de precipitado de 400 mL. En el vaso 1 se monitorizó el pH cada ~10 min desde el inicio de la fermentación hasta un pH alrededor de 4,9, momento en el cual se cambió la monitorización al segundo vaso de precipitado debido a que ya se había introducido la sonda en toda la superficie disponible, rompiendo el gel y produciendo sinéresis. Aunque se procedió con cuidado, lo anterior podría haber causado algún tipo de error, ya que el vaso 2 permaneció cubierto con parafilm y tuvo menos pérdida de calor por evaporación hasta ese momento, ocasionando una mayor velocidad de disminución del pH. Esto se detectó como un salto de pH de ~0,03 unidades comparado con el vaso 1, motivo que forzó el uso exclusivo de los datos del vaso 2 (pH 4,9 a 4,6) para las calibraciones y validaciones.

La validación del modelo de predicción utilizando datos de pH externo, se llevó a cabo con el fin de intentar reproducir la forma como se determina normalmente el pH en la industria láctea. Según los resultados obtenidos que se muestran en la Tabla 6, se logró obtener una buena predicción de los valores de pH_{min} . Sin embargo, en términos generales los resultados de la validación fueron mejores cuando se utilizaron los datos de pH obtenidos *in-line*. Esto probablemente se debió al margen de error en la medición del pH externo, es decir la pérdida de calor por evaporación en el vaso de precipitado que contiene la muestra y las posibles diferencias de sensibilidad de las sondas de pH, factores que también están presentes en la práctica industrial habitual. Adicionalmente, también tuvo su impacto la reducción del número de observaciones (medidas cada ~10 min en vez de cada 6 s) y la reducción del rango de pHs de trabajo (a partir de 4,9 en vez de 5,2).

En la calibración del modelo con datos de la monitorización *off-line*, se obtuvieron valores de SEP entre 0,04 y 0,17, con una media de 0,08 unidades de pH y valores de R^2 entre 0,21 y 0,79, con un promedio de 0,53. En la validación del modelo, los valores de SEP fueron mayores (entre 0,06 y 0,38 unidades de pH) y se encontraron valores de R^2 entre 0,43 y 0,89. Los promedios SEP y R^2 para todos los tratamientos fueron de 0,23 y 0,73, respectivamente. La estimación de pH_{min} estuvo entre 4,22 y 4,79, con un promedio de 4,64. En casi todos los tratamientos, con excepción de uno, los valores de pH estimados con el modelo fueron superiores a 4,6.

Tabla 6. Resultados del ajuste del modelo de predicción con datos de pH externo (*off-line*).

Tratamiento (%)		Calibración ¹			Validación ¹			Estimación de $pH_{4,6}$ ¹	
P	G	SEP	R^2	CV	SEP	R^2	CV	pH_{min}	Sesgo pH
3,1	0,5	0,17 ± 0,10	0,21 ± 0,18	3,51 ± 1,91	0,31 ± 0,17	0,78 ± 0,07	6,17 ± 3,22	4,79 ± 0,18	0,19
3,6	0,5	0,08 ± 0,01	0,58 ± 0,07	1,69 ± 0,22	0,13 ± 0,01	0,89 ± 0,02	2,64 ± 0,23	4,62 ± 0,11	0,02
4,1	0,5	0,08 ± 0,01	0,60 ± 0,19	1,73 ± 0,31	0,38 ± 0,33	0,85 ± 0,09	7,92 ± 6,87	4,69 ± 0,22	0,09
3,1	1,5	0,05 ± 0,02	0,74 ± 0,17	1,03 ± 0,39	0,18 ± 0,18	0,88 ± 0,08	3,71 ± 3,67	4,22 ± 0,86	-0,38
3,6	1,5	0,11 ± 0,05	0,40 ± 0,26	2,40 ± 0,99	0,24 ± 0,09	0,43 ± 0,40	4,95 ± 1,78	4,78 ± 0,15	0,18
4,1	1,5	0,07 ± 0,03	0,60 ± 0,26	1,52 ± 0,57	0,19 ± 0,15	0,70 ± 0,09	3,87 ± 3,14	4,65 ± 0,24	0,05
3,1	3,6	0,05 ± 0,02	0,35 ± 0,30	1,09 ± 0,42	0,10 ± 0,09	0,69 ± 0,08	2,16 ± 1,79	4,66 ± 0,15	0,06
3,6	3,6	0,04 ± 0,01	0,79 ± 0,12	0,93 ± 0,17	0,06 ± 0,02	0,71 ± 0,03	1,37 ± 0,50	4,73 ± 0,09	0,13
4,1	3,6	0,09 ± 0,02	0,51 ± 0,10	1,96 ± 0,51	0,53 ± 0,63	0,63 ± 0,00	10,63 ± 12,4	4,62 ± 0,40	0,02
Media ± DE		0,08 ± 0,03	0,53 ± 0,18	1,76 ± 0,61	0,23 ± 0,18	0,73 ± 0,10	4,82 ± 3,73	4,64 ± 0,27	0,04

¹Resultados expresados como media ± desviación estándar de tres réplicas. P, proteína; G, grasa. SEP, error estándar de predicción (unidades pH); R^2 , coeficiente de determinación; CV, coeficiente de variación (%); pH_{min} , valor de predicción del pH al momento en que el pH medido fue 4,6. Número de ensayos de coagulación = 27. Nc, número de observaciones por cada calibración, 2501 < Nc < 4171. Nv, número de observaciones por cada validación 1247 < Nv < 2189.

La relación entre los valores de pH medidos y los estimados con el modelo, desde 4,9 hasta 4,6, para los mismos ensayos que el caso de las Fig. 5 y 6, se muestra en la Fig. 7.

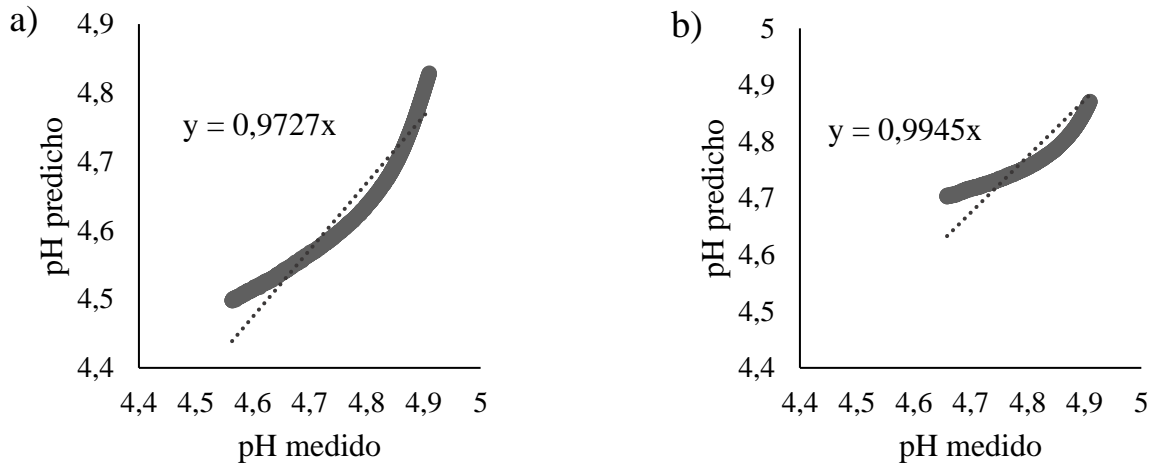


Figura 7. Validación del modelo de predicción de pH a una concentración de a) 3,6% de proteína y 0,5% de grasa (número de observaciones = 1779) y b) 3,1% de proteína y 1,5% de grasa (número de observaciones = 1474). Los datos mostrados corresponden a la réplica cuyo R^2 fue el más cercano al de la media de las tres validaciones.

En la Fig. 7 se representa la relación lineal entre los valores medidos y estimados con el modelo, donde se puede ver cierta desviación entre los valores en ambos tratamientos. Gráficamente, la Fig. 7a es semejante a la obtenida por Liu (2019), para muestras con 3,5% de proteína a una temperatura de 46 °C, donde los parámetros de ajuste fueron $R^2 = 0,9257$ y $SEP = 0,047$.

3.4 Calibración y validación del modelo de predicción del módulo elástico (G')

Los valores de G' obtenidos con el reómetro se correlacionaron con los valores de R adquiridos en la cubeta 2 (con ajuste de voltaje previo) del CoAguLab, debido a que, tal como se demostró en la sección 3.3.2, el ajuste inicial de voltaje permitió obtener mejores estimaciones de pH. Se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito en las secciones anteriores, los valores medios de la calibración y validación de las tres réplicas para los ensayos con diferente concentración de proteína y grasa se muestran en las Tablas 7 y 8.

Tabla 7. Resultados de la calibración del modelo de predicción de G' .

Tratamiento (%)		Calibración ¹		
P	G	SEP	R^2	CV
3,1	0,5	12,3 ± 5,4	0,55 ± 0,3	26,2 ± 12,1
3,6	0,5	8,4 ± 1,9	0,73 ± 0,1	13,5 ± 2,8
4,1	0,5	18,6 ± 3,9	0,71 ± 0,1	19,7 ± 5,0
3,1	1,5	9,4 ± 2,9	0,86 ± 0,1	12,1 ± 3,4
3,6	1,5	18,0 ± 8,8	0,42 ± 0,4	18,4 ± 8,7
4,1	1,5	16,0 ± 5,0	0,64 ± 0,2	13,2 ± 4,0
3,1	3,6	33,5 ± 4,3	0,41 ± 0,3	32,8 ± 4,9
3,6	3,6	24,6 ± 4,0	0,83 ± 0,1	15,2 ± 4,2
4,1	3,6	44,0 ± 1,5	0,65 ± 0,0	24,3 ± 2,2
Media ± DE		20,5 ± 4,2	0,64 ± 0,2	19,5 ± 5,3

¹Resultados expresados como media ± desviación estándar de tres réplicas. P, proteína; G, grasa. SEP, error estándar de predicción (Pa); R^2 , coeficiente de determinación; CV; coeficiente de variación (%). Número de ensayos de coagulación = 27. Nc, número de observaciones por cada calibración, 2501 < Nc < 4171.

Tabla 8. Resultados de la validación del modelo de predicción de G' .

Tratamiento (%)		Validación ¹			Estimación de G' a pH _{4,6} ¹		
P	G	SEP	R^2	CV	G'_{Real}	G'_{Pred}	Sesgo
3,1	0,5	27,9 ± 18,5	0,82 ± 0,19	64,3 ± 55,0	75,3 ± 14,5	59,3 ± 19,2	16,0
3,6	0,5	11,6 ± 3,7	0,85 ± 0,03	18,5 ± 5,2	86,3 ± 11,9	75,4 ± 9,3	11,0
4,1	0,5	29,2 ± 9,3	0,83 ± 0,09	31,5 ± 11,9	147,7 ± 14,3	110,4 ± 54,3	37,2
3,1	1,5	19,5 ± 11,9	0,94 ± 0,05	25,1 ± 15,7	117,8 ± 8,3	89,2 ± 7,2	28,6
3,6	1,5	35,0 ± 19,0	0,49 ± 0,26	36,1 ± 16,5	130,4 ± 21,7	93,5 ± 24,4	36,9
4,1	1,5	54,3 ± 59,3	0,79 ± 0,16	44,8 ± 49,2	161,6 ± 11,6	184,6 ± 145,1	-23,0
3,1	3,6	81,0 ± 74,8	0,82 ± 0,10	81,7 ± 79,0	167,1 ± 4,3	176,0 ± 157,0	-8,9
3,6	3,6	30,2 ± 7,7	0,84 ± 0,02	19,7 ± 10,4	251,2 ± 67,9	197,8 ± 81,5	53,4
4,1	3,6	69,4 ± 20,7	0,81 ± 0,07	38,4 ± 8,1	293,3 ± 56,7	200,3 ± 177,5	93,0
Media ± DE		39,8 ± 25,0	0,80 ± 0,11	40,0 ± 27,9	159,0 ± 23,5	131,8 ± 75,1	27,1

¹Resultados expresados como media ± desviación estándar de tres réplicas. P, proteína; G, grasa. SEP, error estándar de predicción (Pa); R^2 , coeficiente de determinación; CV; coeficiente de variación (%); G'_{Real} y G'_{Pred} , valores de G' real y estimado cuando el pH es igual a 4,6. Número de ensayos de coagulación = 27. Nv, número de observaciones por cada validación 1247 < Nv < 2189.

La calibración del modelo de predicción de G' arrojó valores de SEP con un rango de 8 a 44 Pa y valores de R^2 entre 0,41 y 0,86 (Tabla 8). Los valores promedio de SEP y R^2 para todos los tratamientos fueron de 20,5 y 0,64 respectivamente. En la validación del modelo de predicción de G' se obtuvieron valores de SEP en un rango de 12 a 81 Pa, con una media de 40 Pa y valores de R^2 entre 0,49 y 0,94, con un promedio de 0,80 (Tabla 8). El sesgo en la estimación de $G'_{pH4,6}$ osciló entre -23 y 93 Pa con una media de 27,1 Pa. Casi todos los tratamientos con excepción de dos tuvieron valores de G'_{Pred} superiores a los G'_{Real} .

La relación entre los valores de G' medidos y los estimados con el modelo, desde pH 4,9 hasta 4,6, para los mismos ensayos que en las Fig. anteriores relacionadas, se muestra en la Fig. 8.

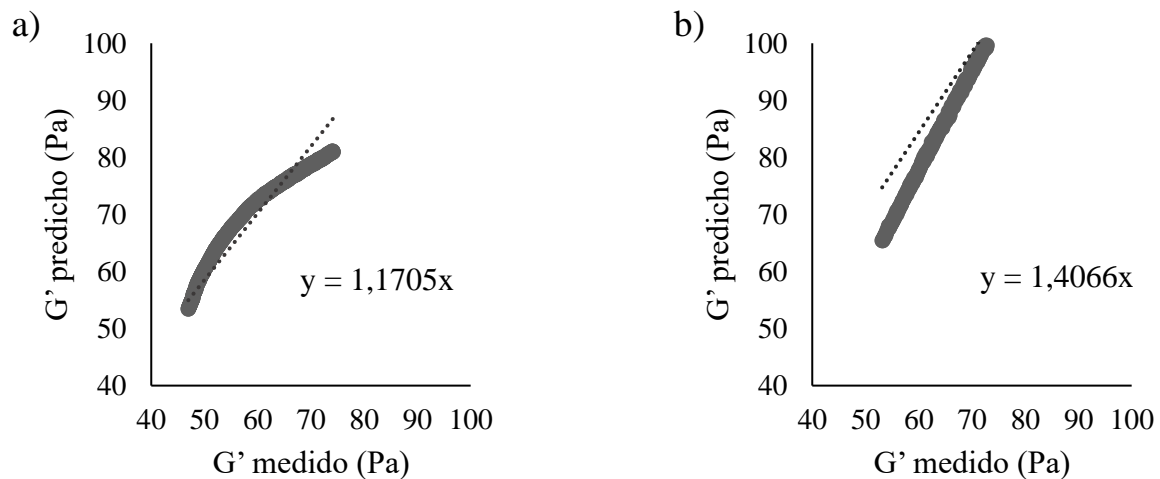


Figura 8. Validación del modelo de predicción de G' a una concentración de a) 3,6% de proteína y 0,5% de grasa (número de observaciones = 1555); b) 3,1% de proteína y 1,5% de grasa (número de observaciones = 1467). Los datos mostrados corresponden a la réplica cuyo R^2 fue el más cercano al de la media de las tres validaciones.

En la Fig. 8a se puede apreciar un mejor ajuste entre los valores medidos y estimados con el modelo al final de la curva de endurecimiento (tramo más importante) (Arango 2015), en comparación con la Fig. 8b, donde la forma final de la curva se desvía más de los valores medidos.

CONCLUSIONES

El aumento en la concentración de proteína en la leche produjo una prolongación del tiempo de fermentación hasta pH 4,6, mientras que la adición de grasa tuvo un efecto sobre la ratio de dispersión R ; concretamente, los perfiles de respuesta óptica fueron más bajos al aumentar la grasa. Por otra parte, la concentración de proteína y grasa tuvo un efecto directamente proporcional sobre $G'_{pH4,6}$, dando lugar a geles más firmes.

En la calibración de los modelos de predicción tanto de pH como de G' , los valores de SEP y R^2 fueron más bajos, en comparación a la validación como consecuencia del método para la obtención de los coeficientes de regresión del modelo de predicción. En cuanto a la estimación del valor de pH final de la fermentación, pH 4,6, el modelo de predicción fue efectivo tanto para la monitorización *in-line* como *off-line*. Con mayor frecuencia, los valores de pH estimado para los diferentes tratamientos fueron $\geq 4,6$, es decir que el pH de punto final tendió a sobreestimarse más que a subestimarse. Como era de esperar, el ajuste del voltaje inicial en la cubeta con ajuste de voltaje previo mejoró la bondad del modelo de predicción de pH, cuyos SEP y R^2 de validación estuvieron en un rango de 0,06 a 0,22 y 0,61 a 0,98, respectivamente, mientras que el sesgo en la estimación del pH a 4,6 osciló entre -0,02 y 0,18 unidades de pH. Para la predicción de G' , se obtuvieron valores de SEP con un rango de 12 a 81 Pa y un R^2 en un rango de 0,49 a 0,94. En general, los tratamientos que se ajustaron con más éxito a los modelos fueron 3,6% P - 0,5% G y 3,1% P - 1,5% G, que se corresponderían con yogures desnatados y semidesnatados, con niveles de proteína bajos y medios.

Por tanto, se logró calibrar y validar los modelos de predicción de pH y G' durante la fermentación de yogur, lo que permitiría generar estimaciones *in-line* de los valores de ambos parámetros tecnológicos en función de la ratio de dispersión de luz NIR, una vez preestablecidas las condiciones de elaboración. En este sentido, precisamente, una de las ventajas a la hora de implementar la tecnología, es el elevado grado de estandarización de la leche, así como de los procesos empleados en la elaboración de yogur, en función de la variedad, lo que sin duda facilita la aplicación de los modelos. No obstante, con vistas a la implementación industrial de la tecnología propuesta, sería necesario explorar detenidamente las causas que generan la variabilidad observada en los tiempos de fermentación necesarios para alcanzar valores de pH y G' finales, a fin de minimizar los errores de predicción y mejorar la robustez de los modelos predictivos, en presencia de un cierto grado de variabilidad composicional, de forma que se garantice la fiabilidad de las predicciones.

REFERENCIAS

- Arango O. 2015. Aplicación de dispersión de luz de infrarrojo próximo en la producción de derivados lácteos bajos en grasa con inulina. Universidad Autónoma de Barcelona. Tesis Doctoral.
- Arango O, Trujillo AJ, Castillo M. 2020. Inline control of yoghurt fermentation process using a near infrared light backscatter sensor. *J Food Eng.* 277(July 2020):1–6.
- Aziznia S, Khosrowshahi A, Madadlou A, Rahimi J. 2008. Whey protein concentrate and gum tragacanth as fat replacers in nonfat yogurt: Chemical, physical, and microstructural properties. *J Dairy Sci.* 91(7):2545–2552.
- Benezech T, Maingonnat JF. 1994. Characterization of the rheological properties of yoghurt-A review. *J Food Eng.* 21(4):447–472.
- De Brabandere AG, De Baerdemaeker JG. 1999. Effects of process conditions on the pH development during yogurt fermentation. *J Food Eng.* 41(3):221–227.
- Cimander C, Carlsson M, Mandenius CF. 2002. Sensor fusion for on-line monitoring of yoghurt fermentation. *J Biotechnol.* 99(3):237–248.
- Dai S, Corke H, Shah NP. 2016. Utilization of konjac glucomannan as a fat replacer in low-fat and skimmed yogurt. *J Dairy Sci.* 99(9):7063–7074.
- Fox PF, Uniacke-Lowe T, McSweeney PL., O’Mahony JA. 2015. Chapter 5. Salts of Milk. In: *Dairy Chemistry and Biochemistry.* Springer International. p. 261–262.
- Jørgensen CE, Abrahamsen RK, Rukke EO, Hoffmann TK, Johansen AG, Skeie SB. 2019. Processing of high-protein yoghurt – A review. *Int Dairy J.* 88:42–59.
- Langton M, Aström A, Hermansson A-M. 1996. Texture as a reflection of microstructure. *Food Qual Prefer.* 7:185–191.
- Lee WJ, Lucey JA. 2004. Structure and physical properties of yogurt gels: Effect of inoculation rate and incubation temperature. *J Dairy Sci.* 87(10):3153–3164.
- Liu S. 2019. Validation of an optical technology for the determination of pH in milk for the manufacture of yogurt. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Lucey JA. 2017. Formation, Structural Properties, and Rheology of Acid-Coagulated Milk Gels. *Cheese Chem Phys Microbiol Fourth Ed.* 1:179–197.

RD 271/2014. 2014. Real Decreto 271/2014, de 11 de abril. Norma de Calidad para el yogur o yoghurt.

Shao Y, He Y, Feng S. 2007. Measurement of yogurt internal quality through using Vis/NIR spectroscopy. *Food Res Int.* 40(7):835–841.

Soukoulis C, Panagiotidis P, Koureli R, Tzia C. 2007. Industrial yogurt manufacture: Monitoring of fermentation process and improvement of final product quality. *J Dairy Sci.* 90(6):2641–2654.

Tabayehnejad N, Castillo M, Payne FA. 2012. Comparison of total milk-clotting activity measurement precision using the Berridge clotting time method and a proposed optical method. *J Food Eng.* 108(4):549–556.

Tamime AY, Robinson RK. 2007. *Tamime and Robinson's Yoghurt, Science and Technology.* Woodhead Publishing.

Tolosa S, Bullón J, Cárdenas A. 2006. Producción de yogur utilizando membranas cerámicas para incrementar el porcentaje de sólidos en la leche. *Cienc e Ing.* 27(1):3–9.

Tremblay A, Panahi S. 2017. Yogurt consumption as a signature of a healthy diet and lifestyle. *J Nutr.* 147(7):1476S-1480S.

Walstra P, Wouters JT., Geurts T. 2006. Fermented milks. In: *Dairy science and technology.* Taylor & Francis Group. p. 558–572.

Xu ZM, Emmanouelidou DG, Raphaelides SN, Antoniou KD. 2008. Effects of heating temperature and fat content on the structure development of set yogurt. *J Food Eng.* 85(4):590–597.