



Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y
BIOCIENCIAS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARITZAKO ETA BIOZIENTZIETAKO GOI
MAILAKO ESKOLA TEKNIKO***

**ESTUDIO DE LA UTILIZACIÓN DE CONCENTRADOS
PROTEICOS EN LA FABRICACIÓN DE YOGURES**

presentado por

Marina Carmen Otal Abízano *(e)k*

aurkeztua

**GRADO EN INNOVACIÓN DE PROCESOS Y PRODUCTOS ALIMENTARIOS
GRADUA ELIKAGAI PROZESU ETA PRODUKTUEN BERRIKUNTZAN**

Junio, 2020 / 2020, *ekaina*

RESUMEN

El yogur es el producto de la leche obtenido mediante la fermentación láctica con *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Previamente al proceso fermentativo, pueden ser añadidos concentrados proteicos lácteos que permiten incrementar el nivel de extracto seco en la fracción láctea y consiguen minimizar los defectos de textura o sinéresis del producto. Además, estos ingredientes pueden reemplazar total o parcialmente a la leche en polvo utilizada tradicionalmente en la elaboración del yogur firme.

El objetivo de esta revisión bibliográfica es estudiar los concentrados proteicos comparando sus efectos sobre las propiedades del yogur. Para ello, se han empleado diferentes recursos electrónicos de información disponibles en la BUPNA.

La separación de la leche mediante técnicas de membrana permite obtener concentrados de proteínas lácteas (MPC), concentrados de proteínas del suero (WPC) o concentrados de caseína micelar (MCC). Los concentrados proteicos son empleados debido a que posibilitan la obtención de yogures con alto contenido proteico y pueden mejorar la estructura, textura, y viscosidad del gel. Este trabajo permitirá realizar nuevas estrategias de trabajo en este campo.

Palabras clave: yogur, concentrado proteico, proteína sérica, proteína del suero, caseína.

ABSTRACT

Yogurt is a milk product obtained by lactic fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. Prior to the fermentation process, milk protein concentrates can be added to increase the dry matter in the milk fraction and to minimize texture defects or syneresis of the product. In addition, these ingredients can totally or partially replace the milk powder traditionally used in the production of set yogurt.

The aim of this literature review is to study protein concentrates by comparing their effects on the properties of yoghurt. For this purpose, different electronic information resources available in the BUPNA have been used.

The separation of milk using membrane techniques allows obtaining milk protein concentrates (MPC), whey protein concentrates (WPC) or micellar casein concentrates (MCC). Protein concentrates are used to obtain yogurts with a high protein content and to improve the structure, texture, and viscosity of the gel. This report will seek to identify successful new work strategies in this field.

Key words: yogurt, protein concentrate, serum protein, whey protein, casein.

Índice

1. Antecedentes	1
1.1. Yogur	1
1.2. Método de elaboración del yogur	3
1.3. Yogur firme desnatado	6
1.4. Ingredientes esenciales	7
1.4.1. Bacterias ácido-lácticas	7
1.4.2. Leche	8
1.5. Métodos de normalización	15
1.5.1. Adición de estabilizantes.....	15
1.5.2. Adición de ingredientes lácteos.....	16
2. Objetivos	21
3. Metodología	22
4. Resultados y discusión	23
4.1. Producción de concentrados proteicos	23
4.1.1. Concentrados y aislados de proteína de leche (MPC, MPI)	24
4.1.2. Concentrados y aislados de proteína del suero (WPC, WPI).....	25
4.1.3. Concentrados de caseína micelar (MCC, LMCC).....	27
4.2. Utilización de concentrados proteicos en la elaboración de yogur	28
4.3. Efectos de los concentrados proteicos en el yogur	29
4.3.1. Características físico-químicas.....	29
4.3.2. Estructura y textura del gel	30
4.3.3. Viscosidad.....	31
4.3.4. Sinéresis	32
4.3.5. Características organolépticas.....	33
5. Conclusiones y perspectivas	34
6. Bibliografía	35

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de los yogures en función del contenido en materia grasa (% m/m) (RD 271/2014, de 11 de abril).	1
Tabla 2. Composición nutricional por 100 gramos de yogur firme y griego clasificados en función de la materia grasa (Chandan, 2017).	3
Tabla 3. Composición química de la leche (% m/m) (BEDCA, 2007; Fox et al., 2015a).	9
Tabla 4. Clasificación de la leche destinada al consumo humano en función del contenido en materia grasa (% m/m) (Reglamento (UE) nº 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de diciembre de 2013, sobre creación de la organización común de mercados de los productos agrarios).	9
Tabla 5. Concentración (g/L) y cantidad (% sobre proteína total) de las principales proteínas de la leche. Adaptada de Pereira (2014); Robinson (2002).	11
Tabla 6. Composición de la leche en polvo (% m/m). Adaptada de Augustin et al. (2003).	18
Tabla 7. Composición del suero en polvo (% m/m). Adaptada de Augustin & Margetts (2003); Zadow (2003a).	19
Tabla 8. Características de las técnicas de filtración de la leche (Pouliot, 2008).	23
Tabla 9. Composición (%) de los principales MPC (Agarwal et al., 2015; Meena et al., 2017). ..	25
Tabla 10. Composición (%) de los principales WPC (Zadow, 2003a).	26

Índice de figuras

Figura 1. Proceso de elaboración del yogur firme. Adaptada de Lee & Lucey (2010); Tamime & Robinson (2007b).	4
Figura 2. Morfología de <i>Streptococcus thermophilus</i> (izqda.) y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (dcha.) (García, 2010).	7
Figura 3. Estructura de la disposición de la micela de caseína (Horne, 1998).	11
Figura 4. Estructura de las micelas de caseína ante diferentes valores de pH. Las cadenas representan las proteínas, que están unidas mediante una interacción hidrofóbica (puntos de cruce). Los puntos negros interiores representan el CCP, mientras que el círculo negro exterior representa el rango de repulsión entre las micelas. Adaptada de Horne (2008).	14
Figura 5. Estructura microscópica de yogur sin gelatina (izqda.) y con 1,5% de gelatina (dcha.) (Salvador, 1998).	16

Figura 6. Diagrama de obtención de ingredientes lácteos. Adaptada de Augustin & Margetts (2003); Nunes & Tavares (2019).	17
Figura 7. Diagrama de obtención de MPC y MPI. Adaptada de Bastian et al. (1991); Chamberland et al. (2020).	24
Figura 8. Diagrama de obtención de WPC, WPI y NWPC. Adaptada de Heino et al. (2007).	26
Figura 9. Diagrama de obtención de MCC y LMCC. Adaptada de Amelia & Barbano (2013); Hurt & Barbano (2015).	27
Figura 10. Microscopía electrónica de yogur desnatado fortificado con 1,5% MPC (A) y 1,5% WPC (B) (Modler & Kalab, 1983).	30
Figura 11. Microscopia electrónica (20 μ m) de yogur obtenido a partir de WPC (izqda.) y SMP (dcha.) (Remeuf et al., 2003).	31

1. Antecedentes

1.1. Yogur

El «yogur» o «yoghourt» es el producto de leche coagulada obtenido por fermentación láctica mediante la acción de *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (RD 271/2014, de 11 de abril).

A pesar de que no exista constancia sobre el origen de los productos lácteos fermentados, se cree que el consumo de bebidas a base de leche fermentada como *laban rayeb* o *lavan khad* se remonta alrededor del año 7000 a.C en Egipto (Chandan et al., 2017). Los productos lácteos fermentados permiten extender la vida útil de la materia prima y a su vez, presentan características organolépticas que los diferencian de la materia de origen en cuanto a atributos de viscosidad, aroma y textura (Tamime & Robinson, 2007a).

La producción y el consumo de las leches fermentadas en España ha aumentado considerablemente, acaparando en el año 2018 el 2,14% del presupuesto total destinado a la compra de bebida y comida para el hogar. Cabe destacar que los yogures lideran el mercado de las leches fermentadas, alcanzando cuotas del 67,6% en volumen (kg) y el 56,4% en valor (€) en 2018 (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2018).

El yogur puede ser elaborado tanto a partir de leche o leche concentrada (desnatadas o no) como a partir de nata; o bien, mediante la mezcla de dos o más de los productos citados anteriormente. Además, se permite la adición de otros ingredientes lácteos (leche en polvo, nata en polvo, suero en polvo, proteínas de leche...) siempre y cuando hayan sido sometidos a un tratamiento equivalente, al menos, a la pasteurización (RD 271/2014, de 11 de abril).

Todos los yogures deben poseer un pH igual o inferior a 4,6 y un contenido de extracto seco en la parte láctea de 8,5% (m/m) o superior. Además, los microorganismos responsables de la fermentación láctea deben ser viables y, la presencia de estos en la parte láctea del producto terminado debe ser, al menos, de 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo o mililitro (RD 271/2014, de 11 de abril).

Los yogures son clasificados en función del contenido en materia grasa en la fracción láctea (RD 271/2014, de 11 de abril) tal y como se indica en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Clasificación de los yogures en función del contenido en materia grasa (% m/m) (RD 271/2014, de 11 de abril).

Denominación	Contenido de materia grasa (% m/m)
Yogur	≥ 2
Yogur semidesnatado	0,5-2
Yogur desnatado	$\leq 0,5$

Los tipos de yogur firme codificados en el Real Decreto 271/2014 son:

- **Yogur natural:** Es el definido anteriormente.
- **Yogur natural azucarado:** Yogur natural que contiene azúcar o azúcares comestibles.

- **Yogur edulcorado:** Yogur natural que contiene los correspondientes edulcorantes autorizados para ello.
- **Yogur con fruta, zumos y/u otros alimentos:** Yogur natural que contiene fruta, zumos y/u otros alimentos. La cantidad de yogur en el producto acabado deber ser, al menos, del 70% (m/m).
- **Yogur aromatizado:** Yogur natural que contiene aromas y otros ingredientes alimentarios con propiedades aromatizantes. La cantidad de yogur en el producto acabado deber ser, al menos, del 80% (m/m).
- **Yogur pasteurizado después de la fermentación:** Yogur natural sometido a un tratamiento térmico equivalente a la pasteurización tras la etapa de fermentación. El yogur pasteurizado se diferencia del yogur natural en que, a consecuencia del tratamiento térmico, este primero ha perdido la viabilidad de los microorganismos lácteos.

Además del yogur firme, en el mercado también se pueden encontrar el yogur batido, yogur griego y yogur líquido. Todos ellos se diferencian en el método de producción y, consecuentemente, en la estructura física del coágulo del gel formado (Tamime & Deeth, 1980).

La principal diferencia entre el yogur firme y el yogur batido se basa en que el yogur firme se fermenta en el mismo recipiente de venta, mientras que en el yogur batido la fermentación se produce en tanques bajo una agitación mecánica quedando la estructura del gel fragmentada previamente a la etapa de envasado (Tamime & Deeth, 1980).

Por otro lado, la producción de yogur griego incluye una etapa final en la cual se retira la fracción del suero sobrante, obteniendo un producto final con un 24% de sólidos totales aproximadamente (Tamime & Deeth, 1980). En la actualidad no existe una normativa que legisle sobre el yogur griego, si bien, el *Codex Alimentarius* establece que la “leche fermentada concentrada” es una leche fermentada cuya proteína ha sido aumentada hasta un mínimo del 5,6% (m/m) antes o después de la fermentación (Codex Alimentarius, 2011). En base a esto, el término “yogur griego” puede adquirir la anterior definición ya que el proceso de eliminación del suero tras la fermentación conduce a un incremento de la concentración de los sólidos totales y, consecuentemente, de las proteínas lácteas.

Respecto a la textura, el yogur firme se presenta en forma de un gel continuo, mientras que el yogur griego se caracteriza por poseer una textura viscosa y cremosa. Por otro lado, el yogur para beber o yogur líquido se considera que es similar a un yogur batido, pero con una menor viscosidad debido a su menor contenido en sólidos totales (Shah, 2003).

La composición nutricional de los yogures firmes y griegos encontrados en el mercado se muestra en la **Tabla 2**. La principal diferencia nutricional entre ambas variedades se fundamenta en el contenido proteico, siendo significativamente superior en el yogur griego.

Tabla 2. Composición nutricional por 100 gramos de yogur firme y griego clasificados en función de la materia grasa (Chandan, 2017).

Componente	Firme	Firme semidesnatado	Firme desnatado	Griego	Griego semidesnatado	Griego desnatado
Humedad (%)	87,90	85,07	85,23	81,30	83,56	85,10
Energía (kcal)	61	63	56	97	73	59
Proteína(g)	3,47	5,25	5,73	9,00	9,95	10,19
Grasa (g)	3,25	1,55	0,18	5,00	1,92	0,39
H. de carbono(g)	4,66	7,04	7,68	3,98	3,94	3,60
Calcio (mg)	21	183	199	100	115	110
Vitamina C (mg)	0,5	0,8	0,9	0,0	0,8	0,0

1.2. Método de elaboración del yogur

La elaboración de yogur firme se compone de diversas etapas (**Figura 1**) que permiten obtener un producto final física y organolépticamente distinto a la materia prima de partida a través de un conjunto de fenómenos que ocurren durante la manipulación y el procesado de esta.

- **Tratado inicial de la leche**

La leche cruda se somete normalmente a centrifugación con el objetivo de clarificar el producto y eliminar células somáticas e impurezas o bien para ajustar la fracción lipídica. Posteriormente, la leche es pasteurizada hasta los 60-69°C durante 20-30 segundos con el propósito de destruir cualquier forma vegetativa de microorganismos e inactivar enzimas. Finalmente, la leche es enfriada por debajo de los 5°C para evitar el crecimiento de las bacterias psicrófilas (Tamime & Robinson, 2007b).

- **Normalización**

La normalización de la leche es una operación esencial cuyo objetivo es aumentar el extracto seco hasta los niveles deseados. En esta etapa, la concentración de la fracción lipídica es ajustada en base a la variedad de yogur que se desee producir; no obstante, la normalización también influye al contenido no graso de la leche (principalmente lactosa, proteínas y minerales) permitiendo modificar la concentración de los componentes y obteniendo las características deseadas en el coágulo final (Tamime & Robinson, 2007b).

La importancia de la normalización en la producción del yogur se atribuye a que esta permite incrementar la consistencia y la viscosidad del producto final y, a su vez, disminuye el riesgo de sinéresis (Tamime & Robinson, 2007b).

El aumento del extracto seco puede conseguirse a través de un proceso de concentración basado en una evaporación del agua en condiciones de vacío (Tamime & Robinson, 2007b). Este

proceso permite eliminar la fracción acuosa de la leche a temperaturas moderadas (70-80°C). Según Tamime & Deeth (1980), la técnica también permite reducir el aire atrapado en la leche y, a su vez, reducir la sinéresis y mejorar la estabilidad del producto durante su almacenamiento.

Otra de las técnicas utilizadas para sustraer el agua se basa en la separación de compuestos a través de membranas mediante un proceso de microfiltración, ultrafiltración u osmosis inversa (Tamime & Robinson, 2007b). En la ultrafiltración, la presión hidrostática fuerza a la leche contra una membrana semipermeable que retiene proteínas, glóbulos grasos y bacterias entre otros (retenido) y permite el paso del agua y solutos de bajo peso molecular (permeado). La microfiltración se realiza con una menor presión y un mayor tamaño del poro. Por otro lado, en la separación por ósmosis inversa se emplean membranas densas con un tamaño de poro de muy pequeño que únicamente permiten el paso de solutos de muy bajo peso molecular (Kumar et al., 2013).

Por último, es muy común fortificar la leche añadiéndole ingredientes lácteos como leche en polvo (entera o desnatada), pero también son utilizados otros ingredientes lácteos como los productos del suero de la leche o de la caseína obtenidos a partir de técnicas de separación o concentración (Tamime & Robinson, 2007b). Generalmente, las proteínas lácteas contribuyen a la formación de un cuerpo más firme y reducen el drenaje del suero en el yogur (Sodini et al., 2004).

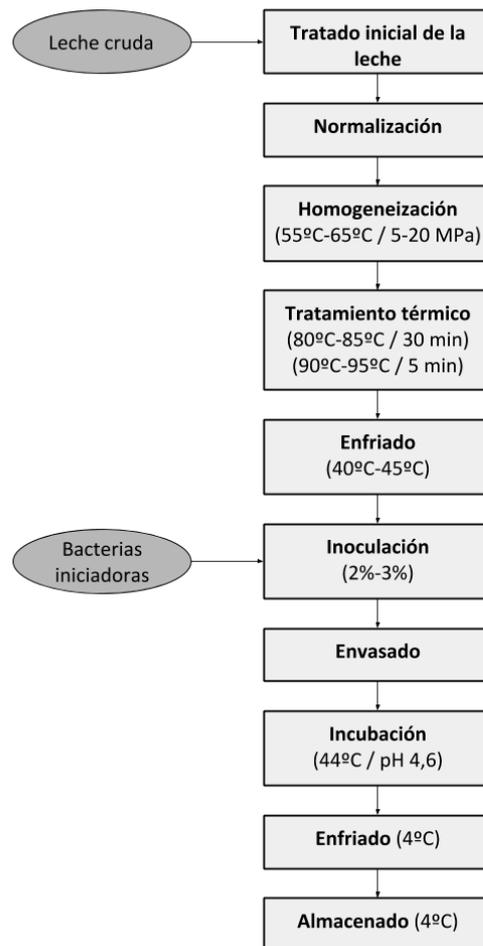


Figura 1. Proceso de elaboración del yogur firme. Adaptada de Lee & Lucey (2010); Tamime & Robinson (2007b).

- **Homogeneización**

Esta etapa se realiza para obtener una dispersión homogénea de los constituyentes de la leche, principalmente de los glóbulos de grasa, mediante la aplicación de presión (Tamime & Deeth, 1980). En la industria láctea la homogeneización se lleva a cabo con la aplicación de presión de 5-20 MPa y temperaturas que oscilan entre 55°C y 65°C (Lee & Lucey, 2010).

El proceso divide los grandes glóbulos de grasa (2-10 µm) en glóbulos de menor tamaño (0,1-1 µm) que quedan recubiertos con una nueva membrana compuesta principalmente por submicelas de caseína (Sfakianakis & Tzia, 2014; Tamime & Robinson, 2007b). Este proceso aumenta la densidad de los glóbulos de grasa y reduce su tendencia a aglutinarse. De esta manera, la grasa queda esparcida de manera uniforme en el líquido (Tamime & Deeth, 1980). El aumento de la superficie de contacto de los glóbulos grasos favorece las interacciones entre la grasa y las proteínas y, a su vez, entre la caseína y el suero durante la formación del gel (Cho et al., 1999).

- **Tratamiento térmico**

El tratamiento térmico de la leche permite asegurar la inocuidad del producto, ya sea de la propia leche o de otro producto lácteo. Asimismo, este proceso permite reducir el número de microorganismos patógenos a límites seguros para la salud del consumidor (Tamime & Robinson, 2007b).

El tratamiento térmico generalmente utilizado es el de la alta pasteurización, en el que se aplican temperaturas de 80-85°C durante 30 minutos o temperaturas de 90-95°C durante 5 minutos. Este ascenso de la temperatura permite eliminar la mayoría de los microorganismos (excepto las esporas), inactivar la gran parte de las enzimas de la leche y desnaturalizar la mayoría de las proteínas séricas (Tamime & Robinson, 2007b).

Además, la desnaturalización de las proteínas del suero a una temperatura superior a los 80°C provoca la formación de complejos entre las proteínas, dando lugar al inicio de la gelificación y permitiendo la explotación del yogur (Lee & Lucey, 2010).

- **Inoculación e incubación**

La leche es enfriada hasta 40-45°C (Tamime & Robinson, 2007b) y posteriormente se añaden las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* que serán las responsables de transformar la lactosa en ácido láctico.

La sinergia entre ambas cepas de bacterias permite alcanzar una mayor producción de ácido láctico en comparación con la actividad individual de cada cepa. En la primera etapa, los productos resultantes del metabolismo de *Streptococcus thermophilus* estimulan el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y, este, domina la última etapa del proceso fermentativo hasta alcanzar un nivel de pH próximo a 4,6 (Vedamuthu, 2006).

- **Enfriamiento**

Una vez alcanzado un nivel de pH de 4,6, el yogur es enfriado a una temperatura de 4°C. Esta etapa es fundamental para inhibir el crecimiento y las reacciones metabólicas de los cultivos iniciadores, así como evitar un aumento en la acidez del yogur (Tamime & Robinson, 2007b).

1.3. Yogur firme desnatado

Los yogures desnatados han adquirido popularidad debido a la creciente demanda de productos con bajo contenido calórico y de alimentos que poseen propiedades beneficiosas para la salud (Grunert et al., 2000; Küçükçetin, 2008; Machin et al., 2015; Mistry & Hassan, 1992). Machin et al. (2015), demostraron que la incorporación de productos lácteos desnatados a la dieta disminuye tanto la presión sistólica central como la presión del pulso braquial en personas adultas que poseen una presión sanguínea elevada.

El Real Decreto 271/2014 establece que el yogur desnatado debe poseer un contenido de materia grasa en su parte láctea menor o igual a 0,5% (m/m). En la elaboración de yogures desnatados, se puede emplear como materia prima leche desnatada o leche entera que haya sido sometida a un proceso de centrifugación con el objetivo de retirar la fracción grasa. Sin embargo, la reducción de la materia grasa puede generar problemas de calidad en el producto que se manifiestan a través de la reducción de la viscosidad del gel y el aumento de la sinéresis (Lee & Lucey, 2004; Sodini et al., 2004).

La materia grasa en el yogur ejerce un papel esencial en cuanto a la contribución a la formación de la emulsión, el desarrollo del aroma y la obtención de una adecuada textura de los geles. La grasa es portadora de los compuestos aromáticos volátiles y tiene la capacidad de reducir la volatilización de dichos compuestos durante el consumo, lo que afecta a la liberación de los aromas (Grunert et al., 2000). Además, la grasa también mejora la textura del yogur, a menudo haciendo que el producto final sea más firme, viscoso y elástico (Pereira et al., 2006; Schkoda et al., 2001).

Consecuentemente, la industria láctea se ha visto obligada a producir yogures desnatados que conserven la textura y el aroma que caracterizan a los yogures con grasa. Además, debido a la demanda de productos que contengan pocos aditivos, la producción del yogur desnatado se ha visto orientada a encontrar nuevos ingredientes que reemplacen el papel de la grasa en el producto (Chua et al., 2017; Lesme et al., 2020).

Se han utilizado diversos métodos para mejorar las propiedades del yogur desnatado, entre ellos se encuentra la adición de proteínas de suero, el aumento del contenido de sólidos totales, la utilización de espesantes y la modificación en alguno de los parámetros durante la elaboración (Sodini et al., 2004). Mistry & Hassan (1992) y Zhao et al. (2016) afirman que la adición de ingredientes lácteos en la etapa de normalización es una técnica ampliamente utilizada en la manipulación del yogur desnatado debido a que permite incrementar el contenido en sólidos totales y mejorar los defectos de calidad del producto final.

1.4. Ingredientes esenciales

Los dos ingredientes esenciales que se requieren en la elaboración del yogur son las bacterias ácido-lácticas y la leche.

1.4.1. Bacterias ácido-lácticas

Las bacterias responsables de la producción del yogur son *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Las bacterias pertenecientes a *Streptococcus thermophilus* son Gram-positivas, anaerobias facultativas, inmóviles y no formadoras de esporas. Morfológicamente, estas se describen como células esféricas de 0,8-1,0 μm de diámetro y longitud variable (**Figura 2**). Además, realizan una fermentación homoláctica y son capaces de producir ácido a partir de glucosa, sacarosa, maltosa, inulina y lactosa entre otros. La capacidad de crecimiento se ve favorecida con niveles de cloruro sódico del 2,5%. La temperatura mínima de crecimiento es de 19-21°C y pueden llegar a crecer en ambientes a 52°C. Sin embargo, la propagación de *S. thermophilus* es limitada a un nivel de cloruro sódico del 4% o con niveles de pH superiores a 9,6 (García, 2010; Shori et al., 2019).

Por otro lado, el género *Lactobacillus* está compuesto por bacilos y cocobacilos con dimensiones de 0,5-1,2 x 1,0-10,0 μm . Sus características fisiológicas los caracterizan por ser Gram-positivas, no formadoras de esporas y, generalmente, inmóviles. Además, son anaerobios facultativos y se desarrollan en un rango de temperatura comprendido entre los 2°C y los 53°C, siendo la temperatura óptima de 30-40°C. El crecimiento de *Lactobacillus* se ve potenciado con un pH de 5,5-6,2 pero poseen la capacidad de crecer a niveles de pH 5,0 o menores (García, 2010).

Dentro del género *Lactobacillus* se encuentra la especie *Lactobacillus delbrueckii*. Morfológicamente son bacilos que poseen dimensiones de 0,5-0,8 x 2,9 μm . Actualmente hay reconocidas 4 subespecies de *Lactobacillus delbrueckii* y, una de ellas es *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (**Figura 2**), empleada para la producción de yogur y queso (García, 2010).

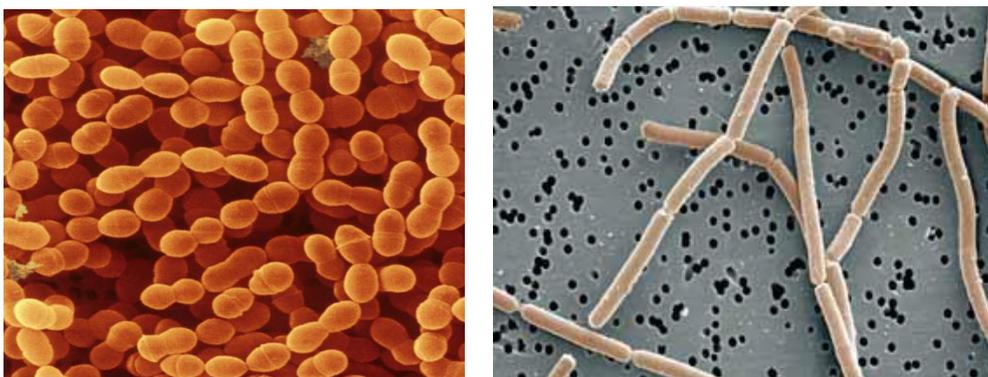


Figura 2. Morfología de *Streptococcus thermophilus* (izqda.) y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (dcha.) (García, 2010).

El co-cultivo de las dos cepas de bacterias ácido-lácticas origina la simbiosis y, la actividad conjunta de ambas cepas, induce cambios en los componentes nativos de la leche que son los

responsables de las principales características físico-químicas y sensoriales del yogur (Vedamuthu, 2006).

La lactosa, durante la fermentación, es reducida en un 30% en base a la cantidad inicial debido a su conversión en ácido láctico. Además, la proteólisis causada por las cepas de bacterias se manifiesta en un incremento de los aminoácidos (principalmente prolina y glicina) en la composición del yogur. También, el ácido láctico, acetaldehído, sulfuro de dimetilo o benzotiazol producidos durante la fermentación proporcionan el característico aroma del yogur final (Vedamuthu, 2006). Por lo que respecta a la fracción lipídica, la lipólisis es generalmente baja en el yogur y, por lo tanto, no es significativa en términos aromáticos. En general, el contenido de ácidos grasos libres del yogur difiere ligeramente respecto al de la leche (Alm, 1982).

La combinación de las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, normalmente en relación 1:1, ejerce un efecto positivo en términos de crecimiento y acidificación, producción de sabores y aumento de la cantidad de expopolisacáridos en comparación con las mismas cepas aisladas (Oliveira et al., 2012).

Entre estas dos cepas existe el fenómeno de simbiosis, de tal manera que, *S. thermophilus* domina la primera fase de la fermentación, mientras que el crecimiento de *L. bulgaricus* en esta fase es limitado. La lactosa de la leche es inicialmente catalizada por *S. thermophilus* en galactosa y glucosa y, esta última es convertida a piruvato y metabolizada a ácido láctico mediante la lactato deshidrogenasa. La baja concentración de oxígeno en el medio y el formiato liberado por la actividad de *S. thermophilus* estimulan el crecimiento de *L. bulgaricus*, que logra dominar el proceso fermentativo desde que el pH es aproximadamente a 5,0 hasta que la fermentación cesa debido al enfriamiento del medio a temperaturas inferiores a 4°C (Vedamuthu, 2006).

L. bulgaricus utiliza en su metabolismo el ácido fórmico y el CO₂ producidos por *S. thermophilus*, mientras que este último, a su vez, es estimulado por los aminoácidos y pequeños péptidos producidos a consecuencia de la actividad metabólica de *L. bulgaricus* (Vedamuthu, 2006).

1.4.2. Leche

La leche natural es obtenida a partir del ordeño higiénico y completo de las hembras mamíferas sanas y bien alimentadas. La denominación “leche” comprende únicamente a la leche de vaca y, en el momento de su venta, esta debe contener como mínimo un 3% (m/m) de materia grasa, 4,2% (m/m) de lactosa, 3,2% (m/m) de proteínas y un 8,2% (m/m) de extracto seco magro. Además, la acidez debe ser inferior a 0,2 gramos de ácido láctico por 100 mililitros de leche (D 2484/1967, de 21 de septiembre).

La leche es una solución acuosa (88% de la composición total del sistema). Dentro de la fracción sólida, destacan los hidratos de carbono, seguidos por los lípidos y las proteínas (séricas y caseínas, estas últimas representan el 80% del contenido proteico total). Por último, los componentes minoritarios de los sólidos totales son los minerales, entre los que destacan el potasio y el calcio (BEDCA, 2007; Fox, 2008). La composición química de este complejo sistema fisicoquímico queda reflejada en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Composición química de la leche (% m/m) (BEDCA, 2007; Fox et al., 2015a).

Componente	(% m/m) sobre composición total
Agua	88,40
Proteína total	3,20
Lípidos totales	3,80
Hidratos de carbono	4,7
Lactosa	4,7
Minerales totales	0,43
Potasio	0,15
Calcio	0,12

La leche también es considerada un medio acuoso en el que se dispersan partículas coloidales que difieren en cuanto al tamaño: proteínas del suero disueltas a nivel molecular, caseínas dispersas en forma de micelas de gran tamaño (50-5000 nm) y lípidos emulsionados a nivel de grandes glóbulos (1-20 μm). La leche es, por tanto, un sistema complejo que combina lípidos en emulsión, caseínas unidas a sales minerales en suspensión y sales minerales, proteínas solubles y lactosa en disolución (Fox, 2008).

Las proteínas lácteas pueden clasificarse en función de su solubilidad en un medio. Por un lado, las caseínas (80% de la fracción proteica) son proteínas insolubles que coagulan y precipitan cuando el pH de la leche es de 4,6 a 20°C. Por otro lado, en estas mismas condiciones, las proteínas del suero (20% de la fracción proteica) permanecen solubles tras la precipitación de las caseínas (Huppertz et al., 2018).

La parte lipídica de la leche está formada por glóbulos de grasa. Por un lado, el 70% de los lípidos totales son ácidos grasos saturados, destacando el ácido palmítico (30%), esteárico (12%) y mirístico (11%). Por otro lado, la fracción de ácidos grasos insaturados está compuesta principalmente por ácido oleico (Lindmark-Månsson et al., 2003). La leche destinada al consumo humano se clasifica en tres categorías en función del contenido en materia grasa, adquiriendo las denominaciones que quedan representadas en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Clasificación de la leche destinada al consumo humano en función del contenido en materia grasa (% m/m) (Reglamento (UE) nº 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de diciembre de 2013, sobre creación de la organización común de mercados de los productos agrarios).

Denominación	Contenido de materia grasa (% m/m)
Leche entera	$\geq 3,5$
Leche semidesnatada	1,50-1,80
Leche desnatada	$\leq 0,5$

La lactosa (4,7% sobre la composición química total) representa el principal hidrato de carbono en la leche. Este es un disacárido compuesto por galactosa y glucosa unidas mediante un enlace β 1-4 glucosídico. Este azúcar será convertido en ácido láctico mediante las bacterias ácido-lácticas en la producción de yogur (Fox, 2008; Zavala, 2009).

Por otro lado, la leche posee una composición particular de micronutrientes. Se conoce que, naturalmente, la leche es una fuente de potasio y calcio, encontrándose ambos en concentraciones aproximadas a 1450 y 1200 mg/L respectivamente (Fox et al., 2015a). El calcio se localiza asociado a los residuos de caseína fosforilados en el interior de las micelas o unido tanto a las proteínas séricas como a las sales inorgánicas de fosfato en la fracción acuosa (Little & Holt, 2004). Además, en la fracción mineral se pueden distinguir otros elementos como el fósforo, el magnesio o el sodio. El fósforo se encuentra en forma orgánica unido a las micelas de caseína, mientras que el fósforo inorgánico suele localizarse en la fase acuosa en forma de sales de fosfato de calcio coloidal (Fox et al., 2015a).

El perfil vitamínico de la leche incluye vitaminas liposolubles (grupos A, D, E y K) e hidrosolubles (grupo B y C). Por lo que respecta a sus actividades biológicas, cabe destacar que las vitaminas hidrosolubles y la vitamina K actúan como coenzimas, mientras que la vitamina D funciona como hormona, la vitamina E posee propiedades antioxidantes y, por último, la vitamina A favorece el desarrollo de la visión (Fox et al., 2015b).

La leche es aprovechada a nivel tecnológico debido a la capacidad de formación de coloides, especialmente de las micelas de caseína. Las micelas se desestabilizan y, posteriormente, se unen después de una proteólisis o una acidificación limitada a un pH de 4,6 permitiendo la explotación de las leches fermentadas (Fox, 2008).

Las proteínas son los componentes de la leche que más influyen en las propiedades de los productos lácteos. Debido a su importancia tecnológica, estos componentes han sido ampliamente estudiados y caracterizados (Fox, 2008).

- **Propiedades y funciones de las proteínas de la leche**

Las principales caseínas de la leche son las α_{s1} -, α_{s2} -, β - y κ - caseínas. Las caseínas se encuentran principalmente en forma de grandes partículas conocidas como micelas. Estas son esferas que poseen un diámetro de 50-500nm y se calcula que se encuentran 10^{14} - 10^{16} micelas/mL de leche. La fracción sólida de las micelas está compuesta por un 94% de proteínas y un 6% de especies de bajo peso molecular (Fox, 2008) conocidas como fosfato de calcio coloidal (CCP).

Por lo que respecta a su disposición (**Figura 3**), la micela está ensamblada a partir de subunidades más pequeñas, llamadas submicelas, compuestas por caseínas unidas de forma hidrofóbica (barras rectangulares en la **Figura 3**). Las submicelas, a su vez, están unidas a través del fosfato de calcio coloidal formando la unidad micelar (Anema, 2008).

No obstante, la distribución de las caseínas en la micela es heterogénea. De esta manera, las submicelas con concentraciones elevadas de κ - caseína se encuentran en la superficie de la micela, mientras que las α_{s1} -, α_{s2} - y β -caseínas se encuentran en el núcleo de la estructura micelar. De esta manera, la κ - caseína, que representa el 15% total de la caseína, tiene un papel importante en la estabilización del resto de caseínas (Anema, 2008).

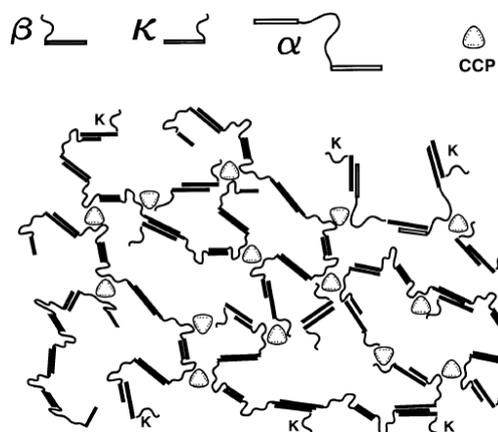


Figura 3. Estructura de la disposición de la micela de caseína (Horne, 1998).

Por otro lado, la β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, inmunoglobulina, albúmina sérica, lactoferrina, lactoperoxidasa, y lisozima componen la parte soluble de las proteínas conocidas como proteínas séricas (Fox, 2008; Pereira, 2014). Estas se encuentran en la leche en forma de glóbulos con una estructura secundaria y terciaria bien definidas. Las proteínas séricas (especialmente la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina) conservan su conformación nativa sólo dentro de unos rangos de temperatura limitados. La exposición a temperaturas extremas resulta en la desnaturalización y posterior agregación de las proteínas (Anema, 2008).

La **Tabla 5** muestra la concentración (g/L) y el correspondiente porcentaje de las principales proteínas de la leche. La α -caseína es la proteína más abundante dentro del grupo de las caseínas. Por lo que respecta a las proteínas séricas, destaca la β -lactoglobulina (50% del total de proteínas séricas) seguida de la α -lactoalbúmina.

Tabla 5. Concentración (g/L) y cantidad (% sobre proteína total) de las principales proteínas de la leche. Adaptada de Pereira (2014); Robinson (2002).

Proteínas de la leche	Concentración (g/L)	% sobre proteína total
Proteína total	32,3	100,0
Caseína total	26,0	80,0
α_1 -caseína	10,0	31,0
α_2 -caseína	2,6	8,0
β -caseína	9,3	28,8
κ -caseína	3,3	10,2
Proteína sérica total	6,3	20,0
β -lactoglobulina	3,2	9,9
α -lactoalbúmina	1,2	3,7
Inmunoglobulina	0,7	2,2
Albúmina sérica	0,4	1,2
Lactoferrina	0,1	0,3
Lactoperoxidasa	<0,1	<0,1
Lisozima	<0,1	<0,1

Las diferencias entre las propiedades de las proteínas lácteas pueden ser aprovechadas en la explotación de los derivados lácteos. En primer lugar, la diferencia de solubilidad a pH 4,6 (punto isoeléctrico de las caseínas) es un factor clave en la elaboración de quesos y productos lácteos fermentados. A niveles de pH de 4,6 las caseínas son insolubles y forman un precipitado, mientras que las proteínas séricas quedan disueltas en la leche. Además, las caseínas coagulan tras una proteólisis limitada formando un cuajo, mientras que las proteínas séricas no poseen esta capacidad (Fox, 2008).

El estado físico en el que se encuentran ambas proteínas en la leche también difiere. Las proteínas séricas se encuentran en la leche en forma de monómeros, mientras que las caseínas se encuentran en forma de grandes agregados denominados micelas. Debido a su estructura, las caseínas poseen un alto volumen específico y, en consecuencia, cuentan con la capacidad de formar soluciones altamente viscosas (Fox, 2008).

Por lo que respecta a la estabilidad ante el tratamiento térmico, cabe destacar que las caseínas son muy estables al calentamiento. La carencia de estructuras terciarias permanentes en las caseínas produce una estabilidad térmica en estas, permitiendo obtener productos lácteos esterilizados sin apenas cambios físicos. Por el contrario, las proteínas séricas adquieren el típico comportamiento de proteínas globulares y se desnaturalizan completamente a una temperatura de 90°C durante un tiempo de 10 minutos (Fox, 2008).

La composición de ambas proteínas difiere en cuanto al contenido en aminoácidos y a la proporción de azufre que estas poseen. Por un lado, las caseínas poseen niveles elevados de prolina y se encuentran fosforiladas (0,8% de fósforo aproximadamente), mientras que las proteínas séricas carecen de prolina y de fósforo. La presencia de fósforo en las caseínas proporciona propiedades como la estabilidad térmica o la capacidad de unión a metales (Fox, 2008).

Además, una de las características más notables de la secuencia de aminoácidos de las caseínas es que los residuos hidrofóbicos e hidrófilos no se distribuyen uniformemente, concediendo a la caseína una estructura anfipática. Esta característica otorga a las caseínas una buena actividad superficial así como propiedades espumantes y emulsificantes, haciendo de la caseína una proteína versátil escogida para su aplicación en diversas aplicaciones (Fox, 2008).

Por lo que respecta al azufre, las proteínas séricas poseen un 1,7% de azufre, presentándose este en forma de cisteína y siendo el responsable de las propiedades fisicoquímicas de la leche. La cisteína es especialmente importante debido a que reacciona, tras la desnaturalización térmica, con la κ -caseína y afecta significativamente a la coagulación del cuajo y a la estabilidad térmica de la leche. Por el contrario, las caseínas poseen baja cantidad de azufre (0,8%) y este se presenta en forma de metionina principalmente (Fox, 2008).

Por último, las actividades biológicas que desempeñan las caseínas y las proteínas del suero sobre la salud también difiere. Por lo que respecta a las proteínas séricas, la lactoferrina, la lactoperoxidasa y la lisozima poseen acción antibacteriana (Min et al., 2005), mientras que la lactoferrina, unida a la β -lactoglobulina y a la α -lactoalbúmina, reduce el desarrollo de los tumores (Parodi, 2007). La β -lactoglobulina posee la capacidad de transportar el retinol, formar complejos con los ácidos grasos y, además, posee propiedades antioxidantes; mientras que la

lactoferrina es un elemento esencial en la absorción del hierro y para el desarrollo de funciones antioxidantes (González-Chávez et al., 2009).

Por otro lado, la principal función atribuida a las caseínas es el transporte de minerales, principalmente calcio y fósforo. Además, las caseínas producen péptidos bioactivos que ejercen un efecto positivo sobre la salud (Holt et al., 2013).

- **Desestabilización de las proteínas durante la elaboración del yogur**

La capacidad de las proteínas en la formación de geles es un aspecto clave en el procesamiento de los productos lácteos fermentados. Las técnicas empleadas para desestabilizar las proteínas lácteas son el tratamiento térmico (proteínas séricas), el empleo de enzimas del cuajo (caseínas) o la acidificación (caseínas y proteínas séricas desnaturalizadas). En el caso del yogur, las caseínas y las proteínas séricas desnaturalizadas son las responsables de las propiedades gelificantes del producto (Lucey, 2008).

La acidificación de la leche a causa de la transformación de lactosa en ácido láctico a través de las cepas de bacterias cultivadas origina un descenso del pH y, consecuentemente, la estructura micelar de la caseína se ve afectada (Lucey, 2017). Las micelas de caseína nativas en la leche (pH de 6,7) son estables gracias a su carga negativa y a la repulsión estérica. Sin embargo, cuando estas micelas son sometidas a un proceso de acidificación (pH desde 6,7 hasta 4,6), pierden su estabilidad debido a la disolución del fosfato de calcio coloidal (Lucey, 2008).

Las diversas estructuras que van adoptando las micelas durante la acidificación quedan reflejadas en la **Figura 4**. Se pueden diferenciar 3 fases en dicho proceso (Lucey, 2017):

- **A pH 6,7-6,0:** La matriz micelar está unida mediante el CCP (puntos negros en la **Figura 4**) y mediante las interacciones hidrofóbicas (puntos de cruce en la red de proteínas en la **Figura 4**). Las interacciones hidrofóbicas, a estos niveles de pH, son débiles y están contrarrestadas por las cargas negativas presentes en los grupos carboxilo ionizados dispersos en la red. Estas cargas negativas de los grupos carboxilo ionizados proporcionan, en las κ -caseínas que rodean y limitan la superficie micelar, una repulsión electrostática que evita la agregación entre las distintas micelas. En la **Figura 4a**, la matriz de κ -caseínas posee un grosor de gran alcance que cumple, a estos niveles de pH, las características de un modelo coloide de esfera (Horne, 2008). Por último, la estructura de las micelas apenas es alterada debido a que el CCP prácticamente no se disuelve a niveles de pH superiores a 6,0 (Lucey, 2017).
- **A pH 6,0-5,0:** El descenso del pH origina una reducción en la carga negativa neta de las micelas. Como consecuencia, a medida que el medio se acidifica, queda reducida la repulsión electrostática inter-micelar y la estabilidad estérica de las micelas también disminuye. En estas condiciones de pH, la misma capa superficial sigue impidiendo el acercamiento de las micelas, pero, a medida que el pH disminuye, las κ -caseínas cargadas que rodean la superficie micelar pueden llegar a colapsar. Internamente, cuando el pH se acerca a un valor de 5,0 aproximadamente, el CCP se disuelve completamente (**Figura 4b**) y queda debilitada la estructura general de la micela (Horne, 2008; Lucey, 2017).

- **A pH inferior a 5,0:** A causa de la disolución del CCP y, a medida que se alcanza el punto isoelectrico de las caseínas (pH=4,6), disminuye la carga negativa neta de las micelas, aumentan las interacciones entre las cargas positivas y negativas y, a su vez, se intensifican las fuerzas de Vann der Waals. De esta manera, la reducción de la repulsión electrostática permite la fortificación de las reacciones hidrofóbicas en el interior de la micela. En consecuencia, el grosor de la superficie de la micela formada por las κ -caseínas (**Figura 4c**) disminuye y comienza la agregación (Horne, 1998, 1999; Lucey, 2017).

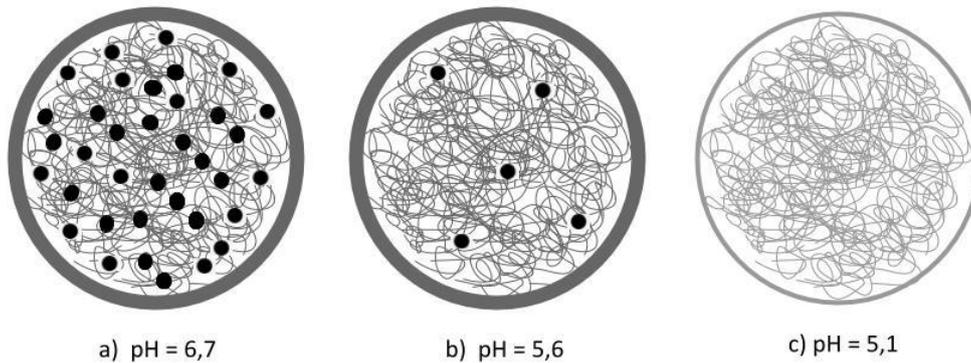


Figura 4. Estructura de las micelas de caseína ante diferentes valores de pH. Las cadenas representan las proteínas, que están unidas mediante una interacción hidrofóbica (puntos de cruce). Los puntos negros interiores representan el CCP, mientras que el círculo negro exterior representa el rango de repulsión entre las micelas. Adaptada de Horne (2008).

Por otro lado, las proteínas séricas desnaturizadas a través del tratamiento térmico de la leche también contribuyen a la formación del gel actuando como unión en la red. Las proteínas séricas en su estado nativo son bastante estables y no interactúan con las moléculas grasas, los iones de calcio o las caseínas. Sin embargo, cuando estas son sometidas a una temperatura superior a los 80°C, sus cadenas peptídicas se despliegan desnaturizándose de forma irreversible y esto les permite interactuar con otras moléculas formando enlaces sulfuro (Kilara & Chandan, 2006; Tamime & Robinson, 2007b).

Dependiendo del pH del entorno y de la proximidad de las moléculas disponibles, las proteínas séricas pueden formar enlaces con otras proteínas séricas, con las caseínas (κ -caseína y α -caseína) o bien, pueden incorporarse a la membrana de los glóbulos grasos. No obstante, ante un medio con valores de pH inferiores a 6,5, las proteínas séricas poseen tendencia a asociarse con las micelas de caseína (Corredig & Dalgleish, 1996; Tamime & Robinson, 2007b).

Esta asociación da lugar a la formación de complejos (Corredig & Dalgleish, 1996). Sin embargo, no todas las proteínas séricas forman complejos con las micelas de caseína, sino que parte ellas quedan en la fracción acuosa dando lugar a la formación de complejos solubles formados principalmente por κ -caseínas y proteínas séricas en una relación 1:3 (Guyomarc'h et al., 2003).

Todos los fenómenos anteriores son de suma importancia durante la fabricación del yogur. La formación de la cuajada de yogur se basa en la precipitación isoelectrica de la caseína. Sin embargo, pueden intervenir las proteínas séricas desnaturizadas facilitando la formación de enlaces con las micelas de caseína. De esta manera, las proteínas séricas se incorporan a la

matriz del gel reforzándolo y dando lugar a un yogur con mejores características (Anema, 2008; Sfakianakis & Tzia, 2014).

1.5. Métodos de normalización

La fortificación de la leche en la etapa de normalización es esencial ya que permite reforzar las propiedades funcionales y nutricionales del producto final (Karam et al., 2013). Este proceso previene defectos de textura o sinéresis permitiendo alcanzar el nivel mínimo de extracto seco magro (8,5% (m/m)) establecido por la legislación.

El contenido proteínico del yogur puede incrementarse tras la fermentación del producto. El aumento del contenido proteínico de los yogures tras la fermentación se realizaba tradicionalmente colando el yogur en una bolsa de tela. Sin embargo, uno de los inconvenientes de la concentración del yogur tras la fermentación es la gran cantidad de suero que se retira en el proceso de separación y los consecuentes desafíos económicos y ambientales que ello conlleva (Pouliot, 2008; Tamime & Robinson, 2007b).

No obstante, la industria láctea cuenta en la actualidad con métodos de normalización previamente a la fermentación. Entre ellas se incluyen las técnicas que permiten la eliminación del agua (por evaporación o mediante la separación a través de técnicas de membrana), el incremento del nivel de los sólidos totales mediante la concentración por adición de ingredientes lácteos o la adición de estabilizantes (Tamime & Robinson, 2007b).

1.5.1. Adición de estabilizantes

La utilización de estabilizantes en la explotación del yogur tiene como objetivo mejorar la consistencia, aumentar la viscosidad del producto y reducir el fenómeno de sinéresis (Chandan, 2017; Soukoulis et al., 2007; Yousefi & Jafari, 2019).

La gelatina es uno de los estabilizantes más empleados y puede ser añadida a los yogures con fruta, zumos y/u otros alimentos y a los aromatizados como máximo en una cantidad de 3 g/kg de yogur. A su vez, según establece el Real Decreto 271/2014, cuando además de la gelatina se empleen otros estabilizantes, la cantidad máxima total es de 3 g/kg de yogur. En el caso de los yogures aromatizados, la adición a la leche de concentrados de frutas o jarabes con aromas tiende a disminuir la consistencia del producto, por lo que se suelen emplear estabilizantes como la gelatina para mejorar los atributos del yogur (Salvador, 1998).

La gelatina es un biopolímero obtenido a partir de la desnaturalización térmica o de la hidrólisis parcial del colágeno y, principalmente, es fabricada a partir de subproductos del procesamiento de animales (Benjakul & Kittiphattanabawon, 2019). Este biopolímero ha sido ampliamente utilizado como estabilizante en la producción del yogur debido a sus efectos positivos sobre el desarrollo de la textura, palatabilidad y apariencia del producto (Shah, 2003).

Las propiedades funcionales de las gelatinas incluyen su compatibilidad con las proteínas lácteas, la capacidad de formar geles, emulsionar y retener agua en el yogur. Además, la gelatina es responsable de la modificación de la microestructura de los geles (**Figura 5**) haciéndolos más densos y ramificados con un interior homogéneo y esponjoso que presenta pocas burbujas de aire. De esta manera, la gelatina proporciona una mayor resistencia mecánica debido a su interacción con las proteínas lácteas (Salvador, 1998).

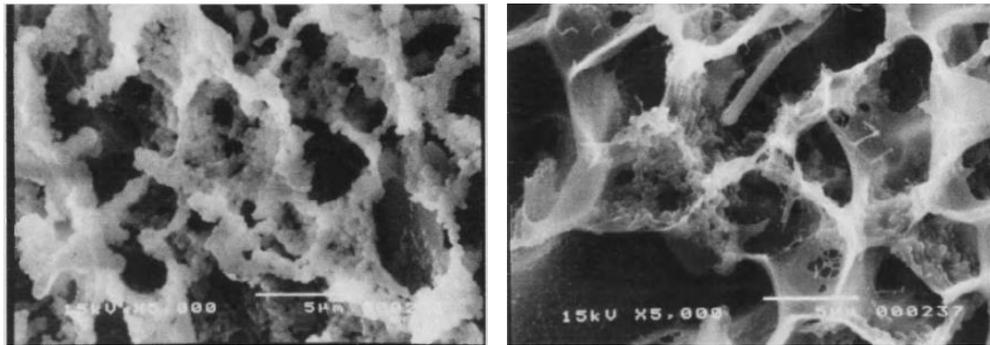


Figura 5. Estructura microscópica de yogur sin gelatina (*izqda.*) y con 1,5% de gelatina (*dcha.*) (Salvador, 1998).

Además, la adición de gelatina se manifiesta en una mejora en la palatabilidad del yogur debido a que esta posee capacidad de fusión a la temperatura de la boca, lo que aporta una impresión similar a la grasa cuando se consume el producto (Salvador, 1998).

Por otro lado, la gelatina contribuye a prolongar la vida útil de los yogures proporcionando una matriz del gel más fuerte con una menor afinidad a la sinéresis durante los procesos de manipulación y almacenamiento. Este efecto ha sido atribuido al desarrollo de redes tridimensionales, que preservan la fase acuosa de una manera eficaz y reducen la separación sérica del producto (Pang et al., 2017).

1.5.2. Adición de ingredientes lácteos

El aumento de la materia seca puede realizarse a través de la adición de ingredientes lácteos, principalmente en forma de polvo, que permiten concentrar la materia prima (Karam et al., 2013).

Por lo que respecta a las propiedades funcionales, los polvos empleados en la producción de yogur deben contar con ciertos atributos como mejorar la viscosidad, la capacidad gelificante y la capacidad de unión del agua (Augustin et al., 2003). Asimismo, el bajo contenido en humedad de los polvos inhibe el crecimiento microbiano y extiende la vida útil del producto durante el almacenamiento.

La tecnología de membranas es una técnica no térmica que permite la separación de los componentes de la leche minimizando el efecto adverso que tiene el incremento de la temperatura sobre dichos componentes. Esta práctica permite obtener ingredientes con alto contenido proteico que son añadidos a la leche previamente a su fermentación (Kumar et al., 2013). A continuación, los productos son sometidos a una evaporación y posteriormente son deshidratados por atomización, siendo este un proceso que permite la eliminación de la fracción acuosa de la materia prima mediante el empleo de aire caliente y la consecuente obtención de partículas en forma de polvo. El objetivo de esta práctica es estabilizar la leche para su posterior almacenamiento y empleo en la etapa de normalización (Schuck, 2008).

A partir de la leche pueden obtenerse una amplia gama de polvos lácteos. Entre ellos se encuentra la leche en polvo entera o *whole milk powder* (WMP), la leche en polvo semidesnatada o *skim milk powder* (SMP), la nata y el suero en polvo. Asimismo, las tecnologías de separación a través de membrana, en combinación con el secado por atomización, posibilitan la obtención de polvos de concentrados de proteína láctea o *milk protein concentrate* (MPC),

concentrados de caseína micelar o *micellar casein concentrate* (MCC) y, finalmente, concentrados de proteínas del suero o *whey protein concentrate* (WPC). El proceso de obtención de los diversos ingredientes lácteos queda reflejado en la **Figura 6**.

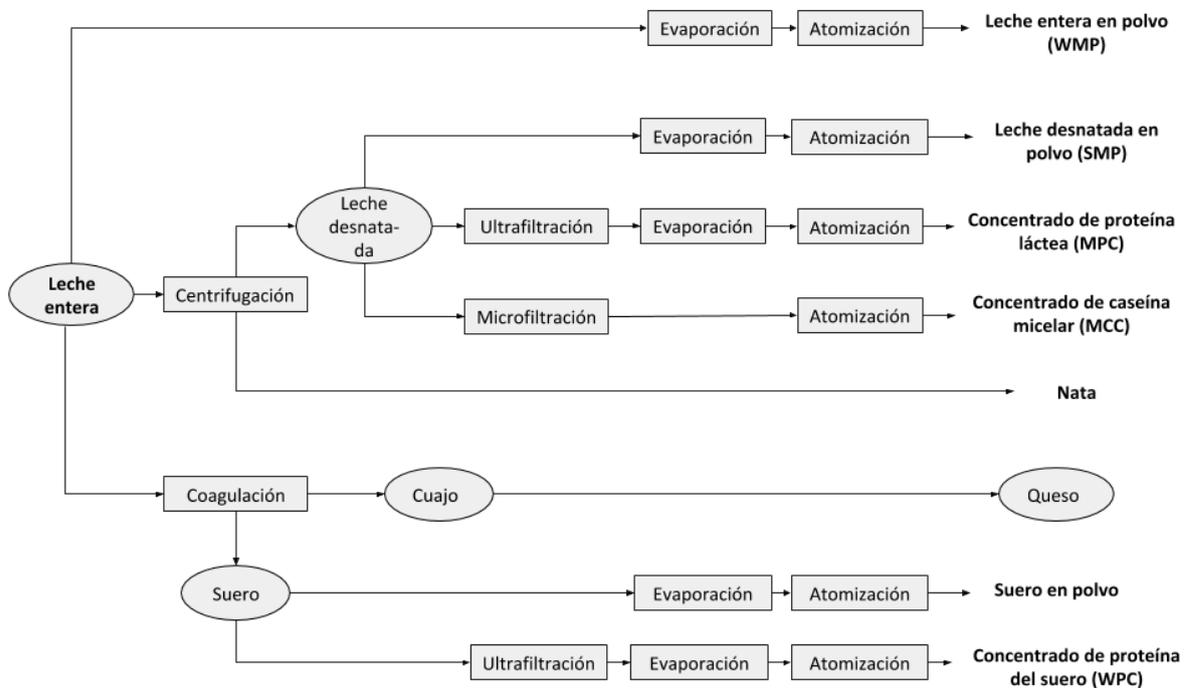


Figura 6. Diagrama de obtención de ingredientes lácteos. Adaptada de Augustin & Margetts (2003); Nunes & Tavares (2019).

La leche desnatada en polvo ha sido ampliamente utilizada para obtener yogures con un nivel elevado de extracto seco magro. No obstante, los diversos ingredientes lácteos pueden ser añadidos a la leche (individualmente o en combinación) con el objetivo de reemplazar o potenciar los beneficios de la leche desnatada en polvo en la producción del yogur (Andoyo et al., 2014; Chua et al., 2017; Mistry & Hassan, 1992; Zhao et al., 2016).

La adición de nata en polvo, leche en polvo, suero en polvo y proteínas de la leche puede efectuarse en una cantidad máxima del 5% (m/m) en los yogures naturales y en un 10% (m/m) en otro tipo de yogures según queda recogido en el Real Decreto 271/2014.

- **Nata**

La nata es el producto lácteo rico en materia grasa que, separado de la leche, adquiere la forma de una emulsión del tipo grasa en agua (O, de 12 de julio de 1983).

La nata láctea puede obtenerse a partir de la leche mediante un proceso natural, mediante métodos gravitatorios o bien mediante un proceso de separación por centrifugación. Tradicionalmente, la formación de la nata de manera natural en la leche era una forma habitual de recoger la grasa y de ajustar el contenido lipídico de la leche hasta los niveles requeridos. Bajo la influencia de la gravedad, los glóbulos grasos de la leche ascienden a la superficie debido a que poseen una menor densidad que el plasma lácteo (Mulder & Walstra, 1974).

Los factores que afectan a la velocidad de ascenso de los glóbulos grasos bajo la fuerza de la gravedad son la temperatura de la leche, el tamaño de los glóbulos y la diferencia de densidad.

Sin embargo, la velocidad de separación de los glóbulos grasos en la centrifugación únicamente depende de la fuerza centrífuga aplicada (aceleración 4000 veces la de la gravedad), por lo que normalmente la fracción grasa de la leche es obtenida mediante la aplicación de un campo centrífugo que permite crear y recoger una capa concentrada en la zona superior de la muestra (Mulder & Walstra, 1974; Singh & Ye, 2008).

La nata resultante generalmente posee un 57,8% (m/m) de agua, un 36,8% (m/m) de lípidos, un 2,2% (m/m) de proteínas y un 3,2% (m/m) de carbohidratos en forma de lactosa (Chandan, 2017).

La nata puede emplearse como ingrediente en la fabricación de los yogures griegos añadiéndose a la leche empleada como materia prima (Schkoda et al., 2001). La adición de nata a la leche proporciona atributos organolépticos al yogur como una textura cremosa y una sensación lipídica en boca (Frøst & Janhøj, 2007; Zambrano, 2008). Además, ensayos realizados por Zambrano (2008) demuestran que el empleo de este ingrediente contribuye a reducir el tiempo de fermentación, potencia el rendimiento de producción y disminuye el drenaje del suero en el producto final.

- **Leche en polvo**

La leche pasteurizada es inicialmente separada en leche desnatada y en crema antes de ser sometida a un proceso de concentración por evaporación. En la evaporación, la leche es concentrada a baja temperatura (70°C) en condiciones de vacío hasta alcanzar un 45-52% (m/m) de sólidos. La leche en polvo entera puede ser obtenida bien a partir de leche semidesnatada a la que una porción de nata es añadida para obtener un contenido graso del 25-30% (m/m) o bien puede ser obtenida directamente a partir de la leche entera (Tamime & Robinson, 2007b). Tras la evaporación, se realiza la atomización para transformar la materia en polvo.

La **Tabla 6** muestra la composición de la leche en polvo desnatada y entera. Debido a su composición, la leche en polvo desnatada (SMP) es un ingrediente ampliamente utilizado en la normalización de la leche con el objetivo de aumentar el contenido en proteínas lácteas del producto y, a la vez, mantener constante el nivel de grasa de la leche. Por otro lado, la leche en polvo entera (WMP) puede emplearse como fuente de grasa y de sólidos no grasos. Sin embargo, la elevada proporción de grasa (25-28%) limita su empleo debido a los cambios oxidativos y el consecuente deterioro sensorial que proporciona al producto (Kneifel, 2003).

Tabla 6. Composición de la leche en polvo (% m/m). Adaptada de Augustin et al. (2003).

Componente (% m/m)	Leche en polvo desnatada (SMP)	Leche en polvo entera (WMP)
Humedad	3,0-5,0	2,0-4,0
Grasa	0,7-1,3	25,0-28,0
Proteína	35,0-37,0	25,0-27,0
Lactosa	49,0-52,0	36,0-38,0
Minerales	7,5-8,0	6,0-7,0

La adición de SMP en la fortificación de la leche ha sido la práctica más común en la industria del yogur, considerándose esta un proceso estándar. La adición del 3-4% de SMP es considerada la apropiada para mejorar la calidad de textura en el producto debido a que eleva el nivel de proteína lo suficiente para que, con el tratamiento térmico adecuado, aumente el nivel de agua ligada y se obtengan yogures con una mayor firmeza y consistencia del coágulo en comparación a los yogures sin previa fortificación (Chandan, 2017; Tamime & Robinson, 2007b).

La leche desnatada en polvo permite obtener yogures con una mayor viscosidad (alcanzando un incremento del 70%) y una mayor fuerza del gel en comparación con yogures sin fortificar (Patel, 2011; Peng et al., 2009). Además, el enriquecimiento de la leche con SMP da lugar a yogures con baja granulosis y una menor sinéresis (Remeuf et al., 2003).

Por lo que respecta a la estructura, los yogures fortificados con SMP presentan una organización irregular de la red del gel con micelas de caseína unidas y pequeños poros de tamaño heterogéneo (Guzmán-González et al., 1999; Modler & Kalab, 1983; Remeuf et al., 2003).

A nivel sensorial, los yogures preparados a partir de SMP han sido caracterizados por poseer un marcado sabor a fermentado. Por ello, el potencial desarrollo de una excesiva acidez en el yogur como consecuencia del alto contenido de lactosa es el factor limitante para su uso en la producción de yogures (Tamime & Robinson, 2007b).

- **Suero en polvo**

El suero lácteo es un subproducto generado durante la fabricación del queso. Durante este proceso, la fracción lipídica y las caseínas forman el cuajo, mientras que las proteínas solubles, la lactosa y los minerales son extraídos en forma de suero (Augustin & Margetts, 2003; Wit, 2001).

El suero producido en las queserías puede ser reaprovechado y convertido en polvo a través de la concentración por evaporación y el posterior secado por atomización (Wit, 2001). La combinación de estos procesos permite obtener un producto estable con un bajo contenido en humedad interesante para su uso como ingrediente en la industria láctea debido a las diferentes propiedades funcionales que este posee, entre las que destacan la emulsificación, la capacidad de retención de agua, el aumento de la viscosidad y la gelificación (Hall & Iglesias, 1997).

La composición química del suero en polvo (**Tabla 7**) depende principalmente de las condiciones de procesamiento en la elaboración del queso. Si bien, el principal componente del suero en polvo es la lactosa. Además, están presentes cantidades elevadas de minerales entre los que destacan el calcio y el potasio (Augustin & Margetts, 2003; Zadow, 2003a).

Tabla 7. Composición del suero en polvo (% m/m). Adaptada de Augustin & Margetts (2003); Zadow (2003a).

Componente (%m/m)	Suero en polvo
Humedad	3,5-5,0
Grasa	1,0-1,5
Proteína	11,0-14,5
Lactosa	63,0-75,0
Minerales	9,8-12,3

El empleo de proteínas de suero en la producción de yogur proporciona una mejor consistencia, textura y cremosidad al producto. El tratamiento térmico de la leche enriquecida con proteínas del suero da lugar a un aumento del entrecruzamiento de la red del gel, lo que explica que el yogur obtenido posea una mayor viscosidad y capacidad de retención de agua (Remeuf et al., 2003). No obstante, este ingrediente debe ser utilizado en la fortificación de la leche en concentraciones de 1-2%, ya que niveles más elevados pueden llegar a producir un sabor indeseado a suero lácteo (González-Martínez et al., 2002).

Por otro lado, una práctica habitualmente realizada en la fortificación de la leche es la combinación del suero en polvo con leche desnatada en polvo. González-Martínez et al. (2002) afirmaron que los yogures resultantes de la combinación de ambos ingredientes poseen una cantidad de acetaldehído y una viscosidad elevada, niveles reducidos de sinéresis y atributos sensoriales apropiados.

- **Concentrados proteicos**

El contenido proteico de un yogur puede incrementarse previamente al proceso fermentativo mediante la adición de concentrados de proteína láctea (Mistry & Hassan, 1992), concentrados de proteína de suero (Lee & Lucey, 2010; Remeuf et al., 2003) o concentrados de caseína micelar (Bong & Moraru, 2014) obtenidos a través de técnicas de filtración por membrana que fraccionan los componentes de la leche en base a su tamaño (Brans et al., 2004).

La adición de concentrados proteicos a la leche es una práctica realizada principalmente en la elaboración de los yogures con alto contenido proteico (Codex Alimentarius, 2011) para aumentar los niveles de proteína hasta un mínimo del 5,6% (m/m). Debido a la potencial funcionalidad de estos ingredientes proteicos, en los siguientes apartados se desarrollarán tanto los métodos de obtención como su empleo y sus efectos sobre las propiedades del yogur.

2. Objetivos

El objetivo general de este Trabajo Fin de Grado es realizar una revisión bibliográfica sobre la utilización de concentrados proteicos lácteos en la elaboración del yogur.

Los objetivos específicos del trabajo son:

- Definir y clasificar los concentrados proteicos utilizados en la producción del yogur.
- Estudiar el método de producción de los concentrados proteicos.
- Determinar los efectos de los concentrados proteicos sobre las propiedades físico-químicas y sensoriales del yogur.
- Comparar los efectos de la sustitución de los ingredientes tradicionales por los concentrados proteicos sobre las propiedades del yogur.

3. Metodología

La metodología empleada para alcanzar los objetivos establecidos en el presente Trabajo Fin de Grado consiste en la realización de una investigación bibliográfica contrastando los diferentes trabajos y revisiones realizados sobre la elaboración de los concentrados proteicos, así como los efectos de su utilización en el yogur.

Para ello, se han empleado distintas herramientas de búsqueda y recursos de información:

- Bases de datos de investigación científica (ScienceDirect, Web of Science, AGRIS...).
- Enciclopedias electrónicas.
- Libros electrónicos.
- Colecciones de Trabajos Fin de Estudios.

4. Resultados y discusión

4.1. Producción de concentrados proteicos

Los concentrados proteicos son ingredientes obtenidos a través de la filtración por membrana. La tecnología de membrana permite, a través de una membrana semipermeable, concentrar o seccionar un líquido en dos líquidos de diferente composición (Brans et al., 2004; Kumar et al., 2013).

Las principales técnicas de filtración empleadas en la industria láctea son la microfiltración (MF), ultrafiltración (UF), nanofiltración (NF) y ósmosis inversa (OI); sus características quedan reflejadas en la **Tabla 8**. No obstante, la MF y la UF son las técnicas más aplicadas en la obtención de concentrados proteicos debido a que permiten retener y concentrar micelas de caseína (MF) o proteínas solubles en el caso de la UF. Además, la diafiltración (DF) es un tipo de UF empleada con el objetivo de diluir el retenido en agua y obtener un compuesto más concentrado (Brans et al., 2004; Kumar et al., 2013).

Tabla 8. Características de las técnicas de filtración de la leche (Pouliot, 2008).

Técnica de filtración	Tamaño del poro (nm)	Presión (MPa)	Partículas retenidas	Ingrediente lácteo comercial
MF	>100	0,01-0,20	Bacterias Glóbulos grasos Micelas de caseína	MCC Proteínas del suero nativas (NWP)
UF	1-500	0,1-1,0	Proteínas solubles	MPC, WPC, WPI
NF	0,1-1,0	1,5-3,0	Sales (cationes divalentes)	Proteína del suero hidrolizada (WPH)
OI	<0,1	3,0-5,0	Sales (cationes monovalentes) Lactosa	Suero sin lactosa

Los concentrados proteicos son generalmente comercializados en forma de polvo con el objetivo de facilitar su manipulación, transporte y posterior almacenamiento. No obstante, la vida útil de estos ingredientes lácteos depende tanto de su composición como de las condiciones de almacenamiento, principalmente tiempo y temperatura (Anema et al., 2006; Fang et al., 2011; Norwood et al., 2019).

Por otro lado, es de suma importancia que las propiedades de los concentrados proteicos se mantengan durante los procesos de deshidratación, almacenamiento y posterior reconstitución (Singh, 2016).

Debido a que los polvos lácteos deben quedar disueltos en la etapa de normalización, la solubilidad y la reconstitución son consideradas propiedades críticas (Agarwal et al., 2015; Sikand et al., 2011). Los MPC se rehidratan en diferentes etapas, en primer lugar ocurre la

humidificación y el hinchado del polvo seguido de una lenta dispersión hasta alcanzar un fluido homogéneo (Gaiani et al., 2006, 2007). En general, el tiempo de rehidratación y el índice de pardeamiento de los polvos aumenta a medida que la temperatura y el tiempo de almacenamiento son incrementados; mientras que, de manera inversa, la solubilidad de los polvos disminuye ante las mismas condiciones (Nasser, Moreau, et al., 2017).

Por otro lado, durante el almacenamiento puede acontecer la migración lipídica (Gaiani et al., 2010) y el entrecruzamiento de las caseínas (α - y β -caseína) en los ingredientes que contienen caseína adicional como los MPC o MCC (Mimouni et al., 2010) que inducen cambios en la dinámica de rehidratación de los polvos (Nasser, Jeantet, et al., 2017; Schokker et al., 2011; Sikand et al., 2013). Según Schokker et al. (2011), el aumento en la concentración de las proteínas se traduce en una disminución de la distancia entre las micelas de caseína promoviendo su agregación (Sikand et al., 2013).

Por lo que respecta a la composición química de los concentrados proteicos, la lactosa y los minerales son componentes que favorecen la modificación de las propiedades funcionales. Generalmente, los polvos con un menor contenido proteico poseen una funcionalidad más limitada (Norwood et al., 2019; Zadow, 2003b).

4.1.1. Concentrados y aislados de proteína de leche (MPC, MPI)

Los *milk protein concentrate* (MPC) son complejos de proteínas lácteas obtenidos a través de la ultrafiltración de la leche (**Figura 7**). Los concentrados y aislados de proteína de la leche poseen caseínas y proteínas séricas en la misma proporción que la leche, encontrándose estas en un estado similar a su estructura nativa (Martin et al., 2010).

Las membranas empleadas están diseñadas para que los componentes de bajo peso molecular como la lactosa, los minerales y el agua consigan atravesarlas, mientras que las proteínas lácteas y los residuos grasos queden en la parte retenida (Bastian et al., 1991).

A continuación, el retenido puede ser sometido a una diafiltración que permite aumentar el contenido proteico hasta niveles superiores al 90% dando lugar al aislado de proteína de leche o MPI (*milk protein isolate*). Tras esto, se realiza una evaporación y, finalmente, una atomización (Chamberland et al., 2020; Mistry & Hassan, 1991).

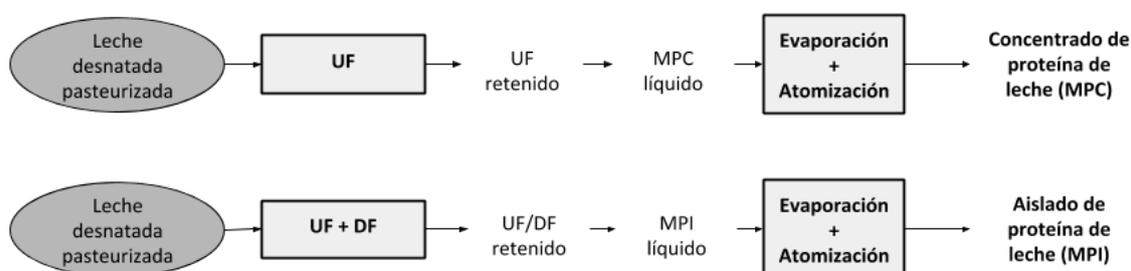


Figura 7. Diagrama de obtención de MPC y MPI. Adaptada de Bastian et al. (1991); Chamberland et al. (2020).

Los polvos de MPC han sido utilizados en la explotación de yogures con alto contenido proteico debido a que permiten incrementar los niveles de proteína sin aumentar el contenido de lactosa. Además, estos pueden emplearse como sustitutos de la leche desnatada en polvo. No obstante, el mayor contenido proteínico de los polvos de MPC (35-85%) en comparación con el contenido proteínico de SMP (35-37%), hace que se requieran menores cantidades del primero para el enriquecimiento de la leche (Patel, 2011).

Sikand et al. (2011) clasificaron los polvos de MPC en base a su contenido proteínico sobre el extracto seco como: a) polvo de bajo contenido proteínico ($\leq 40\%$ de proteínas); b) polvo de contenido proteínico medio (60-70% de proteínas) o c) polvo de alto contenido proteínico (80-90% de proteínas). Sin embargo, según Agarwal et al. (2015), los productos más comunes son los MPC-42, MPC-70, MPC-80 y MPC-85.

Tal y como puede observarse en la **Tabla 9**, cuanto mayor es el nivel de purificación de la proteína obtenido a través de la UF y la DF, menores son los niveles de lactosa en el producto final.

Tabla 9. Composición (%) de los principales MPC (Agarwal et al., 2015; Meena et al., 2017).

Componente (%)	MPC-35	MPC-42	MPC-56	MPC-70	MPC-80	MPC-85
Humedad	3,5	-	3,8	4,9	4,7	5,0
Proteína	35	42	56	70	80	85
Lactosa	51	46	31	16	6	4
Cenizas	7	6	7	7	7	7
Grasa	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

4.1.2. Concentrados y aislados de proteína del suero (WPC, WPI)

La separación a través de UF seguida de la evaporación y atomización son los métodos generalmente empleados en la industria láctea para producir concentrados de proteínas del suero (**Figura 8**) a partir del suero generado en las queserías (Zadow, 2003a). Según Zadow (2003a) y Wit (2001), el proceso de UF permite retener principalmente las proteínas del suero y los residuos grasos. De esta manera, la fracción sólida del suero retenido contiene una mayor concentración de proteínas y un menor contenido en lactosa en comparación con el suero original.

No obstante, pueden obtenerse polvos de WPC nativos (NWPC) empleando leche cruda como materia prima (**Figura 8**). Para ello, la leche es sometida a una microfiltración con el objetivo de retirar la grasa, las células somáticas, las bacterias y sus respectivas esporas. El permeado obtenido en este proceso se somete a una segunda MF, en la que se emplean membranas con un diámetro de poro menor que permiten separar las proteínas séricas. A continuación, el permeado resultante es sometido a una UF y, finalmente, a una atomización (Heino et al., 2007).

Los concentrados de proteínas del suero habitualmente son obtenidos a partir de suero del queso y no a partir de la leche cruda. Por ello, los efectos de la adición de los polvos de NWPC sobre las propiedades del yogur a penas han sido caracterizados (Heino et al., 2007; Jørgensen et al., 2015).

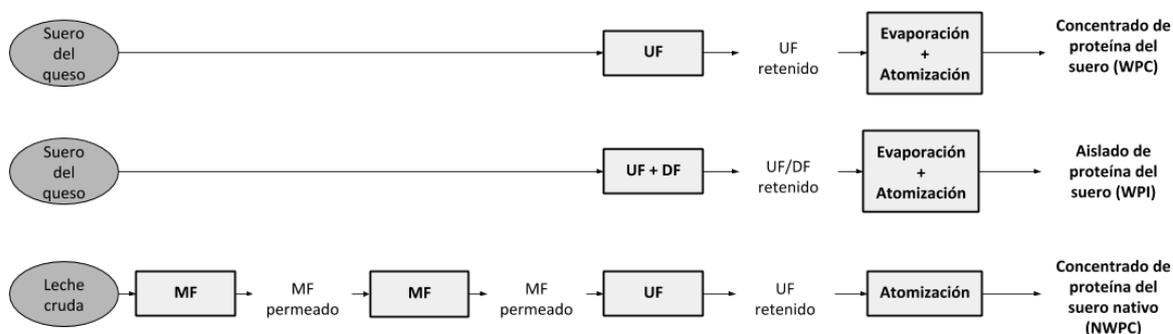


Figura 8. Diagrama de obtención de WPC, WPI y NWPC. Adaptada de Heino et al. (2007).

La **Tabla 10** muestra la composición de los principales polvos de WPC existentes en el mercado. El proceso de UF permite obtener WPC con diferentes concentraciones de proteínas que oscilan desde el 35% (WPC-35) hasta el 80% (WPC-80) sobre el total de sólidos del producto (Zadow, 2003a). Por otro lado, el aislado de proteína del suero (WPI) puede llegar a contener un 90% de proteína (Wit, 2001).

El WPC-35 es generalmente considerado como un análogo al SMP y, en numerosas ocasiones, se utiliza como un sustituto de este. Sin embargo, se debe tener en cuenta que, a pesar de que ambos poseen un contenido proteínico similar, la fracción proteica del SMP corresponde principalmente a las caseínas, mientras que el WPC contiene principalmente proteínas del suero (Heino et al., 2007; Zadow, 2003b, 2003a). En general, el incremento de la concentración de las proteínas mediante las técnicas de separación por membrana se traduce en una disminución en los niveles de lactosa.

Tabla 10. Composición (%) de los principales WPC (Zadow, 2003a).

Componente (%)	WPC-35	WPC-50	WPC-65	WPC-80
Humedad	4,6	4,3	4,2	4,0
Proteínas	36,2	52,1	63,0	81,0
Lactosa	46,5	30,9	21,1	3,5
Cenizas	7,8	6,4	3,9	3,1
Grasa	2,1	3,7	5,6	7,2

4.1.3. Concentrados de caseína micelar (MCC, LMCC)

El proceso de microfiltración de la leche desnatada permite retener y concentrar las micelas de caseína, mientras que la fase sérica, la lactosa y los minerales de la leche atraviesan la membrana en forma de permeado (Hurt & Barbano, 2015).

Comúnmente, este proceso permite retirar un 60-95% de proteínas séricas, lo que posibilita la explotación del retenido y la consecuente obtención de una amplia gama de productos de MCC con diferentes concentraciones proteicas (Beckman et al., 2010). Además, el proceso de MF puede ser combinado con otras técnicas de separación por membrana con el objetivo de obtener una mayor purificación del producto final (Amelia & Barbano, 2013; Hurt & Barbano, 2015).

El retenido obtenido a través la MF de la leche (**Figura 9**) se denomina concentrado líquido de caseína micelar (LMCC) aunque hoy en día existe en el mercado el producto atomizado conocido como concentrado de caseína micelar (MCC).

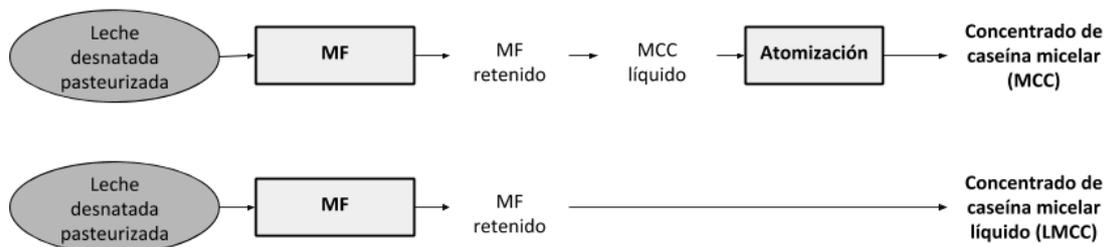


Figura 9. Diagrama de obtención de MCC y LMCC. Adaptada de Amelia & Barbano (2013); Hurt & Barbano (2015).

La composición de los MCC depende principalmente de las condiciones de los procesos de filtración por membrana (Hurt & Barbano, 2015). Asimismo, estos ingredientes lácteos se caracterizan por su alta concentración de micelas de caseína y por estar prácticamente desprovistos de proteínas séricas (Jørgensen et al., 2019).

Amelia & Barbano (2013) abordaron los problemas de solubilidad de los polvos de MCC y los costes de la atomización produciendo concentrados de caseína micelar líquida (LMCC) evitando así la necesidad de realizar operaciones de reconstitución especiales. Los componentes de este ingrediente se encuentran más cerca de su estado nativo en comparación con obtenidos mediante la atomización y, además, poseen una mayor calidad sensorial (Amelia & Barbano, 2013; Hurt & Barbano, 2015; Sauer & Moraru, 2012).

El ahorro de los costes de operación de las unidades de secado, el aumento en el rendimiento de las proteínas, la prevención de problemas relacionados con los polvos mal hidratados y el sabor de los retenidos de proteína líquida ofrecen una oportunidad a la industria del yogur para sustituir los concentrados en polvo por concentrados líquidos (Augustin & Udabage, 2007; Carter et al., 2018). Además, este ingrediente podría ser aprovechado en sistemas de alimentos líquidos donde se requiere una alta solubilidad.

4.2. Utilización de concentrados proteicos en la elaboración de yogur

Suprimir el paso de eliminación del suero tras la fermentación es un desafío que las industrias lácteas han tenido que abordar planteando nuevos métodos para reducir la generación del suero desde el punto de origen. La concentración de la leche antes de la fermentación es una técnica que permite alcanzar el nivel de sólidos y de proteínas deseado reduciendo el drenaje del suero en el producto final (Uduwerella et al., 2018).

Asimismo, el contenido proteico del yogur puede ser incrementado previamente al proceso fermentativo mediante la adición de concentrados de proteína láctea como el MPC, WPC o MCC obtenidos a través de técnicas de filtración por membrana (Bong & Moraru, 2014; Guzmán-González et al., 1999; Mistry & Hassan, 1992; Modler et al., 1983). A nivel tecnológico, el incremento del nivel de proteínas afecta a la textura del producto final, modificando la sinéresis y la firmeza del yogur. La obtención de una buena estructura del yogur puede explicarse por la formación de los complejos de proteínas de suero desnaturalizadas con las micelas de caseína (Mahomud et al., 2017).

Los concentrados proteicos han sido generalmente utilizados en la etapa de normalización durante la elaboración de yogures firmes (8,5% sólidos totales). Sin embargo, en los últimos años se ha extendido su empleo en la producción de yogures con alto contenido proteico.

Los ingredientes proteicos lácteos han adquirido popularidad como base en la producción de yogures debido a su potencial versatilidad y debido a las propiedades nutricionales que estos poseen gracias a los beneficios que las proteínas lácteas ejercen sobre la salud (Mellentin, 2013; Tunick, 2008). A su vez, los yogures con alto contenido proteico resultan especialmente de interés en dietas para bebés, ancianos o deportistas debido a la capacidad de las proteínas séricas para aumentar los aminoácidos plasmáticos y fortalecer el desarrollo de la musculatura (Garlick, 2005). También, la ingesta de proteínas proporciona un efecto saciante superior en comparación a la ingesta de lípidos o carbohidratos, por lo que estos productos son recomendables en dietas hipocalóricas (Benelam, 2009).

Actualmente, dos marcas neozelandesas productoras de yogur (Anchor y De Winkel), a través de la compañía *Fonterra Co-operative Group*, han lanzado en el mercado una gama de yogures con un contenido proteico con 8,2% y 5,6% de proteína respectivamente. Los ingredientes que contienen estos yogures son leche desnatada, nata, sólidos lácteos y bacterias ácido-lácticas. Asimismo, la gama de productos Anchor Protein⁺ es divulgada como un alimento que ayuda a controlar el consumo de proteínas diario, por lo que el reclamo hacia este tipo de productos podría ser explotado por los productores de yogur.

Con todo lo comentado anteriormente, la tecnología de membrana proporciona a la industria láctea nuevas alternativas a las operaciones de separación convencionales mediante la mejora en la productividad y la calidad del producto, así como la capacidad de limitar el impacto ambiental del proceso. Empleando las técnicas de membrana, los componentes naturales de la leche pueden ser fraccionados y purificados para desarrollar productos innovadores con un gran potencial comercial. Este es el caso del aislamiento de las proteínas lácteas que, añadidas al yogur, proporcionan una mejora en la calidad del producto final.

4.3. Efectos de los concentrados proteicos en el yogur

El conocimiento de la influencia de los concentrados proteicos en las propiedades físico-químicas y sensoriales de los yogures fortificados tales como la estructura, textura, viscosidad, sinéresis y características organolépticas del producto permiten establecer estrategias en la fabricación de yogures, especialmente en aquellos con un contenido proteico elevado.

La fortificación de la leche con concentrados proteicos afecta a las propiedades físico-químicas de los yogures y, a su vez, la textura de los alimentos influye en las propiedades sensoriales del mismo (Lee & Lucey, 2010; Mistry & Hassan, 1992).

De esta manera, el efecto de reemplazar la leche desnatada en polvo por los polvos de WPC (Delikanli & Ozcan, 2014; Guzmán-González et al., 1999; Jørgensen et al., 2015; Lee & Lucey, 2010; Modler & Kalab, 1983; Penna et al., 1997; Puvanenthiran et al., 2002; Remeuf et al., 2003; Zhao et al., 2016), por los polvos de MPC (Guzmán-González et al., 1999; Modler & Kalab, 1983; Patel, 2011; Soukoulis et al., 2007) o por los polvos de MCC (Arce, 2019; Peng et al., 2009) ha sido estudiado por diversos autores.

4.3.1. Características físico-químicas

La fortificación de la leche con los concentrados proteicos influye en las características físico-químicas del producto final, pero también pueden observarse cambios durante la elaboración del yogur, principalmente en la cinética de fermentación láctica. Las leches enriquecidas con MCC originan una cinética de fermentación más lenta que los yogures fortificados con SMP (Peng et al., 2009), mientras que los ingredientes con proteínas del suero reducen el tiempo fermentativo (Amatayakul et al., 2006; Damin et al., 2009; Lucey et al., 1999; Soukoulis et al., 2007) y, finalmente, los MPC dan lugar a tiempos fermentativos similares en comparación a los yogures elaborados con SMP (Patel, 2011; Soukoulis et al., 2007).

La posible explicación se debe a que, mediante la adición de MCC a la leche, es incrementada la concentración de fosfato de calcio coloidal en el medio, favoreciendo la capacidad de amortiguación del yogur y originando una lenta disminución del pH en torno a 5 debido a la solubilización de este (Peng et al., 2009). Generalmente, el incremento del contenido de sólidos totales a causa de la fortificación de la leche origina un aumento en la capacidad amortiguadora de los yogures, induciendo a las bacterias ácido-lácticas a producir mayores cantidades de ácido láctico hasta alcanzar un pH de 4,6 (Lee & Lucey, 2010).

Otros autores lo justifican por un aumento del nitrógeno no protéico en la leche, tanto en la utilización de MCC (Bong & Moraru, 2014) como de WPC (Guzmán-González et al., 1999). Este efecto es atribuido a que, durante la fermentación, los péptidos de la fracción del nitrógeno no protéico estimulan el crecimiento de *S. thermophilus* y, consecuentemente, el grado de conversión de lactosa a ácido láctico es incrementado (Dave & Shah, 1998).

Por último, las proteínas del suero, añadidas en la etapa de fortificación y sometidas al tratamiento térmico junto con la leche, permiten reducir el tiempo fermentativo debido a la sensibilidad que estas poseen a la coagulación térmica (Lee & Lucey, 2010; Lucey et al., 1999). Si bien, la adición de un 4% de WPC a la leche es el límite para evitar el riesgo de coagulación por calor (Lee & Lucey, 2010).

Además, la duración del tiempo fermentativo está vinculada a los componentes proteicos de la leche, especialmente a la relación existente entre las caseínas y las proteínas del suero (CN:WP). A medida que esta relación disminuye (4:1 frente a 1:1) y la concentración proteínica se mantiene constante (3%), el tiempo de fermentativo disminuye (Amatayakul et al., 2006). Esta reducción del tiempo puede deberse a que las proteínas del suero poseen una menor capacidad amortiguadora que las caseínas, por lo que la reducción del nivel de CN en el medio origina una menor amortiguación y, por tanto, una aceleración en el proceso fermentativo (Walstra & Jenness, 1984).

4.3.2. Estructura y textura del gel

La formación de enlaces entre las proteínas durante la gelificación origina estructuras microscópicas que modifican la textura, permeabilidad y la apariencia global de los geles (Lee & Lucey, 2010; Mistry & Hassan, 1992).

Por lo que respecta a la estructura de los yogures, Modler & Kalab (1983) realizaron estudios de microscopía electrónica que revelan que los yogures desnatados fortificados con SMP, MPC y WPC poseen microestructuras similares, sin embargo, la densidad de las redes de proteínas difiere entre ellos.

Los yogures preparados con caseína adicional (MPC y SMP) presentan un alto grado de fusión de las micelas de caseína y estas poseen un tamaño menor en comparación con los yogures elaborados a partir de concentrados de proteínas de suero (Modler & Kalab, 1983). La microestructura de los yogures elaborados con MPC se muestra en la **Figura 10a**.

Por otro lado, la fortificación de la leche con WPC origina una microestructura basada principalmente en micelas individuales rodeadas por proteínas del suero desnaturalizadas (**Figura 10b**). Esta concentración de las proteínas del suero alrededor de la superficie micelar se debe a que la β -lactoglobulina, añadida a la leche a través del WPC, reacciona con la κ -caseína de las micelas durante el tratamiento térmico dando lugar a complejos insolubles (Davies et al., 1978).

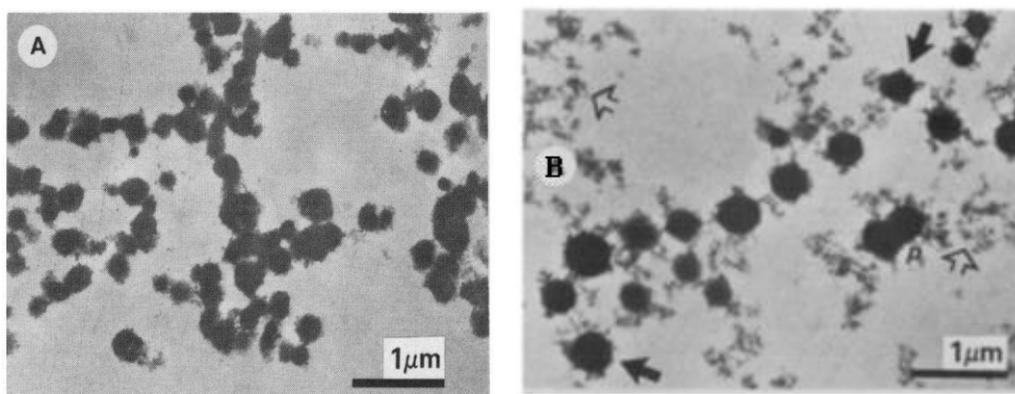


Figura 10. Microscopía electrónica de yogur desnatado fortificado con 1,5% MPC (A) y 1,5% WPC (B) (Modler & Kalab, 1983).

Remeuf et al. (2003) observaron también que el yogur enriquecido con WPC cuenta con una red del gel muy fina con numerosos poros de tamaño pequeño y una unión micelar menos evidente con relación a los geles elaborados con SMP (**Figura 11**).

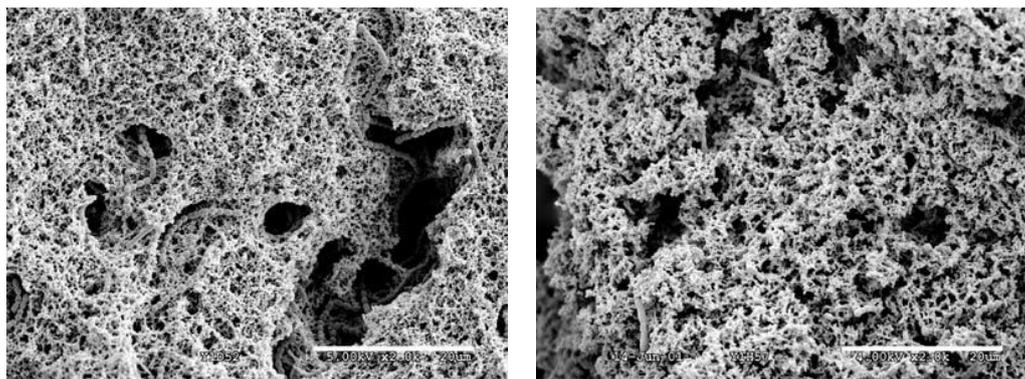


Figura 11. Microscopía electrónica (20 μm) de yogur obtenido a partir de WPC (izqda.) y SMP (dcha.) (Remeuf et al., 2003).

Por otro lado, la microestructura de los yogures fortificados con MCC apenas ha sido estudiada. Sin embargo, la alta permeabilidad del producto sugiere que el gel del yogur fortificado con MCC es un gel con grandes poros en su estructura (Peng et al., 2009).

La evidencia anterior demuestra que la fortificación de la leche con ingredientes caseínicos se manifiesta en una mejora en la textura y en la firmeza de los geles formados (Guzmán-González et al., 1999; Modler et al., 1983; Patel, 2011).

Asimismo, la adición de concentrados de caseína micelar líquida (LMCC) permite fortificar la textura de los yogures mediante el incremento de la fuerza del gel (Arce, 2019). La mejora en la textura puede ser atribuida a que el LMCC no ha sido sometido a un proceso de atomización y mantiene la estructura nativa de las micelas de caseína (Schuck, 2008).

Por otro lado, la estructura de los yogures con alto contenido proteínico también depende del tamaño de partícula de las micelas de caseína (Jørgensen et al., 2017). Los yogures elaborados con leche que posee micelas de caseína pequeñas (130 nm) da lugar a yogures con una mayor firmeza en comparación a los yogures elaborados a partir de micelas de caseína con un tamaño mayor (180 nm) debido a que la mayor superficie de contacto de las primeras proporciona un aumento en los puntos de atracción entre las κ -caseínas y las proteínas del suero durante la acidificación (Dalglish & Corredig, 2012).

Por el contrario, los geles resultantes a partir de la utilización de proteínas del suero pueden presentar defectos en la textura como una menor fuerza de la red proteica (Damin et al., 2009; Modler et al., 1983) y una mayor granulosidad (Remeuf et al., 2003).

4.3.3. Viscosidad

La fortificación de yogures firmes con MPC no modifica la viscosidad de los yogures en comparación con los fortificados con leche en polvo (Guzmán-González et al., 1999; Soukoulis et al., 2007). Sin embargo, estos primeros presentan una mayor viscosidad (incremento del índice de viscosidad en 55%) respecto a los elaborados con proteínas de suero (Guzmán-González et al., 1999).

Este efecto parece estar relacionado con los resultados obtenidos por Modler et al. (1983) que, tal y como se ha comentado anteriormente, manifiestan que los ingredientes caseínicos (MPC y SMP) contribuyen al desarrollo de la firmeza de los yogures y a la obtención de mejores atributos

de textura en comparación con los ingredientes que contienen principalmente proteínas del suero.

En el caso de concentrados caseínicos, la fortificación de la leche con MCC o con LMCC apenas influye en la viscosidad de los yogures firmes si estos son comparados con los productos elaborados a partir de leche en polvo (Arce, 2019). En los yogures griegos, se observa que los MCC-58 pueden dar lugar a yogures con una viscosidad similar a los existentes en el mercado (Bong & Moraru, 2014).

No obstante, la viscosidad de los yogures también está relacionada con el contenido de sólidos totales que posee el producto. En general, una mayor concentración de sólidos totales produce un incremento en la viscosidad del yogur (Lee & Lucey, 2010). En este sentido, Bong & Moraru (2014) demostraron que la adición de MCC con un mayor contenido en sólidos totales (20% frente a 16%) permite incrementar la viscosidad del gel en un 188%.

4.3.4. Sinéresis

El fenómeno de sinéresis se produce a causa del reordenamiento de la red de micelas de caseína, provocando la expulsión de las proteínas del suero de la red proteica y originando defectos en la textura del yogur. No obstante, la fortificación de la leche con ingredientes lácteos permite reducir el drenaje del suero proporcionando un yogur de alta calidad (Lee & Lucey, 2010; Rani et al., 2012).

En primer lugar, los yogures elaborados con WPC sufren una menor sinéresis respecto a los productos fortificados con leche desnatada en polvo (Delikanli & Ozcan, 2014; Guzmán-González et al., 1999) o respecto a los yogures elaborados con MPC (Guzmán-González et al., 1999) debido a que el coágulo de los primeros posee una mayor capacidad de retención de agua. En términos cuantitativos, la sustitución de SMP o MPC por WPC permite reducir a la mitad el drenaje del suero (Guzmán-González et al., 1999).

Además, Delikanli & Ozcan (2014) manifiestan que la adición de WPC al yogur es el método más eficaz para reducir la sinéresis en comparación con la adición de otros ingredientes compuestos por proteínas del suero (*whey protein isolates* y *whey protein hydrolysates*).

Este efecto es atribuido a que el tratamiento térmico de la leche durante la elaboración del yogur da lugar a un mayor entrecruzamiento de la red proteica debido a la desnaturalización de las proteínas, favoreciendo la capacidad de retención de agua de los geles formados y disminuyendo el tamaño de los poros microscópicos (Remeuf et al., 2003). Además, a medida que la relación CN:WP disminuye, aumenta la compactación de la estructura del gel permitiendo inmovilizar una mayor cantidad de fracción acuosa (Amatayakul et al., 2006; Puvanenthiran et al., 2002).

Por otro lado, la fortificación de yogures con MCC puede provocar un incremento en el drenaje del suero. En base a ensayos realizados por Arce (2019), el nivel de sinéresis de los yogures elaborados con MCC es significativamente superior en comparación a los yogures elaborados a partir de leche en polvo (43% frente a 28% respectivamente).

También se ha observado que, cuando la leche en polvo desnatada es sustituida por los polvos de MCC, la ralentización de la cinética da lugar a una excesiva reorganización de la red proteica

tras la gelificación y origina un aumento en la permeabilidad del gel del 44% (Peng et al., 2009). Esta permeabilidad está relacionada con una estructura del gel débil y heterogénea con grandes poros en su composición (Lucey et al., 1997; Roefs et al., 1990). No obstante, el empleo de MCC con un mayor contenido en sólidos totales (20% frente a 16%) permite incrementar la capacidad de retención de agua en un 24% (Bong & Moraru, 2014).

4.3.5. Características organolépticas

Por lo que respecta a las propiedades sensoriales de los yogures batidos, a medida que aumenta la concentración de proteínas del suero y disminuye la relación CN:WP, los atributos característicos del yogur (aroma, acidez y astringencia) disminuyen, quedando potenciada la textura granulosa del producto y son obtenidos yogures con un color más amarillo (Küçükçetin, 2008; Tomaschunas et al., 2012).

La granulosidad parece estar relacionada con el diámetro de las partículas y, un aumento en la concentración de proteínas del suero, provoca un incremento en el tamaño de las partículas favoreciendo la granulosidad (Krzeminski et al., 2011; Mistry & Hassan, 1992). Por otro lado, el aumento de la granulosidad de los yogures elaborados con proteínas del suero (Remeuf et al., 2003) también puede deberse a que, a causa de los diferentes puntos isoeléctricos de las proteínas, la coagulación se produzca en dos etapas (O'Kennedy & Kelly, 2000) y, debido al reordenamiento de la red proteica, puedan aparecer fracturas en la estructura del gel favoreciendo la formación de una textura granulosa (Lucey & Singh, 1997).

Por el contrario, los atributos relacionados con la grasa (sabor y textura cremosa, viscosidad y sensación grasa en la boca) son atributos que aumentan a medida que son incrementadas la relación CN:WP, la fracción lipídica y el contenido proteico del producto (Tomaschunas et al., 2012).

Por otro lado, la firmeza aumenta a medida que el contenido proteico es incrementado. No obstante, los yogures elaborados con WPC son valorados como los menos firmes (Modler et al., 1983).

Los yogures fortificados con un 2% de SMP y MPC son valorados de manera similar en cuanto a atributos de color, aroma, palatabilidad, firmeza y sabor. En contraste, los yogures elaborados con proteínas del suero son peor valorados en cuanto a la apariencia y el sabor global respecto a los elaborados con leche desnatada en polvo (Soukoulis et al., 2007). En general los yogures desnatados fortificados con un 2% de leche desnatada en polvo o con un 2% de MPC son los más aceptables en términos organolépticos en comparación a los yogures elaborados con proteínas del suero.

Por último, cabe comentar que relativamente pocos ensayos se han realizado investigando los efectos del enriquecimiento de la leche con MCC sobre las propiedades sensoriales del mismo.

5. Conclusiones y perspectivas

Las conclusiones de este Trabajo Fin de Grado bibliográfico son:

- La fortificación de la leche con concentrados proteicos previamente al proceso fermentativo es una adecuada alternativa a la tradicional práctica de eliminación del suero tras la fermentación del yogur. El incremento de los sólidos totales en la etapa de fortificación de la leche parece estar relacionado con la obtención de yogures con una mejor calidad.
- No hay una respuesta concisa de cuál es el mejor enfoque para producir yogures con alto contenido proteico. Si bien, las técnicas de separación de membrana proporcionan ingredientes con una alta funcionalidad para su empleo en la etapa de normalización de la leche. No obstante, se constata que:
 - El proceso de secado por atomización induce a pérdidas en la funcionalidad de los ingredientes e influye negativamente en el sabor de los concentrados proteínicos (Augustin & Udabage, 2007; Carter et al., 2018).
 - Condiciones de almacenamiento inadecuadas pueden manifestarse en cambios en la funcionalidad de los polvos lácteos.
- La utilización de concentrados proteicos MPC permite incrementar la viscosidad de los yogures respecto a los concentrados de suero, no origina modificaciones en el tiempo fermentativo y la microestructura del yogur presenta una mayor fusión micelar. Sin embargo, el yogur presenta una mayor sinéresis.
- La utilización de concentrados proteicos WPC permite reducir el drenaje del suero en los yogures. Sin embargo, su utilización puede manifestarse organolépticamente en un aumento en la granulosidad del producto.
- La utilización de concentrados proteicos MCC produce una mejora en la textura (principalmente el LMCC). Sin embargo, las fermentaciones son más lentas y los yogures presentan una mayor sinéresis y permeabilidad.
- La disminución de la relación CN:WP permite reducir tanto el tiempo fermentativo como la sinéresis del producto. Sin embargo, los atributos relacionados con la grasa quedan potenciados a medida que esta relación es incrementada.
- Los problemas derivados del empleo de ingredientes en polvo podrían solventarse mediante el empleo de concentrados proteicos lácteos líquidos.

Finalmente, se requiere una mayor investigación para mejorar las propiedades reológicas, estructurales y sensoriales en los yogures con alto contenido proteico. Por ello, las perspectivas estarían enfocadas hacia la utilización de concentrados proteicos líquidos, pero que aseguren su vida útil, así como combinaciones de concentrados LMCC y WPC con el objetivo de obtener yogures con adecuados atributos en cuanto a la textura y que presenten un menor drenaje del suero.

6. Bibliografía

- Agarwal, S., Beausire, R. L. W., Patel, S., & Patel, H. (2015). Innovative uses of milk protein concentrates in product development. *Journal of Food Science*, *80*(S1), A23–A29. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12807>
- Alm, L. (1982). Effect of Fermentation on Milk Fat of Swedish Fermented Milk Products. *Journal of Dairy Science*, *65*(4), 521–530. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82229-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82229-7)
- Amatayakul, T., Halmos, A. L., Sherkat, F., & Shah, N. P. (2006). Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal*, *16*(1), 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.01.004>
- Amelia, I., & Barbano, D. M. (2013). Production of an 18% protein liquid micellar casein concentrate with a long refrigerated shelf life. *Journal of Dairy Science*, *96*(5), 3340–3349. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6033>
- Andoyo, R., Guyomarc'h, F., Cauty, C., & Famelart, M. H. (2014). Model mixtures evidence the respective roles of whey protein particles and casein micelles during acid gelation. *Food Hydrocolloids*, *37*, 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.019>
- Anema, S. G. (2008). Chapter 8. The whey proteins in milk: Thermal denaturation, physical interactions and effects on the functional properties of milk. In A. Thompson, M. Boland, & H. Singh (Eds.), *Milk Proteins: From Expression to Food* (pp. 239–281). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374039-7.00008-8>
- Anema, S. G., Pinder, D. N., Hunter, R. J., & Hemar, Y. (2006). Effects of storage temperature on the solubility of milk protein concentrate (MPC85). *Food Hydrocolloids*, *20*(2–3), 386–393. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.03.015>
- Arce, J. (2019). *Utilización de concentrados proteicos en la elaboración de yogures* [Universidad Pública de Navarra.]. <https://hdl.handle.net/2454/33744>
- Augustin, M. A., Clarke, P. T., & Craven, H. (2003). POWDERED MILK | Characteristics of Milk Powders. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (Caballero, pp. 4703–4711). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b0-12-227055-x/00956-1>
- Augustin, M. A., & Margetts, C. . (2003). POWDERED MILK | Milk Powders in the Marketplace. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (Caballero, pp. 4694–4702). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00955-X>
- Augustin, M. A., & Udabage, P. (2007). Influence of Processing on Functionality of Milk and Dairy Proteins. In S. Taylor (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 53, pp. 1–38). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(07\)53001-9](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(07)53001-9)
- Bastian, E. D., Collinge, S. K., & Ernstrom, C. A. (1991). Ultrafiltration: Partitioning of Milk Constituents into Permeate and Retentate. *Journal of Dairy Science*, *74*(8), 2423–2434. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78417-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78417-8)
- Beckman, S. L., Zulewska, J., Newbold, M., & Barbano, D. M. (2010). Production efficiency of micellar casein concentrate using polymeric spiral-wound microfiltration membranes. *Journal of Dairy Science*, *93*(10), 4506–4517. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3261>
- BEDCA. (2007). *Base de Datos BEDCA*. Recuperado de <https://www.bedca.net/bdpub/index.php>

- Benelam, B. (2009). Satiating, satiety and their effects on eating behaviour. *Nutrition Bulletin*, 34(2), 126–173. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1467-3010.2009.01753.x>
- Benjakul, S., & Kittiphattanabawon, P. (2019). Gelatin. In *Encyclopedia of Food Chemistry* (pp. 121–127). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21588-6>
- Bong, D. D., & Moraru, C. I. (2014). Use of micellar casein concentrate for Greek-style yogurt manufacturing: Effects on processing and product properties. *Journal of Dairy Science*, 97(3), 1259–1269. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7488>
- Brans, G., Schroën, C. G. P. H., Van Der Sman, R. G. M., & Boom, R. M. (2004). Membrane fractionation of milk: State of the art and challenges. *Journal of Membrane Science*, 243(1–2), 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2004.06.029>
- Carter, B., Patel, H., Barbano, D. M., & Drake, M. A. (2018). The effect of spray drying on the difference in flavor and functional properties of liquid and dried whey proteins, milk proteins, and micellar casein concentrates. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3900–3909. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13780>
- Chamberland, J., Bouyer, A., Benoit, S., Provault, C., Bérubé, A., Doyen, A., & Pouliot, Y. (2020). Efficiency assessment of water reclamation processes in milk protein concentrate manufacturing plants: A predictive analysis. *Journal of Food Engineering*, 272, 109811. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109811>
- Chandan, R. C. (2017). Chapter 2. An overview of yogurt production and composition. In N. P. Shah (Ed.), *Yogurt in Health and Disease Prevention* (pp. 31–47). Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-805134-4.00002-X>
- Chandan, R. C., Gandhi, A., & Shah, N. P. (2017). Chapter 1. Yogurt: Historical Background, Health Benefits, and Global Trade. In N. P. Shah (Ed.), *Yogurt in Health and Disease Prevention* (pp. 3–29). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805134-4.00001-8>
- Cho, Y., Lucey, J., & Singh, H. (1999). Rheological properties of acid milk gels as affected by the nature of the fat globule surface material and heat treatment of milk. *International Dairy Journal*, 9(8), 537–545. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00123-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00123-5)
- Chua, D., Deeth, H., Oh, H., & Bansal, N. (2017). Altering the casein to whey protein ratio to enhance structural characteristics and release of major yoghurt volatile aroma compounds of non-fat stirred yoghurts. *International Dairy Journal*, 74, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.05.002>
- Codex Alimentarius. (2011). *Leche y Productos Lácteos (segunda edición)* (pp. 6–17).
- Corredig, M., & Dalgleish, D. (1996). Effect of temperature and pH on the interactions of whey proteins with casein micelles in skim milk. *Food Research International*, 29(1), 49–55. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(95\)00058-5](https://doi.org/10.1016/0963-9969(95)00058-5)
- Dalgleish, D. G., & Corredig, M. (2012). The Structure of the Casein Micelle of Milk and Its Changes During Processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 449–467. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101214>
- Damin, M. R., Alcântara, M. R., Nunes, A. P., & Oliveira, M. N. (2009). Effects of milk supplementation with skim milk powder, whey protein concentrate and sodium caseinate on acidification kinetics, rheological properties and structure of nonfat stirred yogurt. *LWT - Food Science and Technology*, 42(10), 1744–1750. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.03.019>

- Dave, R. I., & Shah, N. P. (1998). Ingredient Supplementation Effects on Viability of Probiotic Bacteria in Yogurt. *Journal of Dairy Science*, 81, 2804–2816. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75839-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75839-4)
- Davies, F. L., Shankar, P. A., Brooker, B. E., & Hobbs, D. G. (1978). A heat-induced change in the ultrastructure of milk and its effect on gel formation in yoghurt. *Journal of Dairy Research*, 45(1), 53–58. <https://doi.org/10.1017/S0022029900016198>
- Delikanli, B., & Ozcan, T. (2014). Effects of various whey proteins on the physicochemical and textural properties of set type nonfat yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 67(4), 495–503. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12142>
- España. Ministerio de la Presidencia. (2014). Real Decreto 271/2014, de 11 de abril, por el que se aprueba la Norma de Calidad para el yogur o yoghourt. *Madrid: Boletín Oficial Del Estado, de 28 de abri de 2014, núm 102*. Recuperado de <https://www.boe.es/eli/es/rd/2014/04/11/271/con>
- España. Presidencia del Gobierno. (1967). Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español. *Madrid: Boletín Oficial Del Estado, de 17 de octubre de 1967, núm 248*. Recuperado de <https://www.boe.es/eli/es/d/1967/09/21/2484/con>
- España. Presidencia del Gobierno. (1983). Orden de 12 de julio de 1983 por la que se aprueban las normas generales de calidad para la nata y nata en polvo con destino al mercado interior. *Madrid: Boletín Oficial Del Estado, de 20 de julio de 1983, núm. 172*. Recuperado de [https://www.boe.es/eli/es/o/1983/07/12/\(2\)/con](https://www.boe.es/eli/es/o/1983/07/12/(2)/con)
- Europa. Parlamento Europeo y Consejo. (2013). Reglamento (UE) N° 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de diciembre de 2013, por el que se crea la organización común de mercados de los productos agrarios y por el que se derogan los Reglamentos (CEE) n° 922/72, (CEE) n° 234/79, (CE) n°1037/2001 y (CE) n°1234/2007. *Diario Oficial de La Unión Europea L 347, de 20 de Diciembre de 2013*. Recuperado de <http://data.europa.eu/eli/reg/2013/1308/2019-01-01>
- Fang, Y., Selomulya, C., Ainsworth, S., Palmer, M., & Chen, X. D. (2011). On quantifying the dissolution behaviour of milk protein concentrate. *Food Hydrocolloids*, 25(3), 503–510. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.07.030>
- Fox, P. (2008). Chapter 1. Milk: An overview. In A. Thompson, M. Boland, & H. Singh (Eds.), *Milk Proteins: From Expression to Food* (pp. 1–54). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374039-7.00001-5>
- Fox, P., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. (2015a). Chapter 5. Salts of Milk. In *Dairy Chemistry and Biochemistry (Second Edition)* (pp. 241–249). Springer International Publishing Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2>
- Fox, P., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. (2015b). Chapter 6. Vitamins in Milk and Dairy Products. In *Dairy Chemistry and Biochemistry (Second Edition)* (pp. 271–297). Springer International Publishing Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2>
- Frøst, M., & Janhøj, T. (2007). Understanding creaminess. *International Dairy Journal*, 17(11), 1298–1311. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.02.007>

- Gaiani, C., Morand, M., Sanchez, C., Arab Tehrany, E., Jacquot, M., Schuck, P., Jeantet, R., & Scher, J. (2010). How surface composition of high milk proteins powders is influenced by spray-drying temperature. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *75*(1), 377–384. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.016>
- Gaiani, C., Scher, J., Schuck, P., Hardy, J., Desobry, S., & Banon, S. (2006). The dissolution behaviour of native phosphocaseinate as a function of concentration and temperature using a rheological approach. *International Dairy Journal*, *16*(12), 1427–1434. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.12.004>
- Gaiani, C., Schuck, P., Scher, J., Desobry, S., & Banon, S. (2007). Dairy powder rehydration: Influence of protein state, incorporation mode, and agglomeration. *Journal of Dairy Science*, *90*(2), 570–581. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71540-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71540-0)
- García, J. (2010). *Técnicas moleculares aplicadas a la caracterización y estudio de la supervivencia de bacterias lácticas del yogurt* [Universidad Politécnica de Valencia]. <http://hdl.handle.net/10251/14010>
- Garlick, P. J. (2005). The Role of Leucine in the Regulation of Protein Metabolism. *The Journal of Nutrition*, *135*(6), 1553s-1556s. <https://doi.org/10.1093/jn/135.6.1553S>
- González-Chávez, S. A., Arévalo-Gallegos, S., & Rascón-Cruz, Q. (2009). Lactoferrin: structure, function and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *33*(4), 301.e1-301.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.07.020>
- González-Martínez, C., Becerra, M., Cháfer, M., Albors, A., Carot, J. M., & Chiralt, A. (2002). Influence of substituting milk powder for whey powder on yoghurt quality. *Trends in Food Science and Technology*, *13*(9–10), 334–340. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00160-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00160-7)
- Grunert, K. G., Bech-Larsen, T., & Bredahl, L. (2000). Three issues in consumer quality perception and acceptance of dairy products. *International Dairy Journal*, *10*(8), 575–584. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00085-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00085-6)
- Guyomarc'h, F., Queguiner, C., Law, A. J. R., Horne, D. S., & Dalgleish, D. G. (2003). Role of the soluble and micelle-bound heat-induced protein aggregates on network formation in acid skim milk gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(26), 7743–7750. <https://doi.org/10.1021/jf030201x>
- Guzmán-González, M., Morais, F., Ramos, M., & Amigo, L. (1999). Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low fat set-type yoghurt model system. I: Use of whey protein concentrates, milk protein concentrates and skimmed milk powder. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *79*(8), 1117–1122. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199906\)79:8<1117::AID-JSFA335>3.3.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199906)79:8<1117::AID-JSFA335>3.3.CO;2-6)
- Hall, G. M., & Iglesias, O. (1997). Functional properties of dried milk whey. *Food Science and Technology International*, *3*(5), 381–383. <https://doi.org/10.1177/108201329700300509>
- Heino, A. T., Uusi-Rauva, J. O., Rantamäki, P. R., & Tossavainen, O. (2007). Functional properties of native and cheese whey protein concentrate powders. *International Journal of Dairy Technology*, *60*(4), 277–285. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2007.00350.x>
- Holt, C., Carver, J. A., Ecroyd, H., & Thorn, D. C. (2013). Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods. *Journal of Dairy Science*, *96*(10), 6127–6146. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6831>

- Horne, D. S. (1998). Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *International Dairy Journal*, 8(3), 171–177. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00040-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00040-5)
- Horne, D. S. (1999). Formation and structure of acidified milk gels. *International Dairy Journal*, 9(3–6), 261–268. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(99\)00072-2](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(99)00072-2)
- Horne, D. S. (2008). Chapter 5. Casein micelle structure and stability. In A. Thompson, M. Boland, & H. Singh (Eds.), *Milk Proteins: From Expression to Food* (pp. 133–162). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374039-7.00005-2>
- Huppertz, T., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2018). Chapter 3. The caseins: Structure, stability, and functionality. In R. Yada (Ed.), *Proteins in Food Processing. (Second Edition)* (pp. 49–92). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00004-8>
- Hurt, E. E., & Barbano, D. M. (2015). Factors that influence the membrane area of a multistage microfiltration process required to produce a micellar casein concentrate. *Journal of Dairy Science*, 98(4), 2222–2233. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8880>
- Jørgensen, C. E., Abrahamsen, R. K., Rukke, E. O., Hoffmann, T. K., Johansen, A. G., & Skeie, S. B. (2019). Processing of high-protein yoghurt – A review. *International Dairy Journal*, 88, 42–59. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.08.002>
- Jørgensen, C. E., Abrahamsen, R. K., Rukke, E. O., Johansen, A. G., Schüller, R. B., & Skeie, S. B. (2015). Improving the structure and rheology of high protein, low fat yoghurt with undenatured whey proteins. *International Dairy Journal*, 47, 6–18. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.02.002>
- Jørgensen, C. E., Abrahamsen, R. K., Rukke, E. O., Johansen, A. G., & Skeie, S. B. (2017). Fractionation by microfiltration: Effect of casein micelle size on composition and rheology of high protein, low fat set yoghurt. *International Dairy Journal*, 74, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.11.018>
- Karam, M. C., Gaiani, C., Hosri, C., Burgain, J., & Scher, J. (2013). Effect of dairy powders fortification on yogurt textural and sensorial properties: A review. *Journal of Dairy Research*, 80(4), 400–409. <https://doi.org/10.1017/S0022029913000514>
- Kilara, A., & Chandan, R. (2006). Chapter 5. Basic dairy processing principles. In R. Chandan (Ed.), *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks* (pp. 73–89). Blackwell Publishing.
- Kneifel, W. (2003). RECOMBINED AND FILLED MILKS. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (Caballero, pp. 4921–4926). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b0-12-227055-x/01004-x>
- Krzeminski, A., Großhable, K., & Hinrichs, J. (2011). Structural properties of stirred yoghurt as influenced by whey proteins. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2134–2140. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.05.018>
- Küçükçetin, A. (2008). Effect of heat treatment and casein to whey protein ratio of skim milk on graininess and roughness of stirred yoghurt. *Food Research International*, 41(2), 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.11.003>
- Kumar, P., Sharma, N., Ranjan, R., Kumar, S., Bhat, Z. F., & Jeong, D. K. (2013). Perspective of membrane technology in dairy industry: A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26(9), 1347–1358. <https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13082>

- Lee, W. J., & Lucey, J. A. (2004). Structure and physical properties of yogurt gels: Effect of inoculation rate and incubation temperature. *Journal of Dairy Science*, *87*(10), 3153–3164. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73450-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73450-5)
- Lee, W. J., & Lucey, J. A. (2010). Formation and Physical Properties of Yogurt. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.*, *23*(9), 1127–1136. <https://doi.org/10.5713/ajas.2010.r.05>
- Lesme, H., Rannou, C., Famelart, M. H., Bouhallab, S., & Prost, C. (2020). Yogurts enriched with milk proteins: Texture properties, aroma release and sensory perception. *Trends in Food Science and Technology*, *98*, 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.006>
- Lindmark-Månsson, H., Fondén, R., & Pettersson, H. E. (2003). Composition of Swedish dairy milk. *International Dairy Journal*, *13*(6), 409–425. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00032-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00032-3)
- Little, E. M., & Holt, C. (2004). An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein phosphopeptides. *European Biophysics Journal*, *33*(5), 435–447. <https://doi.org/10.1007/s00249-003-0376-x>
- Lucey, J. A. (2008). Chapter 16. Milk Protein Gels. In A. Thompson, M. Boland, & H. Singh (Eds.), *Milk Proteins: From Expression to Food* (pp. 449–481). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374039-7.00016-7>
- Lucey, J. A. (2017). Chapter 7. Formation, Structural Properties, and Rheology of Acid-Coagulated Milk Gels. In P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, & E. David W (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology (Fourth Edition)* (Vol. 1, pp. 179–197). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00007-7>
- Lucey, J. A., Munro, P. A., & Singh, H. (1999). Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. *International Dairy Journal*, *9*(3–6), 275–279. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00074-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00074-6)
- Lucey, J. A., & Singh, H. (1997). Formation and physical properties of acid milk gels: A review. *Food Research International*, *30*(7), 529–542. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(98\)00015-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(98)00015-5)
- Lucey, J. A., Van Vliet, T., Grolle, K., Geurts, T., & Walstra, P. (1997). Properties of acid casein gels made by acidification with glucono- δ -lactone. 2. Syneresis, permeability and microstructural properties. *International Dairy Journal*, *7*(6–7), 389–397. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(97\)00028-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(97)00028-9)
- Machin, D. R., Park, W., Alkatan, M., Mouton, M., & Tanaka, H. (2015). Effects of non-fat dairy products added to the routine diet on vascular function: A randomized controlled crossover trial. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, *25*(4), 364–369. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2015.01.005>
- Mahomud, M. S., Katsuno, N., & Nishizu, T. (2017). Formation of soluble protein complexes and yoghurt properties influenced by the addition of whey protein concentrate. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *44*, 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.05.010>
- Martin, G. J. O., Williams, R. P. W., & Dunstan, D. E. (2010). Effect of manufacture and reconstitution of milk protein concentrate powder on the size and rennet gelation behaviour of casein micelles. *International Dairy Journal*, *20*(2), 128–131. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.08.007>
- Mellentin, J. (2013). *12 key trends in Food, nutrition & health 2014 (Vol.19)*.

- Mimouni, A., Deeth, H. C., Whittaker, A. K., Gidley, M. J., & Bhandari, B. R. (2010). Investigation of the microstructure of milk protein concentrate powders during rehydration: Alterations during storage. *Journal of Dairy Science*, *93*(2), 463–472. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2369>
- Min, S., Harris, L. J., & Krochta, J. M. (2005). Antimicrobial Effects of Lactoferrin, Lysozyme, and the Lactoperoxidase System and Edible Whey Protein Films Incorporating the Lactoperoxidase System Against Salmonella enterica and Escherichia coli O157:H7. *Journal of Food Science*, *70*(7), m332–m338. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11476.x>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, (Organización). (2018). *Informe del Consumo Alimentario en España 2018* (pp. 1–242). Recuperado de <https://www.mapa.gob.es/es/>
- Mistry, V. V., & Hassan, H. N. (1991). Delactosed, High Milk Protein Powder. 1. Manufacture and Composition. *Journal of Dairy Science*, *74*(4), 1163–1169. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78269-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78269-6)
- Mistry, V. V., & Hassan, H. N. (1992). Manufacture of Nonfat Yogurt from a High Milk Protein Powder. *Journal of Dairy Science*, *75*(4), 947–957. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77835-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77835-7)
- Modler, H. W., & Kalab, M. (1983). Microstructure of Yogurt Stabilized with Milk Proteins. *Journal of Dairy Science*, *66*(3), 430–437. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81810-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81810-4)
- Modler, H. W., Larmond, M. E., Lin, C. S., Froehlich, D., & Emmons, D. B. (1983). Physical and Sensory Properties of Yogurt Stabilized with Milk Proteins. *Journal of Dairy Science*, *66*(3), 422–429. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81809-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81809-8)
- Mulder, H., & Walstra, P. (1974). *The milk fat globule: Emulsion science as applied to milk products and comparable foods*.
- Nasser, S., Jeantet, R., De-Sa-Peixoto, P., Ronse, G., Nuns, N., Pourpoint, F., Burgain, J., Gaiani, C., Hédoux, A., & Delaplace, G. (2017). Microstructure evolution of micellar casein powder upon ageing: Consequences on rehydration dynamics. *Journal of Food Engineering*, *206*, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.03.004>
- Nasser, S., Moreau, A., Jeantet, R., Hédoux, A., & Delaplace, G. (2017). Influence of storage conditions on the functional properties of micellar casein powder. *Food and Bioprocess Technology*, *106*, 181–192. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.09.004>
- Norwood, E. A., Croguennec, T., Le Floch-Fouéré, C., Schuck, P., & Jeantet, R. (2019). Chapter 4. Changes in whey protein powders during storage. In H. C. Deeth & N. Bansal (Eds.), *Whey Proteins: From Milk to Medicine*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812124-5.00004-7>
- Nunes, L., & Tavares, G. M. (2019). Thermal treatments and emerging technologies: Impacts on the structure and techno-functional properties of milk proteins. *Trends in Food Science and Technology*, *90*, 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.004>
- O’Kennedy, B. T., & Kelly, P. M. (2000). Evaluation of milk protein interactions during acid gelation using a simulated yoghurt model. *Milchwissenschaft*, *55*(4), 187–190.
- Oliveira, R. P. de S., Torres, B. R., Perego, P., Oliveira, M. N. de, & Converti, A. (2012). Co-metabolic models of Streptococcus thermophilus in co-culture with Lactobacillus bulgaricus or Lactobacillus acidophilus. *Biochemical Engineering Journal*, *62*, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.01.004>

- Pang, Z., Deeth, H., Yang, H., Prakash, S., & Bansal, N. (2017). Evaluation of tilapia skin gelatin as a mammalian gelatin replacer in acid milk gels and low-fat stirred yogurt. *Journal of Dairy Science*, *100*(5), 3436–3447. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11881>
- Parodi, P. (2007). A Role for Milk Proteins and their Peptides in Cancer Prevention. *Current Pharmaceutical Design*, *13*(8), 813–828. <https://doi.org/10.2174/138161207780363059>
- Patel, S. (2011). *Evaluating the Effect of Milk Protein Concentrates (MPC) Fortification on Rheological Properties of Nonfat Set Yogurt Using Vane Rheometry*. University of Wisconsin-Stout.
- Peng, Y., Serra, M., Horne, D. S., & Lucey, J. A. (2009). Effect of fortification with various types of milk proteins on the rheological properties and permeability of nonfat set yogurt. *Journal of Food Science*, *74*(9), C666–C673. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01350.x>
- Penna, A. L. B., Baruffaldi, R., & Oliveira, M. N. (1997). Optimization of yogurt production using demineralized whey. *Journal of Food Science*, *62*(4), 846–850. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb15469.x>
- Pereira, R. (2014). Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, *30*(6), 619–627. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.011>
- Pereira, R., Matia-Merino, L., Jones, V., & Singh, H. (2006). Influence of fat on the perceived texture of set acid milk gels: A sensory perspective. *Food Hydrocolloids*, *20*(2–3), 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.01.009>
- Pouliot, Y. (2008). Membrane processes in dairy technology-From a simple idea to worldwide panacea. *International Dairy Journal*, *18*(7), 735–740. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.005>
- Puvanenthiran, A., Williams, R. P. W., & Augustin, M. A. (2002). Structure and visco-elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal*, *12*(4), 383–391. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00033-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00033-X)
- Rani, R., Unnikrishnan, V., N, C., & Singh, B. (2012). Factors Affecting Syneresis in Yoghurt : a Review. *Indian Journal of Dairy and Biosciences*, *23*.
- Remeuf, F., Mohammed, S., Sodini, I., & Tissier, J. P. (2003). Preliminary observations on the effects of milk fortification and heating on microstructure and physical properties of stirred yogurt. *International Dairy Journal*, *13*(9), 773–782. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00092-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00092-X)
- Robinson, R. K. (2002). *Dairy microbiology handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products (Third edition)*. Blackwell Publishing.
- Roefs, S. P., De Groot-Mostert, A. E., & Van Vliet, T. (1990). Structure of acid casein gels 1. Formation and model of gel network. *Colloids and Surfaces*, *50*, 141–159. [https://doi.org/10.1016/0166-6622\(90\)80259-7](https://doi.org/10.1016/0166-6622(90)80259-7)
- Salvador, A. (1998). *Efecto de la adición de gelatina sobre el comportamiento reológico en sistemas lácteos*. [Universidad de Valencia. Instituto de agroquímica y tecnología de alimentos.]. <http://hdl.handle.net/10550/38109>
- Sauer, A., & Moraru, C. I. (2012). Heat stability of micellar casein concentrates as affected by temperature and pH. *Journal of Dairy Science*, *95*(11), 6339–6350. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5706>

- Schkoda, P., Hechler, A., & Hinrichs, J. (2001). Improved texture of stirred fermented milk by integrating fat globules into the gel structure. *Milchwissenschaft*, 56(2), 85–89. https://www.researchgate.net/publication/292009335_Improved_texture_of_stirred_fermented_milk_by_integrating_fat_globules_into_the_gel_structure
- Schokker, E. P., Church, J. S., Mata, J. P., Gilbert, E. P., Puvanenthiran, A., & Udabage, P. (2011). Reconstitution properties of micellar casein powder: Effects of composition and storage. *International Dairy Journal*, 21(11), 877–886. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.05.004>
- Schuck, P. (2008). Chapter 9. Effects of Drying on Milk Proteins. In A. Thompson, M. Boland, & H. Singh (Eds.), *Milk Proteins: From Expression to Food* (pp. 283–305). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374039-7.00009-X>
- Sfakianakis, P., & Tzia, C. (2014). Conventional and Innovative Processing of Milk for Yogurt Manufacture; Development of Texture and Flavor: A Review. *Foods*, 3(1), 176–193. <https://doi.org/10.3390/foods3010176>
- Shah, N. (2003). YOGURT|The Product and its Manufacture. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (Caballero, pp. 6252–6259). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01305-5>
- Shori, A. B., Baba, A. S., & Muniandy, P. (2019). Chapter 5. Potential Health-Promoting Effects of Probiotics in Dairy Beverages. In *Value-Added Ingredients and Enrichments of Beverages* (pp. 173–204). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816687-1.00005-9>
- Sikand, V., Tong, P. S., Roy, S., Rodriguez-Saona, L. E., & Murray, B. A. (2011). Solubility of commercial milk protein concentrates and milk protein isolates. *Journal of Dairy Science*, 94(12), 6194–6202. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4477>
- Sikand, V., Tong, P. S., & Walker, J. (2013). Effect of adding salt during the diafiltration step of milk protein concentrate powder manufacture on mineral and soluble protein composition. *Dairy Science and Technology*, 93(4–5), 401–413. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0110-0>
- Singh, H. (2016). Functional Properties of Milk Proteins. In *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.00934-3>
- Singh, H., & Ye, A. (2008). Chapter 11. Interactions and Functionality of Milk Proteins in Food Emulsions. In A. Thompson, M. Boland, & H. Singh (Eds.), *Milk Proteins: From Expression to Food* (pp. 321–345). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374039-7.00011-8>
- Sodini, I., Remeuf, F., Haddad, C., & Corrieu, G. (2004). The Relative Effect of Milk Base, Starter, and Process on Yogurt Texture: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(2), 113–137. <https://doi.org/10.1080/10408690490424793>
- Soukoulis, C., Panagiotidis, P., Koureli, R., & Tzia, C. (2007). Industrial yogurt manufacture: Monitoring of fermentation process and improvement of final product quality. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2641–2654. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-802>
- Tamime, & Deeth, H. C. (1980). Yogurt : Technology and Biochemistry. *Journal of Food Protection*, 43(12), 939–977. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-43.12.939>
- Tamime, & Robinson, R. K. (2007a). Chapter 1. Historical background. In *Tamime and Robinson's Yoghurt: Science and Technology (Third Edition)* (pp. 1–12). Woodhead Publishing.

- Tamime, & Robinson, R. K. (2007b). Chapter 2. Background to manufacturing practice. In *Tamime and Robinson's Yoghurt: Science and Technology (Third Edition)* (pp. 13–161). Woodhead Publishing.
- Tomaschunas, M., Hinrichs, J., Köhn, E., & Busch-Stockfisch, M. (2012). Effects of casein-to-whey protein ratio, fat and protein content on sensory properties of stirred yoghurt. *International Dairy Journal*, *26*(1), 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.04.005>
- Tunick, M. H. (2008). Chapter 1. Whey protein production and utilization: A brief history. In C. Onwulata & P. Huth (Eds.), *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*. Bentham Science Publishers Ltd.
- Uduwerella, G., Chandrapala, J., & Vasiljevic, T. (2018). Preconcentration of yoghurt base by ultrafiltration for reduction in acid whey generation during Greek yoghurt manufacturing. *International Journal of Dairy Technology*, *71*(1), 71–80. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12393>
- Vedamuthu, E. . (2006). Chapter 6. Starter cultures for yogurt and fermented milks. In R. Chandan (Ed.), *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks* (pp. 89–117). Blackwell Publishing.
- Walstra, P., & Jenness, R. (1984). *Dairy chemistry and physics*. Wiley Interscience.
- Wit, J. . (2001). *Lecturer ' s Handbook on whey and whey products*. European Whey Products Association.
- Yousefi, M., & Jafari, S. M. (2019). Recent advances in application of different hydrocolloids in dairy products to improve their techno-functional properties. *Trends in Food Science and Technology*, *88*, 468–483. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.015>
- Zadow, J. G. (2003a). WHEY AND WHEY POWDERS | Production and Uses. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (Caballero, pp. 6147–6152). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b0-12-227055-x/01287-6>
- Zadow, J. G. (2003b). WHEY AND WHEY POWDERS | Protein Concentrates and Fractions. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (Caballero, pp. 6152–6157). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01288-8>
- Zambrano, G. (2008). *Evaluación de la calidad de yogur tipo II elaborado con leche concentrada por microfiltración tangencial utilizando diferentes tipos de grasa y estabilizante*. [Universidad Técnica del Norte.]. <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/487>
- Zavala, J. M. (2009). Aspectos nutricionales y tecnológicos de la leche. In *Dirección General de Competitividad Agraria* (pp. 1–67).
- Zhao, L. L., Wang, X. L., Tian, Q., & Mao, X. Y. (2016). Effect of casein to whey protein ratios on the protein interactions and coagulation properties of low-fat yogurt. *Journal of Dairy Science*, *99*(10), 7768–7775. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10794>