



**Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo**

---

---

**Instituto de Ciencias Agropecuarias**

**Área Académica de Ingeniería Agroindustrial e  
Ingeniería en Alimentos**

**Cinética fermentativa y evaluación de las  
propiedades reológicas de una bebida láctea  
estabilizada con polisacáridos gelificantes**

**TESIS**

Que para obtener el título de:

**INGENIERA EN ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**Jessica Granillo Huerta**

Dirección: Dra. Adriana I. Rodríguez Hernández, ICAP, UAEH  
Codirección: Dr. Norberto Chavarría Hernández, ICAP, UAEH

Tulancingo de Bravo, Hidalgo. Octubre 2011.

---

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Biotecnología, Físicoquímica y Análisis Especiales del Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAp), Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH). La dirección de este trabajo estuvo a cargo de la Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández y del Dr. Norberto Chavarría Hernández. Se agradece beca del proyecto “Consolidación del Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria, P/CA-3 2006-14-04”:

---

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a mi Señor y Salvador Jesucristo que, de no ser por Él, no tendría el amor, gracia y misericordia del Padre, quien me ha fortalecido durante mi estancia en la universidad hasta este día que concluyo mis estudios.

Agradecimientos especiales al Ing. Jesús Franco, por su apoyo; a la Dra. Adriana Rodríguez y al Dr. Norberto Chavarría por darme la oportunidad de descubrir lo apasionante que es el mundo de la ciencia e investigación.

Sin olvidar a Dairis Chavaría Rodríguez mi catadora estrella, te quiero mucho chiquita.

También agradezco a mi padre Cosme Granillo por demostrarme que las metas se alcanzan a base de trabajo y esfuerzo y ahora lo puedo palpar al tener este trabajo de tesis en mis manos; y que decir de su es posa Silvia Merchant, mi amiga y compañera de aventuras, quien con su carácter, fortaleza, ternura y chispa me ha acompañado y además me ha provisto de uno de los mayores regalos que alguien puede pedir, mis cuatro hermosas nenas Danni, Meli, Coti y Tori, gracias por sus travesuras y abrazos que me hacen sentir el verdadero amor.

Gracias a mi madre Guadalupe Huerta por haberme dado la vida y por apoyarme cada vez que decía “ya no puedo, dejo la carrera”, tú me recordaste que Dios nunca me iba a dejar sola y que Él extiende su mano a nosotros cada vez que caemos para levantarnos y darnos más de Él . A mi hermano Damián Granillo, quien siempre ha sido mi cómplice para soñar y para hacer locuras y reírnos hasta cansarnos, gracias godis te amo.

Gracias a mis amigos Jorge, Yessi, Martin, Eunice, el Wero, Israel, Ale Vivas, Pablo Emilio, Orlando, a la Q. Ernestina Vertiz, al Lic. Antonio Vertiz, Sixto, Lalo

---

(tío), Lulú y por supuesto a Luisa quien participó en los experimentos de este trabajo pues era imposible monitorear las variables al mismo tiempo.

A mi familia en Cristo Pili, Don Ino, Zuri, Lupita, Milca, David, Dana, Abram, Nef, Sami, Mari Rojo, Vane, Luis Eduardo, los Panchos bros. (Sharon y Luis), Lissette, Rohi Daniel, Licho, Clemen y Alejandro, Amy, Ale, Jessi, a mi banda donde quiera que estén Lalito, Sol, Miri, Ana Raquel, Diani, Nane, Tani, Riki, Jorgitsh, ¡los extraño! Jaciel, Miguel, Arturitsh, Carmen, Ramiro, Omar y Paty Horta...gracias a todos por su apoyo, ánimo, sobre todo por ser personas tan especiales, pues no sólo somos amigos somos hermanos en Cristo!!!

Gracias a mis Pastores David y Sara Lont, y a los peques David, Daniel y Anna gracias por mostrar el amor de Dios con sus oraciones, su apoyo y por hacerme sentir parte de su familia.

---

**ÍNDICE GENERAL**

	<b>Página</b>
<b>NOMENCLATURA</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO</b>	<b>4</b>
<b>1.1 LECHE</b>	<b>4</b>
1.1.1 Composición de la leche	4
1.1.2 Proteínas de la leche	4
1.1.2.1 Las caseínas	4
1.1.2.2 Las proteínas del suero o solubles	4
a) Proteosomas-peptonas	5
b) Sustancias nitrogenadas no proteicas	5
1.1.3 Las caseínas	6
<b>1.2 GELES</b>	<b>7</b>
1.2.1 Gel fuerte o verdadero	8
1.2.2 Gel débil	8
<b>1.3 OTRA FORMA DE CLASIFICAR A LOS GELES</b>	<b>8</b>
1.3.1 Estructuras laminares bien ordenadas	8
1.3.2 Redes de polímeros covalentes	8
1.3.3 Redes de polímeros formados a través de agregaciones físicas	9
1.3.4 Estructuras de partículas desordenadas	9
<b>1.4 GELIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA LECHE</b>	<b>9</b>
1.4.1 Precipitación	9
1.4.2 Floculación	9
1.4.3 Coagulación	10

---

1.4.4	Gelificación	10
<b>1.5</b>	<b>GELES EN LA ELABORACIÓN DE PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS</b>	<b>10</b>
1.5.1	Geles enzimáticos	10
1.5.2	Geles térmicos	10
1.5.3	Geles ácidos	10
<b>1.6</b>	<b>GELIFICACIÓN ÁCIDA DE LAS PROTEÍNAS</b>	<b>11</b>
<b>1.7</b>	<b>FACTORES INTRÍNSECOS QUE AFECTAN LA FORMACIÓN DE LOS GELES DE PROTEÍNA</b>	<b>14</b>
1.7.1	Interacciones electrostáticas	14
1.7.2	Enlaces disulfuro e intercambio tio-bisulfuro	14
1.7.3	Peso molecular	15
1.7.4	Composición de aminoácidos	15
1.7.5	Afinidad por el disolvente	15
<b>1.8</b>	<b>FACTORES EXTRÍNSECOS QUE AFECTAN LA GELIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS LÁCTEAS.</b>	<b>15</b>
1.8.1	Concentración de proteína	15
1.8.2	pH	15
1.8.3	Presión	16
1.8.4	Tipo de sales	16
1.8.5	Temperatura y tratamiento térmico de la leche previo a la acidificación	16
1.8.6	Condiciones de la acidificación	20

---

<b>1.9 REOLOGÍA Y SINÉRESIS EN PRODUCTOS LÁCTEOS ACIDIFICADOS</b>	<b>20</b>
<b>1.10 TENDENCIAS EN PRODUCTOS LÁCTEOS</b>	<b>24</b>
1.10.1 Probióticos	24
1.10.2 Los prebióticos	26
1.10.3 Simbióticos	27
1.10.4 Fibra	28
1.10.5 Lácteos enriquecidos en vitaminas y minerales	28
1.10.6 Fitoesteroles (Esteroles y estanoles vegetales)	28
1.10.7 Otros ingredientes utilizados para enriquecer los productos lácteos	29
<b>1.11 RUTAS METABÓLICAS DE CULTIVOS INICIADORES</b>	<b>29</b>
<b>1.12 EL YOGURT Y SUS BENEFICIOS</b>	<b>32</b>
<b>2. IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN</b>	<b>34</b>
<b>2.1 JUSTIFICACIÓN</b>	<b>34</b>
<b>2.2 HIPÓTESIS</b>	<b>35</b>
<b>2.3 OBJETIVO GENERAL</b>	<b>35</b>
<b>2.4 OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>35</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>36</b>
<b>3.1 MATERIALES</b>	<b>36</b>

---

3.1.1 Medios de cultivo	36
3.1.2 Leche, polisacáridos	36
<b>3.2 MÉTODOS</b>	<b>37</b>
3.2.1 Aislamiento y Purificación de bacterias ácido-lácticas	37
3.2.2 Conservación de las cepas aisladas	37
3.2.3 Reactivación de cepas conservadas	38
3.2.4 Formulación de bebidas lácteas	38
3.2.5 Cinética del proceso de fermentación	39
3.2.5.1 Preparación, etiquetado de las muestras y fermentación.	39
3.2.5.2 Cinética de gelificación, evolución de las propiedades viscoelásticas	40
3.2.5.3 Cinética microbiana: producción de ácido láctico	41
3.2.5.4 Cinética microbiana: evolución del pH	41
3.2.5.5 Cinética microbiana: evolución de biomasa	41
<b>3.3 PROPIEDADES REOLÓGICAS DE BEBIDAS FERMENTADAS</b>	<b>42</b>
<b>3.4 EVALUACIÓN CUALITATIVA DE SINÉRESIS</b>	<b>42</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>43</b>
<b>4.1 AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS</b>	<b>43</b>
<b>4.2 CINÉTICA DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN</b>	<b>45</b>
4.2.1 Evolución de las propiedades viscoelásticas	45
4.2.2 Cinética microbiana: producción de ácido láctico, evolución del pH y biomasa	51
4.2.3 Propiedades reológicas de bebidas fermentadas	54
4.2.4 Evaluación cualitativa de sinéresis	57

---

<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES PARA INVESTIGACIONES POSTERIORES</b>	<b>58</b>
<b>5.1 CONCLUSIONES</b>	<b>58</b>
<b>5.2 RECOMENDACIONES PARA INVESTIGACIONES POSTERIORES</b>	<b>59</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>60</b>

---

**ÍNDICE DE CUADROS**

- Cuadro 1.** Proteínas y fracciones de proteína encontradas en la leche de vaca (Fuente: Livney, 2010). 6
- Cuadro 2.** Efecto del tratamiento térmico y contenido de grasa en geles de leche ácida (Fuente: Lucey *et. al.*, 1998a). 18
- Cuadro 3.** Microorganismos probióticos utilizados en la elaboración de leches fermentadas (Fuente: Sánchez *et. al.*, 2009). 26
- Cuadro 4.** Descripción de tratamientos usados en las cinéticas de gelificación. 38
- Cuadro 5.** Resumen de las propiedades reológicas como acidez y pH que presenta cada sistema en el punto de gelificación y al finalizar la cinética de gelificación,  $t=6h$ . 48
- Cuadro 6.** Valores de las pendientes de  $G'=f(\omega)$  y  $G''=f(\omega)$ . Los valores de  $n$  y  $m$  corresponden a las pendientes de  $G'$  y  $G''$ , respectivamente. 54

---

**ÍNDICE FIGURAS**

- Figura 1.** Micela y sub-micela de caseína (Fuente: Walstra *et. al.*, 1999). 11
- Figura 2.** Diagrama esquemático de los cambios físicos ocurridos en la micela de caseína durante la acidificación de la leche (Fuente: Tamime, 2006). 13
- Figura 3.** Efecto en la microestructura del gel de yogurt debido a la temperatura de incubación, geles preparados bajo las siguientes condiciones: (a) 34°C, (b) 40°C, (c) 45.7°C. Leche con un previo tratamiento térmico a 82.5°C durante 30 minutos (Fuente: Tamime, 2006). 19
- Figura 4.** Microfotografías confocal de barrido láser (60X) de geles ácidos de leche. **A** y **B**) Sistema: Leche descremada (12% sólidos)-0.05% gelana. **C** y **D**) Sistema: Leche descremada (12% sólidos)-0.05% gelana-3mM CaCl<sub>2</sub>. Las zonas fluorescentes verdes revelan la presencia de redes de gelana mientras que las zonas rojas muestran la red de caseína. Las figuras **E** y **F** son las microfotografías de leche acidificada sola. Las figuras **G** y **H** muestran a gelana 0.05% en presencia de 3mM de CaCl<sub>2</sub>. Se presentan dos cortes transversales a lo largo del eje z de cada una de las muestras para identificar la distribución espacial de los biopolímeros (15µm) (Extraído de Trejo-Guerrero, 2010). 22
- Figura 5.** Separación de suero de muestras de “doogh” una bebida láctea fermentada iraní, después de 15 días de almacenamiento a 5°C; a) con gelana y b) con gelana y 0.25% de pectina de alto metoxilo (HMP). Las concentraciones usadas de gelana fueron (de izquierda a derecha): 0, 0.01, 0.03 y 0.05 % (Fuente: Kiani *et. al.*, 2010). 24

- 
- Figura 6.** Modelo propuesto para la interacción de caseinato de sodio con goma arábica (GA) en un descenso del pH. Arriba, se muestra la asociación de las moléculas de caseína formando agregados de gran tamaño; abajo, incorporación de las moléculas de GA en los agregados de caseinato de sodio, dando como resultado la formación de nanopartículas estables (Fuente: Ye, 2008). 24
- Figura 7.** Tipos de fibra y algunos ejemplos. 28
- Figura 8.** Mecanismos más utilizados por las bacterias ácido lácticas en la fermentación de lactosa a ácido láctico; PEP/PTS: Fosfofenol Piruvato: Sistema de Azúcar Fosfotransferasa (Fuente: Farnworth, 2008). 31
- Figura 9.** Prueba de antibióticos a) prueba por realizar, b) prueba negativa de presencia de antibióticos en leche. 36
- Figura 10.** Medio M1 con crecimiento de bacteria acidolácticas. 38
- Figura 11.** Frascos acondicionados para las unidades experimentales utilizadas durante las cinéticas fermentativas. 39
- Figura 12.** Fermentación de bebidas lácteas formuladas con leche descremada, gelana y pectina respectivamente. 40
- Figura 13.** Ilustración del Método de placa vertida usado en este trabajo. 42
- Figura 14.** Fotografías tomadas durante la fase experimental de este trabajo de investigación 1) Colonias de cocos pertenecientes a la cepa denominada Jsik utilizada en las distintas formulaciones para realizar las cinéticas fermentativas; 2) Bastones que corresponden a la cepa Lac2 obtenidas durante el proceso de aislamiento y purificación de las cepas. Micrografías electrónicas de yogurt natural

---

mostrando 3) un grupo de cocos *S. thermophilus* y 4) una colonia de bastones (*L. Delbrueckii subsp. bulgaricus*) (Microfotografías de yogurt tomadas de Tamime, 2006). 45

**Figura 15.** Evolución de los módulos viscoelásticos,  $G'$  (símbolos grises) y  $G''$  (símbolos negros) con respecto del tiempo, durante la fermentación de: a) Leche descremada 8% sólidos, b) Leche descremada 8% sólidos - 0.02% de gelana, c) Leche descremada 8% sólidos – 0.02% pectina. Mediciones realizadas a 40°C a  $\omega = 1$  rad/s, usando el valor mínimo de torca del equipo ( $T=10\mu\text{N m}$ ). Sólo se presentan los datos de una determinación para evitar saturación de símbolos en las gráficas. 47

**Figura 16.** Evolución del pH ( $\circ$ ) y acidez ( $\triangle$ ) durante la fermentación de leche descremada; **a) Leche 8% sólidos, b) Leche 8% sólidos - 0.02% de gelana, c) Leche 8% sólidos – 0.02% pectina.** Mediciones realizadas a temperatura ambiente cada 60 minutos. 52

**Figura 17.** Evolución de biomasa durante la fermentación de a) Leche 8% sólidos, b) Leche 8% sólidos-0.02% de gelana, c) Leche 8% sólidos-0.02% de pectina. 53

**Figura 18.** Espectro mecánico dinámico de geles de leche acidificada,  $G'$  (círculos),  $G''$  (cuadros) y  $\tan\delta$  (triángulos). Sistemas: a) Leche 8% sólidos, b) Leche 8% sólidos - 0.02% de gelana, c) Leche 8% sólidos – 0.02% pectina. Mediciones realizadas a 40°C a  $\omega = 1$  rad/s, usando el valor mínimo de torca del equipo ( $\sigma=0.03\text{Pa}$ ). Determinaciones realizadas 6 horas después de iniciada la fermentación. 56

**Figura 19.** Sinéresis en los diferentes tratamientos al día 15 de refrigeración; a) leche (8% sólidos), b) Leche 8% sólidos - 0.02% gelana, c) Leche 8% sólidos – 0.02% pectina. 57

**NOMENCLATURA**

G'	Módulo de almacenamiento [Pa]
G''	Módulo de pérdida [Pa]
p/p	Relación peso-peso
T	Temperatura [°C]
t	Tiempo, tiempo de observación s
T <sub>g</sub>	Temperatura de gelificación (G'/G'' =1)
tanδ	Cociente de G''/G'
s	Segundos
ks	kilo segundos
mM	Milimolar
μM	Micromolar
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
kDa	Kilo Daltones
Pa	Pascales
mL	mililitros
M1	Medio de cultivo 1
M1S	Medio de cultivo 1 sólido
v/v	Relación volumen-volumen
g/L	Gramos contenidos en un litro
p/v	Relación peso-volumen
°C	Grados Celsius
cm	Centímetros
h	Horas
%	Porcentaje
g <sub>ác. láctico</sub> /L	Gramos de ácido láctico por litro
1rad/s	Radianes por segundo

## RESUMEN

Actualmente, los productos lácteos fermentados han tomado auge comercial debido a su versatilidad y propiedades funcionales. La sinéresis es uno de los defectos más acusados en productos lácteos gelificados, y se describe como la tendencia que presentan los geles a exudar el disolvente ligado a las proteínas que conforman la red. La sinéresis es, la mayoría de las veces, un fenómeno indeseable, cuyas causas aún son objeto de debate. Frecuentemente, la sinéresis se asocia a defectos en la formación del gel durante el proceso de gelificación o a una contracción de éste por efecto del envejecimiento.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la cinética fermentativa de una bacteria ácido-láctica crecida en medios formulados con leche descremada y evaluar el efecto de la gelificación de un polisacárido aniónico (gelana y pectina de bajo metoxilo) en las propiedades reológicas de una bebida láctea, con la finalidad de contribuir al estudio y desarrollo de alimentos funcionales.

En el presente trabajo se llevó a cabo el aislamiento de bacterias ácido-lácticas de productos lácteos fermentados comerciales, a través de técnicas microbiológicas convencionales. Se usó una cepa aislada, la cual se identificó como *Streptococcus thermophilus*, para elaborar una bebida láctea fermentada usando leche en polvo rehidratada al 8% de sólidos, la cual se trató térmicamente (85°C, 30min) para mejorar las propiedades reológicas del gel láctico. Esta formulación se inoculó con 1% v/v del medio conteniendo la bacteria ácido-láctica ( $\sim 2$  a  $4 \times 10^6$  UFC/mL). Se preparó una muestra testigo (T) con leche únicamente, una muestra con 0.02% de gelana (LG) y una muestra con 0.02% de pectina de bajo metoxilo (LP), ambos polisacáridos fueron comerciales y grado alimentario. Las muestras inoculadas fueron evaluadas en su cinética microbiana (biomasa, producción de ácido láctico, evolución de pH) y cinética de gelificación (evolución de las propiedades viscoelásticas durante la gelificación). Al finalizar la fermentación se evaluaron las propiedades viscoelásticas de los geles formados y se realizó una evaluación

cualitativa de la sinéresis de los geles durante 15 días de almacenamiento en refrigeración.

Los geles elaborados con leche sola fueron los más suaves ( $G'$  menor), los geles LP resultaron más rígidos pero con menor estabilidad ( $\tan\delta=0.42$ ), mientras que los LG fueron más rígidos que los elaborados con leche sola pero con rigidez inferior a LP, sin embargo estos geles fueron más estables con el tiempo ( $\tan\delta= 0.20$ ) y los que presentaron menor exudación del disolvente. El sistema LG fue el que presentó mayor crecimiento bacteriano, incrementando la acidez del medio y generando los valores más bajos de pH al finalizar la fermentación ( $t=6$  h). Por lo tanto, la gelana puede ser una opción de aditivo estabilizante en productos lácteos fermentados, debido a su eficiencia en la cogelificación con las proteínas de la leche y a su capacidad de retención de agua.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 LECHE

La leche es la secreción de las glándulas mamarias de las hembras de mamíferos, elaborada para la nutrición de sus crías, esta palabra excluye el calostro y generalmente se refiere a la secreción en bovinos, cuando no es así siempre se hace la aclaración puntual del género de la hembra productora (Walstra y Jennes, 1987).

**1.1.1 Composición de la leche.** La leche es un líquido blanquecino compuesto aproximadamente por 88% de agua, 3.5% de grasa, 4.6% de lactosa, 0.71% de cenizas y 3.1% de proteínas, las cuales se dividen en tres grupos: las proteínas séricas, proteasas-peptonas y las caseínas, estas últimas con mayor importancia tecnológica debido a sus características de organización y propiedades funcionales (Badui, 2006).

**1.1.2 Proteínas de la leche.** Las proteínas lácteas se dividen de la siguiente manera (Alais, 1998):

**1.1.2.1 Las caseínas.** Complejo de proteínas fosforadas que constituyen la parte nitrogenada de la leche. Dentro de este grupo se encuentran también las  $\alpha$  caseínas que a su vez se dividen en  $\alpha_{s1}$  y  $\alpha_{s2}$ ;  $\beta$  caseína,  $\gamma$  caseína y  $\kappa$  caseína.

**1.1.2.2 Las proteínas del suero o solubles.** Se asemejan en propiedades a las albúminas y globulinas, que se insolubilizan por el calor antes de llegar a los 100°C. Una parte de estas proteínas no se sintetizan en la glándula mamaria, normalmente se encuentran en muy pequeñas cantidades. Entre éstas se encuentran la  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina y la sero-albúmina. Cabe mencionar que también se introducen como

proteínas a grupos no proteicos que poseen propiedades similares, dentro de los cuales destacan:

- a) *Proteosas-peptonas.*** Son sustancias glicoproteicas con un peso molecular intermedio entre las proteínas y el de los péptidos.
- b) *Sustancias nitrogenadas no proteicas.*** Constituyen una parte escasa, pero comprenden un gran número de sustancias de peso molecular inferior a 500Daltons. Estas sustancias son dializables y permanecen en solución en las condiciones en que se produce la precipitación de las proteínas. Su estructura química es muy variada.

La concentración de cada una de las distintas fracciones de proteínas en la leche de vaca se presenta en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Proteínas y fracciones de proteína encontradas en la leche de vaca (Livney, 2010).

Proteína	Contenido leche (g/L)	Peso molecular (kDa)
<b>Caseínas</b>		
$\alpha_{s1}$ ( $\alpha_{s1}$ - CN)	24-28	22.1-23.7
$\alpha_{s2}$ ( $\alpha_{s2}$ - CN)	12-15	25.2-25.4
$\beta$ ( $\beta$ -CN)	3-4	23.9-24.1
$\kappa$ ( $\kappa$ -CN)	9-11	19.0
<b>Proteínas séricas</b>		
$\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg)	2-4	18.3
$\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -la)	1-1.5	14.2
Seroalbúmina (BSA)	0.1-0.4	66 *
Inmunoglobulinas (Ig)	0.6-1.0	146-1,030
Lactoferrina (Lf)	<0.1	80
Glóbulos grasos y proteínas de la membrana	<0.4	13-200
Proteínas totales de la leche	30-35	

**1.1.3 Las caseínas.** Las caseínas pertenecen al grupo proteico de la leche con mayor valor tecnológico. El nombre de estas proteínas proviene del latín *caseus* que significa queso, son por definición fosfoglucoproteínas que precipitan de la leche descremada a un pH de 4.6 a 20°C, es decir, son proteínas que contienen tanto residuos de hidratos de carbono como grupos fosfato. Su estabilidad en el seno de la leche se debe a su fuerte carga eléctrica negativa, que cuando se encuentran en su punto isoeléctrico, son inestables. Su contenido de nitrógeno es aproximadamente del 15.6%, excepto en el caso de la fracción  $\kappa$  que es del 14.3%, ya que contiene una mayor cantidad de hidratos de carbono. Las moléculas de caseína se encuentran asociadas en forma de micelas aunque existe una pequeña cantidad que se encuentra en solución (Badui, 2006).

Las caseínas presentan las siguientes propiedades según Badui (2006):

1. Un alto contenido de ácido glutámico y aspártico, cuyos carboxilos se encuentran ionizados a pH 6.7 de la leche, ocasionando que siempre se mantenga con carga negativa que las estabiliza gracias a la repulsión que se genera entre ellas.
2. El aminoácido prolina, se encuentra distribuido homogéneamente a lo largo de la estructura primaria de las caseínas y provoca, por impedimentos estéricos, que no se formen hélices como estructura secundaria. A excepción de la caseína  $\kappa$  que presenta una pequeña porción de hélice.
3. Debido a que contienen más aminoácidos hidrófobos que hidrófilos, presentan dentro de su estructura primaria zonas francamente apolares.
4. Las caseínas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  son muy sensibles a la alta concentración de los iones calcio propios de la leche; éstas precipitarían sino fuese porque están recubiertas con las caseínas  $\kappa$ , que cumple una función protectora y estabilizadora.
5. Contienen regiones cargadas que les permite unirse electrostáticamente.
6. Presentan regiones fosforiladas que facilitan sus interacciones con el calcio.

## 1.2 GELES

La gelificación de proteínas se refiere a la transformación de una proteína en el estado “sol” a un estado “gel”, que se facilita por la acción de calor, enzimas o cationes divalentes bajo condiciones apropiadas y que inducen a la formación de una estructura de red, cuyos mecanismos de formación pueden diferir considerablemente (Badui, 2006). Un sol es un estado físico de un sistema coloidal formado por una fase dispersa sólida en una fase dispersante líquida (Badui, 2006).

Un gel típico en alimentos, es aquel que contiene una red continua, bien definida, constituida a partir de un polímero (fase sólida) y sumergida en un disolvente acuoso (fase líquida) (Clark, 1992). Los geles también pueden ser definidos como matrices o redes en las cuales las interacciones polímero-polímero y polímero-solvente ocurren en una manera ordenada dando resultado a la inmovilización de grandes cantidades de agua por una pequeña proporción de polímeros (Flory, 1974).

Clark y Ross-Murphy (1987), hicieron una clasificación de los geles de acuerdo al comportamiento al flujo que presentan en un periodo de tiempo establecido, dividiendo a los geles en dos grupos:

**1.2.1 Gel fuerte o verdadero.** Es aquel que forma una estructura macroscópica estable, mecánicamente capaz de auto-sostenerse.

**1.2.2 Gel débil.** Se describe como una red tridimensional de carácter transitorio, donde la componente elástica es menos evidente, por lo cual fluye más fácilmente cuando los esfuerzos aplicados son lo suficientemente grandes.

### 1.3 OTRA FORMA DE CLASIFICAR A LOS GELES

En términos de los elementos estructurales de la red formada, es aquel esquema que subdivide a las redes en cuatro categorías (Aguilera, *et. al.* 1999):

**1.3.1 Estructuras laminares bien ordenadas.** Aquí se encuentran los geles de jabones, y geles inorgánicos de arcillas y otros minerales.

**1.3.2 Redes de polímeros covalentes.** Incluye entidades poliméricas unidas covalentemente, algunas de ellas polifuncionales, es decir capaces

de conectar a más de dos entidades poliméricas, como por ejemplo los geles de poliacrilamida o caucho vulcanizado.

### **1.3.3 Redes de polímeros formados a través de agregaciones físicas.**

Ejemplifica geles físicos de polímeros entrelazados. Los geles de gelatina y de polisacáridos son un buen ejemplo de éstos, donde la molécula primaria de tamaño finito forma zonas de unión en puntos particulares a lo largo de la cadena del polímero.

### **1.3.4 Estructuras de partículas desordenadas.**

Aquí se encuentran los geles constituidos por agregados de partículas, los cuales forman una red con estructura continua que se extiende dentro del volumen atrapado. Los geles de leche acidificada se ubican dentro de esta clase particular de geles.

## **1.4 GELIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA LECHE**

Las proteínas gelifican por medio de una serie de pasos que involucran la desnaturalización, agregación, formación de cadenas al azar y formación de la red característica de un gel (Aguilera, 1995). Generalmente las relaciones de asociación se llevan a cabo a nivel de subunidades macromoleculares, a través de reacciones de polimerización o de agregación que implican la formación de complejos de gran tamaño. Los principales tipos de asociación entre proteínas se mencionan a continuación (Cheftel *et. al.*, 1992):

**1.4.1 Precipitación.** Es aquella que incluye todas las reacciones de agregación que conducen a una pérdida total o parcial de la solubilidad.

**1.4.2 Floculación.** Se refiere a reacciones de agregación desordenada que se producen en ausencia de desnaturalización y que a menudo se originan a causa de la falta de repulsiones electrostáticas entre cadenas.

**1.4.3 Coagulación.** Son reacciones de agregación desordenadas que se producen con desnaturalización y en las que predominan las interacciones proteína-proteína sobre las interacciones proteína-disolvente, lo cual conduce a la formación de un gran coágulo.

**1.4.4 Gelificación.** Se presenta cuando las moléculas desnaturalizadas se agregan para formar una red proteica ordenada que ocupa todo el volumen del sistema. En este caso la red de proteína inmoviliza el agua del sistema formando una matriz.

## **1.5 GELES EN LA ELABORACIÓN DE PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS**

Se debe básicamente a la desestabilización de las caseínas. Los geles formados son irreversibles y se pueden clasificar en tres grupos diferentes (Walstra *et. al.*, 1999).

**1.5.1 Geles enzimáticos.** Formados como resultado de la acción del cuajo, también llamado renina o quimosina, que desestabiliza la  $\kappa$ -caseína posibilitando la agregación de las caseínas en presencia de iones calcio.

**1.5.2 Geles térmicos.** Los cuales pueden ser la causa de los problemas de gelificación que presenta la leche UHT o evaporada cuando la fracción proteica no está bien estabilizada y puede ocurrir una desnaturalización.

**1.5.3 Geles ácidos.** Que son formados por consecuencia de la acidificación o fermentación ácida de la leche, por ejemplo el yogurt.

## 1.6 GELIFICACIÓN ÁCIDA DE LAS PROTEÍNAS

La gelificación ácida de la leche involucra principalmente cambios conformacionales de las caseínas (Fig. 1). Prácticamente todas las moléculas de caseína están asociadas entre sí integrando las micelas pero existe una pequeña cantidad que se encuentra en solución. Aunque las caseínas presentan características comunes, ciertas diferencias entre ellas determinan su funcionalidad en la leche, sobre todo para formar las submicelas y las micelas en suspensión. Todas las caseínas tienen secciones con una hidrofobicidad alta que proviene de los aminoácidos aromáticos y alifáticos, además de una carga neta negativa de los ácidos aspártico y glutámico; éstos dos factores son los que determinan su estabilidad y al mismo tiempo su solubilidad (Badui, 2006). Las zonas de carga negativa confieren a las caseínas la capacidad de fijación del calcio. La caseína  $\alpha_{s1}$ , tiene la carga más alta y el más alto contenido de fosfato, mientras que la caseína  $\alpha_{s2}$  presenta algunas variantes, contiene dos residuos de cisteína formando un puente —S—S—; y no tiene grupos de hidratos de carbono. La  $\beta$ -caseína es la más hidrofóbica y tiene un gran número de residuos de prolina. Por otro lado la  $\gamma$ -caseína es un producto de la degradación de la  $\beta$ -caseína (Walstra *et. al.*, 1999).

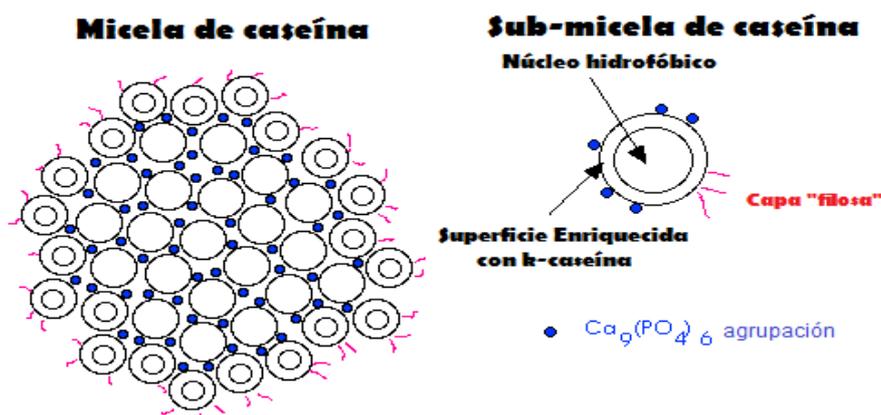


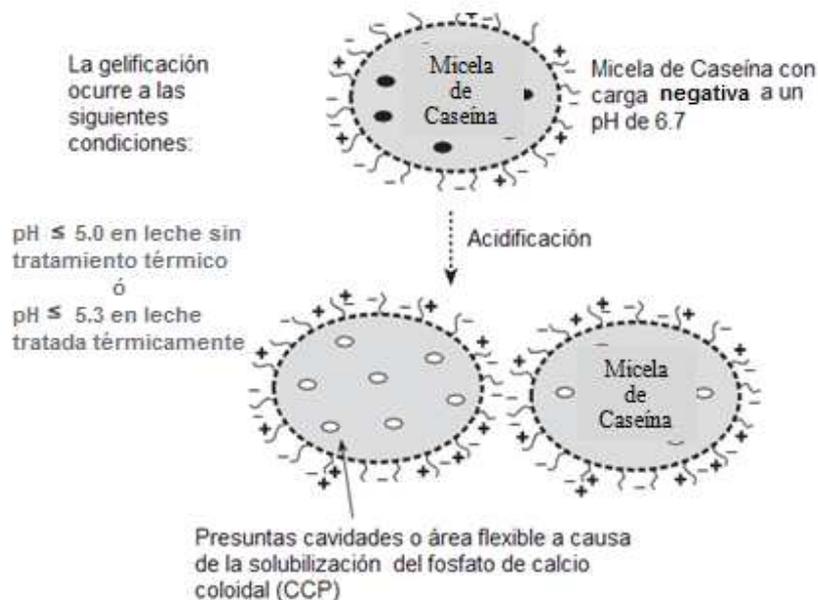
Figura 1. Micela y sub-micela de caseína (Walstra *et. al.*, 1999).

La  $\kappa$ -caseína es muy diferente a las otras caseínas, está presente en la leche como oligómeros de 5–11 moléculas, es soluble en presencia del calcio natural de

la leche, tiene una sección muy hidrofóbica (1-105) y otra hidrofílica (106-169), por lo que su mecanismo de acción es semejante al de los agentes emulsionantes que interaccionan en dos fases inmiscibles. Contiene residuos de galactosamina, galactosa, y uno o dos ácidos N-acetilneuroamínico (NANA o ácido o-siálico). La presencia de éstas fracciones glúcidas sobre el fragmento peptídico 106-169 acentúa el carácter hidrófilo de la parte -COOH terminal de la  $\kappa$ -caseína. La acción hidrolítica de la enzima renina sobre el enlace 105-106 provoca que pierda su capacidad estabilizadora (Walstra *et. al.*, 1999). De Kruif (1997) contempló alrededor de 14 ácidos carboxílicos en las moléculas de la  $\kappa$ -caseína que sobresalen de la micela, los cuales se encuentran disociados a valores de pH fisiológicos de 6.6-6.9. Así la carga de las moléculas de  $\kappa$ -caseína contribuye directamente a la estabilidad de las micelas de caseína y promueve a su vez la solubilidad de las  $\kappa$ -caseínas. Si la solubilidad de las  $\kappa$ -caseínas disminuye suficientemente, la superficie de las micelas tiende a colapsarse por lo que se presume existe una transición de estado “extendido” a estado “colapsado”, la cual procede a la floculación de las moléculas por la pérdida de estabilización estérica. Debido que se ha considerado a las micelas como una colección de partículas estabilizadas estéricamente por moléculas de  $\kappa$ -caseína, las cuales se describen frecuentemente como “zona pilosa de la micela”. Se puede evaluar el efecto de tratamientos tecnológicos en la micela simplemente considerando la respuesta de la “zona pilosa”. La desestabilización de las moléculas de la zona pilosa por la acción enzimática de la renina, la acidificación, la adición de calcio o etanol o la combinación de estos tratamientos originará el colapso y posteriormente la floculación de las micelas (De Kruif, 1997).

La capacidad de re-estabilización estérica de esta capa pilosa de las moléculas de  $\kappa$ -caseína se pierde al disminuir el pH del medio y acercarse al punto isoeléctrico de 4.6, aquí es donde las fuerzas de repulsión que habían mantenido estables a las micelas de caseínas comienzan a desaparecer gradualmente para dar paso a las fuerzas de atracción, y por tanto, a la agrupación de las micelas de caseína (colapso) en todo el sistema. La  $\kappa$ -caseína es insoluble en el punto isoeléctrico

debido a la ausencia de carga neta, por lo cual se observa un precipitado, la viscosidad en este momento es baja como resultado del pequeño tamaño de la partícula pero a medida que transcurre el tiempo se incrementa, debido al comienzo de la formación de la red (De Kruif, 1997). También existe una desmineralización de la caseína como consecuencia de que el calcio y del fósforo en estado coloidal se disocian y emigran hacia la solución en forma iónica (Alais, 1998).



**Figura 2.** Diagrama esquemático de los cambios físicos ocurridos en la micela de caseína durante la acidificación de la leche (Tamime, 2006).

Una vez formado el gel, éste depende de la microestructura que adopte. Entre los factores más estudiados y de mayor influencia en la microestructura y propiedades de los geles de proteína de la leche están (Tamime, 2006):

- a) Tratamiento térmico al cual se somete la leche
- b) Concentración de iones
- c) Velocidad de acidificación
- d) Temperatura durante la acidificación

Algunos estudios en geles ácidos de leche han hecho énfasis en el efecto que tiene el tratamiento térmico al cual se somete la leche previo a la acidificación, en la microestructura y en las propiedades mecánicas de los geles ácidos, observaron una red agrupada en geles elaborados con leche sin calentar, mientras que los geles de leche tratada térmicamente mostraron un tipo de red mejor definida. Por otra parte, estudios reológicos han evidenciado incremento en la rigidez del gel (medida a través del valor del módulo elástico,  $G'$ ) después de iniciada la acidificación de la leche tratada térmicamente (como ocurre en todos los geles), lo cual puede ser atribuido al incremento de la fusión de partículas originado por el arreglo de las fuerzas intermoleculares e intramoleculares. Además una alta fuerza iónica y grupos cargados de partículas de caseína podrían favorecer dicho incremento, mientras que las interacciones débiles entre partículas podrían resultar en una baja proporción del incremento de la rigidez del gel (Roefs *et. al.*, 1990; Lucey, 2001).

## **1.7 FACTORES INTRÍNSECOS QUE AFECTAN LA FORMACIÓN DE LOS GELES DE PROTEÍNA**

En la gelificación de las proteínas existen factores intrínsecos que determinan las características de los geles, entre los cuales se citan (Totosaus *et. al.*, 2002):

**1.7.1 Interacciones electrostáticas.** La carga neta de la molécula de proteína es modificada por las fuerzas atractivas y repulsivas, éstas afectan las interacciones proteína-proteína y proteína-solvente.

**1.7.2 Enlaces disulfuro e intercambio tio-bisulfuro.** Los enlaces covalentes disulfuro entre cadenas de polipéptidos involucrados en la gelificación de proteínas incrementan la longitud aparente de la cadena del polipéptido. Los enlaces disulfuro no son esenciales para la gelificación de

las proteínas, pero tienen incidencia en la habilidad para incrementar el peso promedio molecular y la longitud de la cadena.

**1.7.3 Peso molecular.** Algunos autores consideran que existe un peso molecular crítico del polipéptido para la formación del gel, usualmente se presume que es alrededor de 23,000 Da.

**1.7.4 Composición de aminoácidos.** Las proteínas que contienen menos del 31.5% mol de residuos hidrofóbicos forman un gel traslúcido mientras que las proteínas conteniendo arriba del 31.5% de residuos hidrofóbicos forman un coágulo tipo gel (Shimada y Matshushita, 1980).

**1.7.5 Afinidad por el disolvente.** Esto juega un papel importante en la organización de la proteína y debería ser tomado en cuenta en cualquier proceso de desnaturalización de proteínas.

## **1.8 FACTORES EXTRÍNSECOS QUE AFECTAN LA GELIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS LÁCTEAS.**

**1.8.1 Concentración de proteína.** Para la gelificación se requiere la formación de enlaces cruzados entre las macromoléculas y el número de éstos es proporcional a la concentración de proteína. Hay también un mínimo de concentración de la misma debajo de la cual no se puede formar una estructura tridimensional continua (Ferry, 1948).

**1.8.2 pH.** Existen factores que previenen las interacciones requeridas para la formación de la matriz del gel, por ejemplo, entre mayor sea la carga de la partícula de proteína, mayor es la repulsión electrostática entre moléculas vecinas. La carga neta de la proteína en el punto isoeléctrico es igual a cero, por lo tanto, valores de pH distantes del punto isoeléctrico promoverán repulsiones mayores entre cadenas vecinas (Tamime, 2006).

**1.8.3 Presión.** Afecta la transición sol-gel de soluciones proteicas, ya que las presiones altas modifican el volumen de las proteínas nativas y estos cambios podrían afectar el balance entre interacciones de estabilización y desestabilización dentro de la cadena del polipéptido y con el disolvente.

**1.8.4 Tipo de sales.** Iones monovalentes ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  y  $\text{Cs}^+$ ) forman un fino entramado a fuerzas iónicas menores a 0.1M. La formación de la matriz gelificada también puede ocurrir cuando la suspensión de la proteína contiene bajas concentraciones (10-20mM) de cationes divalentes ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ) a pH 7.0 (Foegeding *et. al.*, 1995).

**1.8.5 Temperatura y tratamiento térmico de la leche previo a la acidificación.** Es uno de los parámetros más importantes que afecta a la estructura de los geles ácidos de la leche como el yogurt (Lucey *et. al.*, 1998). Es la fuerza motriz de la desnaturalización, paso inicial de la gelificación de muchas proteínas. El tratamiento térmico aplicado a una suspensión de proteínas determina el tiempo de gelificación, en el caso de la leche, los tratamientos térmicos a temperaturas superiores a 85°C genera una disminución del tiempo de gelificación y un incremento del pH de gelificación (ver Cuadro 2) (Tamime y Robinson, 1991). Un alto tratamiento térmico de la leche se ha asociado a valores mayores de rigidez de los geles ácidos de leche (Lucey *et. al.*, 1998) pero con mayor tendencia a fracturarse (geles quebradizos).

Cuando se aplica el tratamiento térmico por periodos prolongados se alteran las características fisicoquímicas de las caseínas además de desnaturalizar las proteínas séricas, más del 80% de la  $\beta$ -lactoglobulina se une a la  $\kappa$ -caseína, promoviendo así la textura (tal como el yogurt), o viscosidad (yogurt batido), reflejado en el producto final (Tamime, 2006). Lucey *et. al.*, (1998) propusieron que cuando la leche calentada es acidificada, las proteínas de suero desnaturalizadas y asociadas a las micelas de caseína favorecen la formación de agregados de caseína debido

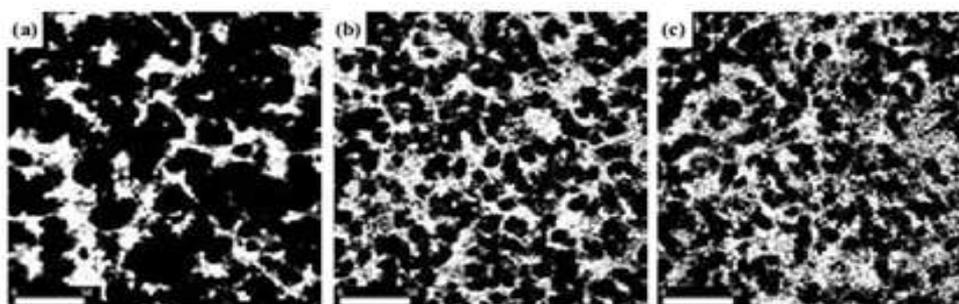
a que el descenso del pH disminuye las fuerzas repulsivas caseína-caseína; por lo tanto, las proteínas desnaturalizadas del suero actúan como puentes entre las partículas de caseína, resultando en un incremento en el número y en la fuerza de los enlaces entre partículas de proteína. Las proteínas de suero desnaturalizadas tienen pH en el punto isoeléctricos ligeramente más altos que las caseínas. El pH isoeléctrico de la principal proteína del suero,  $\beta$ -lactoglobulina, es  $\sim 5.3$ . Esto explica el hecho de que la agregación y gelificación de leches calentadas se inicia a valores de pH mayores al punto isoeléctrico de la caseína (*i.e.* 4.6). Por otra parte, se ha reportado que la máxima hidratación de las caseínas de la leche se da cuando la leche es calentada a  $85^{\circ}\text{C}$  y disminuye gradualmente a medida que aumenta la temperatura, opinión compartida por varios investigadores (Tamime, 2006). Esta disminución de las propiedades hidrofílicas de los complejos caseínas- $\beta$ -lactoglobulina puede tener un efecto no deseable sobre la calidad del yogurt, posiblemente aumentando la tendencia a la sinéresis.

**Cuadro 2.** Efecto del tratamiento térmico y contenido de grasa en geles de leche ácida (Lucey *et al.*, 1998a).

Tratamiento térmico y % de grasa	Gelificación		Módulo de almacenamiento G' (Pa)
	Tiempo (ks)	pH	
<b>Sin tratamiento térmico</b>			
0.0	20.5±1.7	4.87±0.02	14±2.6
1.5	21.1±3.4	4.86±0.03	15±1.3
3.5	24.1±0.1	4.84±0.01	17±0.2
<b>75 °C por 30 minutos</b>			
0.0	15.7±1.2	5.11±0.03	23±8.8
1.5	14.5±1.0	5.16±0.04	48±6.0
3.5	11.7±1.9	5.19±0.03	52±7.0
<b>80 °C por 30 minutos</b>			
0.0	6.8±0.4	5.33±0.04	365±12.1
1.5	6.7±1.1	5.34±0.03	382±27.4
3.5	6.4±0.6	5.38±0.02	434±35.9
<b>90 °C por 30 minutos</b>			
0.0	6.3±0.5	5.35±0.03	432±25.2
1.5	6.7±1.0	5.34±0.02	450±20.8
3.5	5.5±0.6	5.40±0.04	487±42.1

De acuerdo con Gálvez-Mariscal *et al.* (2006) la gelificación de las proteínas de la leche tiene lugar en dos etapas, primero se produce una alteración de la estructura, causando la desnaturalización, esto con ayuda de calentamiento, la proteína se despliega, exponiendo numerosos grupos funcionales, como los puentes de hidrógeno y los grupos hidrofóbicos. Un segundo estado es la formación de una red de proteína entre las moléculas desplegadas, a menudo irreversible. Cuando el progel se enfría, a temperatura ambiente o a temperatura de refrigeración, baja la energía cinética y esto facilita la formación de uniones estables no covalentes gracias a la exposición de grupos funcionales, de varias moléculas, lo que constituye la gelificación. Estudios de microscopía electrónica de barrido en geles de leche obtenidos a partir de leche sometida y no sometida a tratamiento térmico, muestran algunas diferencias importantes en las

características de la micela de caseína; en el caso de la leche con tratamiento térmico, el gel se forma a medida que las micelas aumentan de tamaño y forman una matriz reticular. Por el contrario, las micelas de caseína de la leche sin tratamiento térmico forman agregados o racimos, quedando la proteína distribuida de modo heterogéneo. Un estudio realizado con leche calentada a 82.5°C durante 30 minutos demostró la existencia de apéndices filamentosos formados por  $\beta$ -lactoglobulina y  $\kappa$ -caseína, su presencia en el gel formado en la leche tratada térmicamente inhibe la coalescencia de las micelas, dando lugar a geles más firmes con menor tendencia a la sinéresis, cabe mencionar que también la temperatura de incubación determina la estructura y firmeza del gel como se muestra en la Figura 3.



Muestras de yogurt			
Propiedades	(a)	(b)	(c)
Sinéresis (s)	2.85	1.07	0.41
Permeabilidad, porosidad ( $10^{-13} \text{ m}^2$ )	2.25	1.52	1.13
Firmeza $G'$ (Pa)	136	204	246

**Figura 3.** Efecto en la microestructura del gel de yogurt debido a la temperatura de incubación, geles preparados bajo las siguientes condiciones: (a) 34°C, (b) 40°C, (c) 45.7°C. Leche con un tratamiento térmico previo a 82.5°C durante 30 minutos (Tamime, 2006).

Por otra parte, la desnaturalización de las globulinas de la leche como resultado del tratamiento térmico determina una disminución del espesor de la capa de crema formada en ésta. La separación de la grasa en la leche fría está determinada por la acción de las globulinas que favorecen la agrupación de los

glóbulos de grasa, los cuales ascienden a la superficie. Por esta razón, la desnaturalización de globulinas suele ser positiva para los pequeños fabricantes de yogurt, cuyas líneas de proceso no incluyen la etapa de homogenización. Además la leche sometida a tratamiento térmico se vuelve más blanca, fenómeno previo a un pardeamiento de la misma. De acuerdo con Tamime (2006) esto podría atribuirse a:

- I. Floculación de las proteínas del suero;
- II. Modificación de los agregados de caseína;
- III. Paso del calcio soluble a un estado coloidal o insoluble.

**1.8.6 Condiciones de la acidificación.** Una acidificación lenta y homogénea favorece la formación del gel láctico; por ello, es mejor la acidificación microbiana que con ácidos orgánicos. Los microorganismos lácticos forman geles lisos y homogéneos, cuyo volumen es igual al que ocupa inicialmente la leche, lo que no sucede cuando se forman por acidificación por ácidos orgánicos (Santos, 1987; Lucey *et. al.*, 1998b). En general, una excesiva proporción del desarrollo de la acidez a altas temperaturas de incubación contribuye a la salida del suero y a una gelificación pobre. Como recomendación general se han sugerido temperaturas de incubación bajas, cercanas a 38°C para mejorar la firmeza, viscosidad y reducir la sinéresis del gel ácido de leche (Santos, 1987; Lucey *et. al.*, 1998b).

## 1.9 REOLOGÍA Y SINÉRESIS EN PRODUCTOS LÁCTEOS ACIDIFICADOS

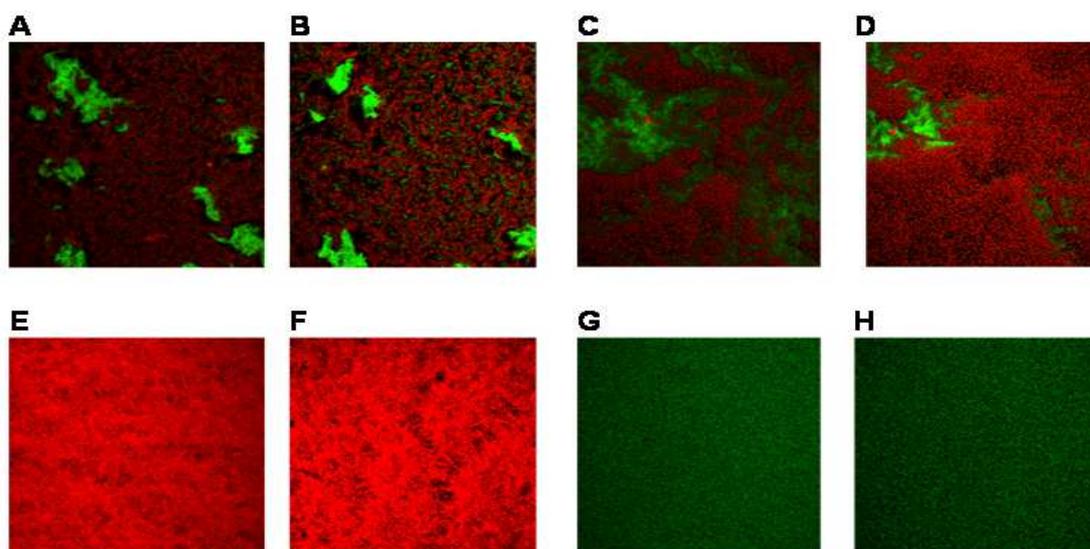
La sinéresis es uno de los defectos más acusados en productos gelificados, y se describe como la tendencia que presentan los geles a exudar el disolvente ligado a las macromoléculas (proteínas y polisacáridos) que conforman la red (Aguilera, 1995). La sinéresis es, la mayoría de las veces, un fenómeno indeseable que puede originarse por un descenso en el pH o por un incremento en la temperatura de proceso. Las causas que generan la sinéresis de geles de leche no son aún

definidas, la sinéresis se ha asociado a defectos en la formación del gel durante el proceso de gelificación o a una contracción de éste por efecto del envejecimiento. En estudios realizados por el grupo de investigación de Lucey (Lucey *et. al.*, 1998; Lucey, 2001) se concluye que las principales condiciones que llevan a la sinéresis en geles ácidos de leche son:

- ✓ Temperaturas altas de incubación (por ejemplo 45°C comparado con 30°C)
- ✓ Alta velocidad de acidificación (por ejemplo el uso de acidificantes como la glucono-delta- lactona en lugar de cultivos lácticos)
- ✓ Tratamiento térmico excesivo de la leche (por ejemplo  $\geq 80^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos)
- ✓ Bajo contenido de sólidos totales (especialmente proteína pero también grasa si la leche es homogeneizada)
- ✓ Producción baja de ácido (por ejemplo pH 4.9 en comparación con 4.6)
- ✓ Contenedores con paredes inclinadas (éstos causan esfuerzos adicionales sobre el gel, lo cual puede generar encogimiento de éste)
- ✓ Agitación durante la gelificación (disturbios cuando el gel es aún débil)
- ✓ Fusión continua de las partículas agregadas de la caseína (contracción de la red) durante el envejecimiento del gel.
- ✓ Disminución en la solvatación, es decir disminución del agua ligada a la red formada por las proteínas.
- ✓ Rearreglos de la red de las micelas de paracaseína antes y durante el proceso de gelificación, esto se ha asociado como la causa principal de la sinéresis.

En geles ácidos de leche tratada térmicamente, la tendencia a exhibir separación de suero se ha relacionado con propiedades reológicas como deformaciones bajas a la fractura e incrementos en  $\tan\delta$  (cociente entre módulo de pérdida  $G''$  y módulo de almacenamiento  $G'$ ), durante el proceso de gelificación. El incremento en los valores de  $\tan\delta$  en los geles ácidos de leche indica que se favorece la relajación de enlaces en el gel, lo cual conlleva al colapso de la red y a la exudación del disolvente (Lucey, 2001).

En trabajos recientes se ha relacionado la reología con la microestructura de los geles ácidos de leche en presencia de gelana al 0.05% con y sin calcio adicionado a la formulación previo a la acidificación con glucono-delta-lactona (Trejo-Guerrero, 2010). Los geles de leche (12% sólidos) en presencia de gelana fueron más rígidos que los geles en ausencia de este polisacárido. La adición de 3mM de  $\text{CaCl}_2$  a los geles leche-gelana no afectó la rigidez del sistema ( $G'$ ). La Figura 4 muestra las microfotografías de los geles ácidos de leche en presencia de gelana y los correspondientes a leche y gelana solas, determinadas por microscopía confocal de barrido láser llevadas a cabo por Trejo-Guerrero (2010). En los sistemas de los componentes solos se observó una red continua, aunque en los geles de leche se detectó menor uniformidad que en los geles de gelana, puesto que fue posible observar una red “burda” con espacios intersticiales (zonas oscuras) menos uniformes a través del gel.



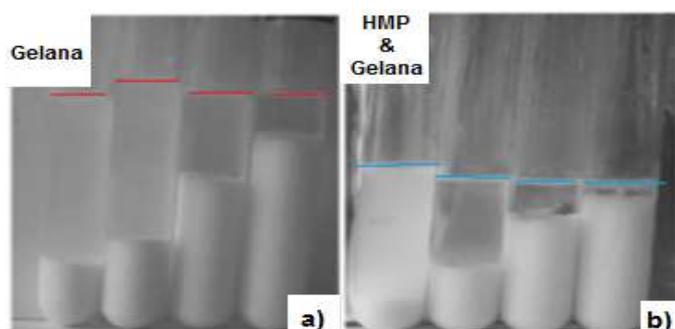
**Figura 4.** Microfotografías confocal de barrido láser (60x) de geles ácidos de leche. **A y B)** Sistema: Leche descremada (12% sólidos)-0.05% gelatina. **C y D)** Sistema: Leche descremada (12% sólidos)-0.05% gelatina-3mM  $\text{CaCl}_2$ . Las zonas fluorescentes verdes revelan la presencia de redes de gelatina mientras que las zonas rojas muestran la red de caseína. Las figuras **E y F)** son las microfotografías de leche acidificada sola. Las figuras **G y H)** muestran a gelatina 0.05% en presencia de 3mM de  $\text{CaCl}_2$ . Se presentan dos cortes transversales a lo largo del eje z de cada una de las muestras para identificar la distribución espacial de los biopolímeros (15  $\mu\text{M}$ ) (extraído de Trejo-Guerrero, 2010).

La presencia de calcio en las proporciones usadas en ese trabajo promovieron esta asociación generando redes fuertes que aparentemente inmovilizaron

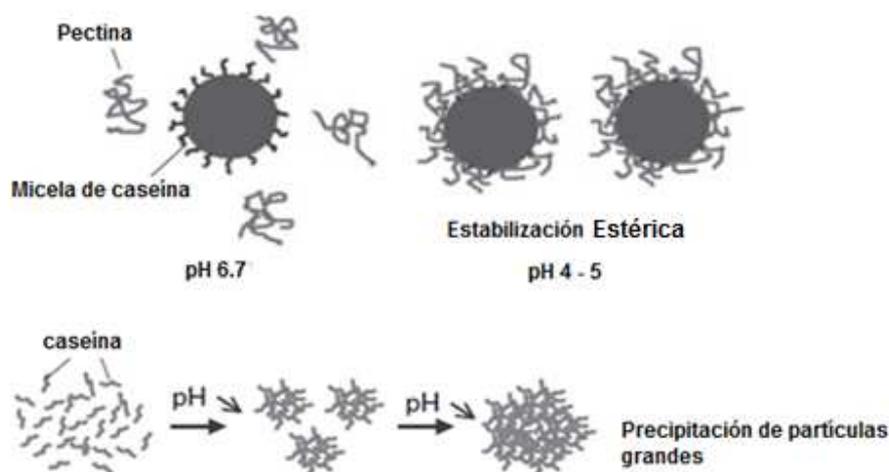
totalmente al agua dando lugar a un comportamiento reológico de gel fuerte como se ha reportado anteriormente para gelana 0.05% con 3mM  $\text{CaCl}_2$  (Pérez-Campos, 2008). En los geles de leche en presencia de gelana se pudo observar la gelificación de gelana (zonas verdes) y caseína (zonas rojas) coexistiendo en dominios ricos en cada biopolímero. En el sistema LGCa (leche-gelana-calcio) fue evidente una red de caseína más burda que envuelve a las zonas gelificadas de gelana. Por otra parte, en el sistema conformado por leche y gelana únicamente, la red de gelana parece estar entremezclada con la red de caseína. Trejo-Guerreo (2010) describió estas observaciones como la posible formación de una red de gelana que cogelifica para estabilizar la red de partículas de caseína.

Trejo-Guerrero (2010) realizó mediciones de la sinéresis espontánea de los geles ácidos de leche en presencia de gelana y concluyó al término del periodo de observación (16 días): la presencia de gelana y  $\text{CaCl}_2$  3mM, redujeron la sinéresis de los geles de leche ácida hasta en un 68%, mientras que la presencia de gelana en ausencia de  $\text{CaCl}_2$  reduce la exudación de agua en un 59%, por lo que la presencia de gelana fue más determinante que la de  $\text{CaCl}_2$  en los geles de leche acidificados con glucono-delta-lactona.

Otros estudios también han mostrado que la presencia de gelana en productos lácteos fermentados favorece la disminución de sinéresis y este efecto es más eficaz cuando gelana se mezcla con pectina de alto metoxilo (Kiani *et. al.*, 2010). En la Figura 5 se presentan las imágenes del efecto cualitativo de la adición de gelana (Fig. 5a) y gelana-pectina de alto metoxilo (Fig. 5b). El mecanismo de acción de gelana, en la estabilización de caseína durante la acidificación de la leche, aún no se ha reportado. Algunos estudios de geles ácidos de leche con polisacáridos como  $\kappa$ -carragenina y pectinas, han concluido que existe una capa de polisacárido que se adsorbe en la superficie de la micela de caseína, mientras que el resto de polisacárido gelifica estabilizando el gel mixto (Ji *et. al.*, 2008; Ye, 2008), la Figura 6 ilustra esta teoría.



**Figura 5.** Separación de suero de muestras de “doogh” una bebida láctea fermentada iraní, después de 15 días de almacenamiento a 5°C; a) con gelana y b) con gelana y 0.25% de pectina de alto metoxilo (HMP). Las concentraciones usadas de gelana fueron (de izquierda a derecha): 0, 0.01, 0.03 y 0.05 % (Kiani *et. al.*, 2010).



**Figura 6.** Modelo propuesto para la interacción de caseinato de sodio con goma arábiga (GA) en un descenso del pH. Arriba, se muestra la asociación de las moléculas de caseína formando agregados de gran tamaño; abajo, incorporación de las moléculas de GA en los agregados de caseinato de sodio, dando como resultado la formación de nanopartículas estables (Ye, 2008).

## 1.10 TENDENCIAS EN PRODUCTOS LÁCTEOS

**1.10.1 Probióticos.** Fue Metchnikoff fue el primero en proponer la adición de bacterias como probióticos en alimentos en 1907 (Mckinley, 2005), pero este término no se acuñó hasta 1965 cuando Lilly y Stillwell lo utilizaron

para denominar a las sustancias producidas por microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos diferentes. En 1989, Fuller los redefine como “suplemento dietético a base de microbios vivos, que afectan de forma beneficiosa al huésped mejorando su equilibrio intestinal”. Una definición más reciente cita que “Probióticos, son microorganismos vivos que cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al huésped efectos saludables” (FAO/WHO, 2002).

Para Sánchez *et. al.* (2009) los probióticos son microorganismos contenidos en algunos alimentos de manera definida y viable en grado suficiente para modificar la flora intestinal del huésped, ejerciendo así un efecto benéfico sobre su salud. La característica principal de los probióticos es que permanecen vivos durante su paso por el tracto intestinal sobreviviendo a las enzimas que intervienen en la digestión, incluso pueden sobrevivir al pH y a la acidez gástrica así como a la bilis. En el Cuadro 3 se presenta una lista de los principales microorganismos probióticos utilizados en leches fermentadas.

**Cuadro 3.** Microorganismos probióticos utilizados en la elaboración de leches fermentadas (Sánchez *et. al.*, 2009).

<b>Género</b>	<b>Especie</b>
<b>Lactobacillus</b>	<i>L. acidophilus</i> (cepas LC1, La1, La5, La7 )
	<i>L. casei</i> (cepas Shirota, GG, LGG, Inmunitass)
	<i>L. rhamnosus</i> CC
	<i>L. johnsonii</i>
	<i>L. helveticus</i>
	<i>L. delbrüeckiiibularicus</i>
	<i>L. gasseri</i>
	<i>L. plantarum</i>
	<i>L. paracasei</i> <i>paracasei</i>
	<b>Pediococcus</b>
<b>Bifidobacterium</b>	<i>B. bifidum</i>
	<i>B. breve</i>
	<i>B. longum</i>
	<i>B. adolescentes</i>
	<i>B. infantis</i>
	<i>B. lactis</i>
<b>Lactococcus</b>	<i>L. lactislactis</i>
<b>Enterococcus</b>	<i>E. faecium</i>
<b>Saccharomyces</b>	<i>S. boulardii</i>

**1.10.2 Los prebióticos.** Los prebióticos son sustancias alimenticias que nutren a un grupo selecto de microorganismos que habitan en el intestino. Favorecen la proliferación de las bacterias benéficas más que las perjudiciales (Guarner *et. al.*, 2008). A diferencia de los probióticos, la mayoría de los prebióticos se utilizan como ingredientes de alimentos en galletitas, cereales, chocolate, cremas de untar, y productos lácteos, por ejemplo. Los prebióticos conocidos comúnmente son:

- Oligofruktosa

- Inulina
- Galacto-oligosacáridos
- Lactulosa
- Oligosacáridos de la leche de pecho (Guarner *et. al.*, 2008).

Los prebióticos son ingredientes no digeribles de la dieta, que producen efectos beneficiosos estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de uno o más tipos de bacterias en el colon, las que tienen a su vez la propiedad de elevar el potencial de salud del huésped (De las Cagigas y Blanco-Anesto, 2002). Son fundamentalmente fructo y galacto oligosacáridos. Incluida en este concepto está la fibra dietética; que recientemente se define como el citoesqueleto de los vegetales, una sustancia aparentemente inerte que puede ser fermentada por algunas bacterias, pero no desdoblada por las enzimas digestivas, por lo que resulta imposible de ser absorbido por el huésped. Para que una sustancia sea definida como tal, debe cumplir por lo menos los siguientes requisitos:

- De origen vegetal.
- No digerible por las enzimas digestivas.
- Parcialmente fermentada por las bacterias colónicas.

**1.10.3 Simbióticos.** La combinación de prebióticos con probióticos se ha definido como simbiótico, la cual beneficia al huésped mediante el aumento de la sobrevivencia e implantación de los microorganismos vivos de los suplementos dietéticos en el sistema gastrointestinal. Se ha descrito un efecto sinérgico entre ambos, es decir, los prebióticos pueden estimular el crecimiento de cepas específicas con efectos beneficiosos para la salud. Un ejemplo de este sinergismo lo constituye la relación de la cantidad de fibra dietética, en la dieta, con la microflora intestinal: una dieta pobre en fibra puede producir cambios en la ecología de la microflora intestinal y una disminución en la población de *Lactobacillus* con aumento de bacteroides

capaces de desdoblar los ácidos biliares secundarios en compuestos carcinogénicos, como el deshidronorcoleno y el metilcolantreno (De las Cagigas y Blanco-Anesto, 2002).

**1.10.4 Fibra.** La función de la fibra es incrementar el bolo fecal y mejorar la motilidad intestinal. Algunos polisacáridos provenientes de frutos como son los cítricos principalmente, se pueden utilizar en bajas cantidades como estabilizantes en las bebidas lácteas fermentadas entre otros productos derivados de la leche (Figura 7).



Figura 7. Tipos de fibra y algunos ejemplos.

**1.10.5 Lácteos enriquecidos con vitaminas y minerales.** La industria ha optado por enriquecer los productos lácteos fermentados con vitaminas como la A, D y el complejo B, además de minerales como el calcio o hierro, esto muchas veces para suplir las pérdidas que se suscitan durante el procesamiento de los productos, un ejemplo muy común es la pérdida de las vitaminas liposolubles al descremar la leche.

**1.10.6 Fitoesteroles (esteroles y estanoles vegetales).** Los fitoesteroles y sus formas reducidas, los fitoestanoles, son esteroles de origen vegetal ampliamente distribuidos en la naturaleza y cuya estructura es muy similar a la del colesterol. Desde hace años se conoce que estos esteroles producen efectos hipocolesterolémicos cuando son ingeridos en el rango de 1-3 g/día, por lo cual se les considera como importantes aliados en la prevención de las enfermedades cardiovasculares, siendo su consumo indicado para individuos con hipercolesterolemias leves o moderadas. El

efecto hipocolesterolémico de los fitoesteroles y de los fitoestanoles es atribuido a tres acciones metabólicas: inhiben la absorción intestinal de colesterol por competencia en la incorporación del colesterol a las micelas mixtas; disminuyen la esterificación del colesterol en los enterocitos al inhibir la actividad de la enzima acilCoA-colesterol-acil transferasa, y estimulan el eflujo de colesterol desde los enterocitos hacia el lumen intestinal al aumentar la actividad y la expresión de un transportador de tipo ABC. La acción conjunta de los esteroles y/o estanoles sobre estos mecanismos produce una disminución del colesterol total plasmático y del colesterol-LDL, sin modificar los niveles del colesterol-HDL. Los fitoesteroles y fitoestanoles constituyen un modelo muy adecuado para el desarrollo de alimentos funcionales. Actualmente en diferentes países se comercializan leches, jugos, yogurt y margarinas que contienen ya sea fitoesteroles o fitoestanoles (Valenzuela y Ronco, 2004).

**1.10.7 Otros ingredientes utilizados para enriquecer los productos lácteos.** Jalea real, *Aloe vera*, tila, melisa, proteínas de soya o ácidos linoleicos conjugados (CLA) entre otros. Cada uno de ellos dota a las leches fermentadas propiedades añadidas determinadas, convirtiéndolas en “revitalizantes”, “relajantes”, “benéficas para la piel” o incluso “adelgazantes”.

## 1.11 RUTAS METABÓLICAS DE CULTIVOS INICIADORES

Los microorganismos cubren sus necesidades energéticas por diferentes vías, por ejemplo el sistema citocromo de transporte de electrones, las enzimas de las rutas anapleróticas, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos o la fermentación. Las bacterias ácido-lácticas no poseen ninguno de los primeros tres sistemas antes mencionados, por lo que sólo pueden obtener la energía a partir de la fermentación de los hidratos de carbono; siendo la lactosa el único azúcar

presente en la leche y utilizado para este fin por los microorganismos iniciadores (Tamime y Robinson, 1991).

Una fermentación es una reacción de óxido-reducción interna equilibrada en la que algunos átomos de la fuente de energía (donador de electrones) se reducen mientras otros se oxidan, y la energía se produce por fosforilación a nivel de sustrato. Una ruta bioquímica muy utilizada para la fermentación de la glucosa es la glucólisis, también denominada vía de Embden-Meyerhof en atención a sus descubridores (Madigan *et. al.*, 2006).

La fermentación ácido láctica homofermentativa es aquella donde el azúcar es metabolizado vía glicolítica o por el sistema Embden-Meyerhof. Las siguientes enzimas son claves en la fermentación (Walstra *et. al.*, 1999):

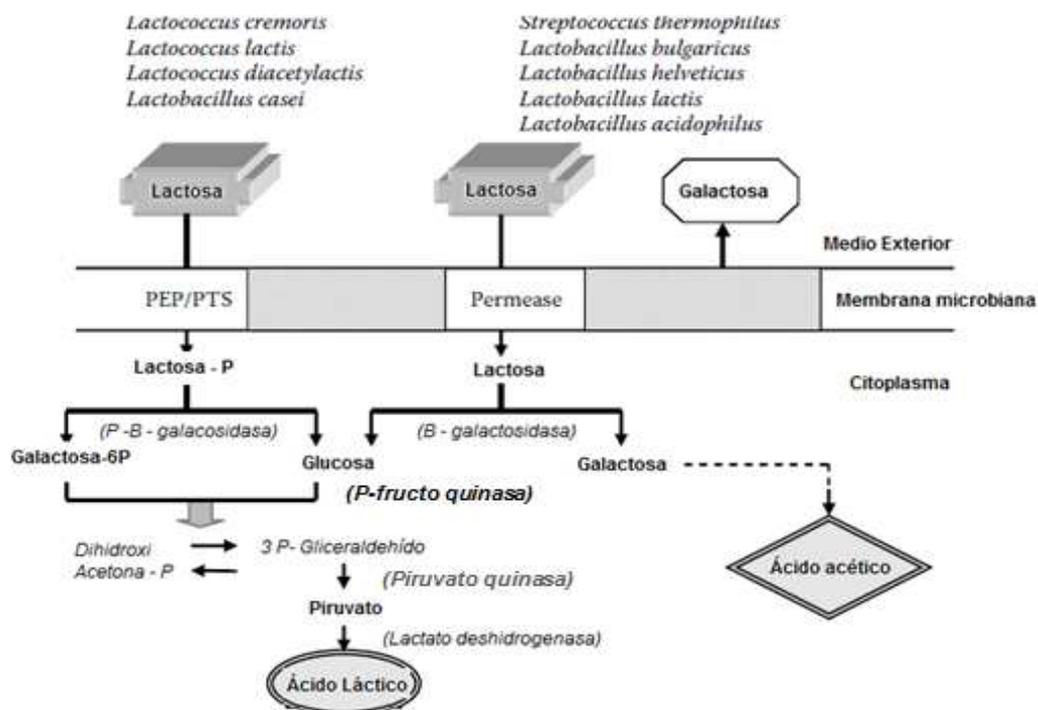
- a. **Aldosas**. Necesarias para hidrolizar las hexosas disponibles del gliceraldehído-3-P.
- b. **Piruvato quinasa(PK)**. Esencial para la formación de piruvato a partir de fosfofenol piruvato (PEP) (el PEP también pierde su capacidad de fosforilación en el sistema fosfotransferasa (PTS)
- c. **Lactato deshidrogenasa** (LDH), esencial para la producción de ácido láctico a partir de piruvato.

La actividad de estas enzimas se encuentra regulada por la fermentación del azúcar, los factores más importantes que se ven envueltos en este proceso son:

- a. Formación de PEP activando el desdoblamiento del azúcar por el sistema PEP/PTS.
- b. Metabolitos intermediarios en la fosforilación en la formación de 3-P, como hexosa difosfato, activación de PK y LDH.
- c. NADH, formado durante la hidrólisis de gliceraldehído-3-P, que puede ser oxidado a ácido láctico para la producción de piruvato.

Los resultados de estos factores son esenciales para las bacterias homofermentativas de ácido láctico, comportándose como “una bomba de ácido láctico”; si la glicólisis es óptima, ellas pueden convertir del 90% al 95% de los azúcares en ácido láctico. Si la glicólisis es mínima, especialmente si no queda azúcar, la formación de hexosa difosfatos decrece. A causa de esto, la actividad del PK y LDH decrecen también.

Por otro lado, la acumulación de fosfato inorgánico en las células disminuye parte de la actividad del PK presente. Como resultado de esto se obtiene la acumulación de PEP sobre los precursores 3-fosfo y 2-fosfoglicerol (PEP potencial). Cuando el azúcar se encuentra disponible de nuevo, el contenido de fosfatos inorgánicos decrecen y el potencial PEP es inmediatamente utilizado en su totalidad por los azúcares que aumentaron. La Figura 8 esquematiza los mecanismos más utilizados por las bacterias ácido lácticas en la fermentación de lactosa a ácido láctico.



**Figura 8.** Mecanismos más utilizados por las bacterias ácido lácticas en la fermentación de lactosa a ácido láctico; PEP/PTS: Fosfofenol Piruvato: Sistema de Azúcar Fosfotransferasa (Farnworth, 2008).

## 1.12 EL YOGURT Y SUS BENEFICIOS

Probablemente el yogurt es la bebida más popular dentro de los lácteos fermentados, debido a su composición variada (componentes grasos y materia seca) o bien por los ingredientes que pueden ser agregados como frutas, azúcar, agentes gelificantes (Walstra *et. al.*, 1999). La flora del yogurt consiste en bacterias ácido lácticas termófilas como *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii spp.* Para promover un sabor agradable, es necesario agregar la misma cantidad de ambas cepas. Estas cepas poseen un efecto que estimula el crecimiento una de la otra. Los bastones dan paso al crecimiento de los cocos para la formación de pequeños péptidos y amino ácidos, donde uno de los aminoácidos más importantes es la valina (Walstra *et. al.*, 1999). Según la definición de la FAO-OMS (2002): “el yogurt es una leche coagulada obtenida por la fermentación ácido láctica, debida a *Lactobacillus bulgaricus* y a *Streptococcus thermophilus* agregados a la leche”. Según el reporte de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT 2006). el yogurt es la bebida láctea fermentada más consumida por los niños mexicanos, pues el 35% de los niños menores de 5 años de edad lo consumen con frecuencia, esto debido a que es una excelente fuente de calcio (11%) y de zinc (8%), minerales importantes en la edad preescolar entre otros minerales y nutrientes propios de la leche. El consumo de yogurt en México es relativamente bajo. En adultos mexicanos es del 26%, el consumo per cápita es de 18.4mL/día; registrándose el mayor consumo en las regiones urbanas (ENSANUT 2006).

El yogurt contribuye al buen funcionamiento del aparato digestivo, a preservar y mejorar la salud digestiva. Del 20 al 40% de los microorganismos del yogurt logran sobrevivir a los diversos obstáculos por los que atraviesan durante el paso por el tracto intestinal, como la acidez intestinal, y la acción de las sales biliares, y logran adherirse a las mucosas intestinales (Farnworth, 2008).

Según Farnworth (2008) diversos estudios han demostrado que existen las suficientes pruebas para que los probióticos sean utilizados como un tratamiento para desordenes gastrointestinales incluyendo:

1. Un incremento en la tolerancia de yogurt comparado con la leche en personas que padecen intolerancia a la lactosa.
2. Saccharomyces boulardii, Lactobacillus y Enterococcus faecium SF 68, previenen o disminuyen la duración de tratamientos con antibióticos en casos de diarrea.
3. S. boulardii previene recaídas en daños causados por Clostridium asociados con diarrea.
4. El uso de Lactobacillus rhamnosus GG en bebidas lácteas fermentadas, disminuye las diarrea en niños con rotavirus enteritis (y probablemente con algunos otros padecimientos gastrointestinales).
5. Los probióticos ayudan a mejorar la respuesta del sistema inmunológico ante la presencia de virus, bacterias, parásitos, hongos, e incluso el polen en diversas áreas como la piel, sangre, pulmones, tracto gastrointestinal.

## 2. IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

### 2.1 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad los productos lácteos fermentados han tomado auge en el mercado debido a su versatilidad al ser comercializados en sus diferentes presentaciones, dentro de los cuales podemos mencionar los quesos tipo *petit suisse*, postres y bebidas fermentadas como el yogurt; además de las propiedades funcionales que se les han atribuido. Sin embargo, estos productos presentan frecuentemente “defectos” tecnológicos que muchas veces llegan a causar el rechazo del consumidor. El más frecuente de ellos es la sinéresis, que se describe como la tendencia que presentan los geles a exudar el disolvente ligado a las macromoléculas (proteínas y polisacáridos) que conforman la red (Aguilera, 1995). Las causas que generan la sinéresis de geles de leche no son aún definidas, sin embargo, se ha asociado a defectos en la formación del gel durante el proceso de gelificación o a una contracción de éste por efecto del envejecimiento.

La formación de geles durante la elaboración de algunos productos lácteos fermentados se debe básicamente a la desestabilización de las caseínas. Diversos estudios han hecho énfasis en que las propiedades de los geles ácidos de leche dependen de la microestructura que éste adopte, la cual está fuertemente influenciada por parámetros de proceso como el tratamiento térmico a la cual se somete la leche previo a la gelificación, la concentración de iones en la leche, la velocidad de acidificación, la cual a su vez está en función de la temperatura de proceso, entre otros (Lucey y Singh, 2003).

En este sentido el desarrollo de bebidas lácteas fermentadas involucra el conocimiento de la bioquímica microbiana imperante y la evolución de las propiedades fisicoquímicas para generar productos con alto valor agregado. En este trabajo de tesis se busca caracterizar la cinética fermentativa de una bacteria ácido-láctica aislada de productos lácteos fermentados comerciales, crecida en

leche descremada y evaluar el efecto de la gelificación de dos polisacáridos aniónicos (*i.e.* gelana de bajo acilo y pectina de bajo grado de metoxilación) en las propiedades reológicas de esta formulación con la finalidad de contribuir al desarrollo de alimentos funcionales.

## 2.2 HIPÓTESIS

La gelificación de las proteínas de la leche en presencia de polisacáridos gelificantes como gelana y pectina de bajo metoxilo, favorecerán la estabilidad del gel láctico durante la producción de bebidas lácteas fermentadas.

## 2.3 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la cinética fermentativa de una bacteria ácido-láctica crecida en medios formulados con leche descremada y evaluar el efecto de la gelificación de gelana y pectina en las propiedades reológicas de una bebida láctea, con la finalidad de contribuir al estudio y desarrollo de alimentos funcionales.

## 2.4 OBJETIVOS PARTICULARES

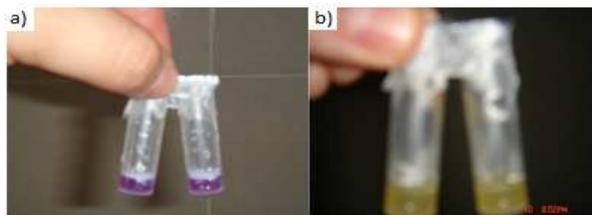
- ✓ Aislar e identificar a través de técnicas microbiológicas convencionales bacterias ácido-lácticas a partir de productos lácteos comerciales.
- ✓ Caracterizar la cinética fermentativa de una bacteria láctica aislada, en medios formulados con leche descremada de vaca.
- ✓ Determinar el efecto de la concentración de dos polisacáridos aniónicos (gelana, pectina de bajo metoxilo) en la cinética de la gelificación ácida de la leche, a través de la evaluación de las propiedades viscoelásticas (módulo de almacenamiento  $[G']$  y módulo de pérdida  $[G'']$ ), la evaluación del pH, acidez titulable, durante el proceso fermentativo de una bebida láctea fermentada.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIALES

**3.1.1 Medios de cultivo.** Para reactivar y cultivar las bacterias ácido-lácticas se utilizó el medio M1 consistente en: 6.5% de caseinato de sodio (Lactoprot, lote 61038), 6.5% de lactosa (Fluka, lote 419518), 1% p/v de extracto de levadura (Bioxon), 0.1% v/v Tween 80 (monoleato de polioxitilensorbitan) (Merck), 1.1g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (J.T. Baker, lote G22149), 1.2g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (J.T. Baker, lote B36C10), 0.01% p/v de carbonato de sodio (comercial). Se adicionaron 30g/L de agar bacteriológico (Reasol) al medio M1 para preparar medio sólido (*i.e.*, M1S).

**3.1.2 Leche, polisacáridos.** Para la formulación de las bebidas lácteas se utilizó leche descremada en polvo (American Dairy): 33.73% de proteína, 3.8% de humedad, sin presencia de antibióticos (en la Figura 9 se presenta la prueba de detección de antibióticos usando el kit comercial Delvotest®); gelana desacidada grado alimenticio (Kelcogel®, CPKelco, Lote 4E0783A), pectina cítrica de bajo metoxilo (GENU® Pectin, CPKelco, Lote S43129).



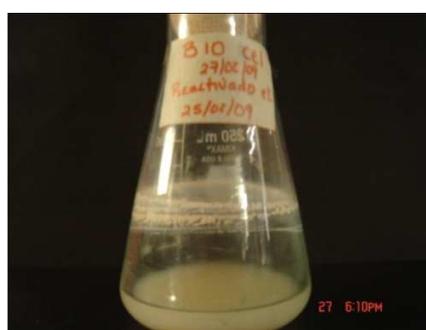
**Figura 9.** Prueba de antibióticos a) prueba por realizar, b) prueba negativa de presencia de antibióticos en leche.

## 3.2 MÉTODOS

**3.2.1 Aislamiento y purificación de bacterias ácido-lácticas.** Se utilizaron 4 bebidas lácteas fermentadas comerciales, a las cuales se les nombró de forma arbitraria: **Lac 1** (proveniente de yogurt Lala<sup>MR</sup>), **Lac 2** (proveniente de bebida fermentada, Yakult<sup>MR</sup>), **Bio** (proveniente de bebida fermentada, BioSvelty<sup>MR</sup>) y **Jsik**(proveniente de yogurt Yoplait<sup>MR</sup>); de estas muestras se aislaron bacterias ácido-lácticas (BAL) a través del método de estriado en placa en el medio de cultivo M1S. Las placas estriadas se incubaron a 30°C durante 48 h. De una caja Petri, se tomó una colonia con un asa bacteriológica estéril y se suspendió en medio M1, el cual se incubó a 30°C durante 24 h y 200 rpm en una incubadora orbital (Barnstead/lab-Line). Concluido el crecimiento se verificó la morfología de las bacterias a través de observaciones al microscopio (Nikon Eclipse 80i) de suspensiones bacterianas, usando azul de metileno como colorante de contraste. Este proceso se repitió 4 veces más, con la finalidad de obtener cepas puras.

**3.2.2 Conservación de las cepas aisladas.** Al medio M1 con el crecimiento bacteriano se adicionó, bajo condiciones asépticas, glicerol estéril, generando una mezcla al 30% glicerol. Esta mezcla se distribuyó en tubos estériles *Eppendorf* de 1.5 mL con una pipeta dosificadora automática, se taparon los tubos y se envolvieron en papel aluminio, después se colocaron en el refrigerador a 4°C durante una hora, posteriormente en el congelador a -8°C durante una hora más, para finalmente someterlos a ultracongelación (-80°C) para su conservación. Los tubos *Eppendorf* preparados se llamarán en lo sucesivo “viales de conservación”.

**3.2.3 Reactivación de cepas conservadas.** Se prepararon 100 mL de medio M1 y se distribuyó en dos matraces Erlenmeyer de 100 mL, los cuales se esterilizaron. Los matraces con medio M1 estéril se inocularon cada uno con 1 vial de conservación, esto se realizó bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar. Los viales fueron descongelados y homogenizados previo a la inoculación. Los matraces inoculados se incubaron a 30°C durante 24h a 200 rpm en una incubadora orbital, la apariencia del medio de cultivo después de 24h se muestra en la Figura 10.



**Figura 10.** Medio M1 con crecimiento de bacterias acidolácticas.

**3.2.4 Formulación de bebidas lácteas.** Se formularon dos tipos de bebidas lácteas con leche descremada en polvo reconstituida al 8% de sólidos y un polisacárido gelificante: gelana o pectina, ambos al 0.02%. En el Cuadro 4 se presenta la matriz experimental con la formulación utilizada para cada uno de los tratamientos.

**Cuadro 4.** Descripción de tratamientos usados en las cinéticas de gelificación.

Sistema	Leche (% p/p)	Pectina (% p/p)	Gelana (% p/p)	Inóculo (% v/v)
Blanco	8	-----	-----	1%
Leche-0.02% gelana	8	-----	0.02	1%
Leche-0.02% pectina	8	0.02	-----	1%

Para la formulación en cada sistema, el polisacárido se disolvió completamente en agua destilada  $\approx 30^{\circ}\text{C}$ , la leche en polvo se adicionó a esta solución, mezclando para evitar la formación de grumos. Se prepararon 2L de cada tratamiento. Una vez incorporada la leche, la mezcla se calentó hasta  $85^{\circ}\text{C}$ , manteniendo esta temperatura durante 30 minutos. Concluido el calentamiento, la mezcla se enfrió paulatinamente hasta  $40^{\circ}\text{C}$ ; a esta temperatura se inoculó la leche con 1% v/v del medio M1 con la cepa reactivada, lo cual corresponde a  $\approx 2$  a  $4 \times 10^6$  UFC/mL.

**3.2.5 Cinética del proceso de fermentación.** Las cinéticas consistieron en monitorear las variables que determinan la evolución de la fermentación ácido-láctica tales como: pH, acidez titulable, producción de biomasa y propiedades viscoelásticas, durante las primeras 4 horas de la fermentación. La evolución de las propiedades viscoelásticas se continuó hasta 6h después del inicio de la fermentación, buscando que los módulos viscoelásticos llegaran al estado estacionario.

**3.2.5.1 Preparación, etiquetado de las muestras y fermentación.**

Inmediatamente después de la inoculación, el volumen total de cada tratamiento fue distribuido en frascos de vidrio (Figura 11) acondicionados para la fermentación (diámetro interno=4.5cm, altura= 9cm).



**Figura 11.** Frascos acondicionados para las unidades experimentales utilizadas durante las cinéticas fermentativas.

Cada frasco contenía 100mL y fueron etiquetados de la siguiente manera: 3 frascos con  $t_0$ , 4 frascos con  $t_1$ , 4 frascos con  $t_2$ , 4 frascos con  $t_3$  y 4 frascos con  $t_4$ ; las cuales fueron usadas para determinar acidez, pH y biomasa en los tiempos 0, 60, 120, 180 y 240 minutos, respectivamente. La fermentación se llevó a cabo a 40°C en un baño María durante 4h. En la Figura 12 se muestran las unidades experimentales durante la fermentación. Se realizaron 2 fermentaciones no simultáneas para cada tratamiento.



**Figura 12.** Fermentación de bebidas lácteas formuladas con leche descremada, gelana y pectina respectivamente.

**3.2.5.2 Cinética de gelificación, evolución de las propiedades viscoelásticas.** De forma paralela a la preparación de las unidades experimentales, inmediatamente después de la inoculación, se tomaron 7mL de la muestra inoculada y se colocaron en la geometría de cilindros concéntricos de doble pared de un reómetro (AR2000, TA Instruments), la cual previamente se había calentado a 40°C. Se realizaron determinaciones de cizalla oscilatoria de baja amplitud a temperatura constante (temperatura de incubación= 40°C) y frecuencia de oscilación de 1rad/s. Las variables de estudio fueron el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y el módulo de pérdida ( $G''$ ). Al inicio del experimento se mantuvo la torca en su valor mínimo accesible por el equipo, después de iniciada la gelificación del sistema, la torca del reómetro se incrementó manualmente de tal forma que las determinaciones se realizaron dentro de la zona lineal de viscoelasticidad

(deformaciones < 1%). Las determinaciones se llevaron a cabo durante 6h, refiriéndose a las primeras 4h de gelificación y 2 horas más para permitir que los módulos G' y G'' se estabilizaran.

**3.2.5.3 Cinética microbiana: producción de ácido láctico.** La evolución de la producción de ácido láctico a lo largo de la fermentación de las bebidas lácteas formuladas, se determinó por titulación con NaOH 0.1N con fenolftaleína como indicador. La determinación de acidez se realizó cada hora por duplicado en cada fermentación.

**3.2.5.4 Cinética microbiana: evolución del pH.** La evolución del pH a lo largo de la fermentación se determinó por medición directa con un potenciómetro (Orion modelo 420A) previamente calibrado. Las determinaciones se realizaron cada hora por duplicado en cada fermentación.

**3.2.5.5 Cinética microbiana: evolución de biomasa.** Se cuantificaron las UFC/mL durante la fermentación, tomando una muestra cada hora, esto se hizo por el método de placa vertida usando el medio M1S. En la Figura 13 se esquematiza el procedimiento. Las placas inoculadas se incubaron 48h a temperatura ambiente (22-25°C).

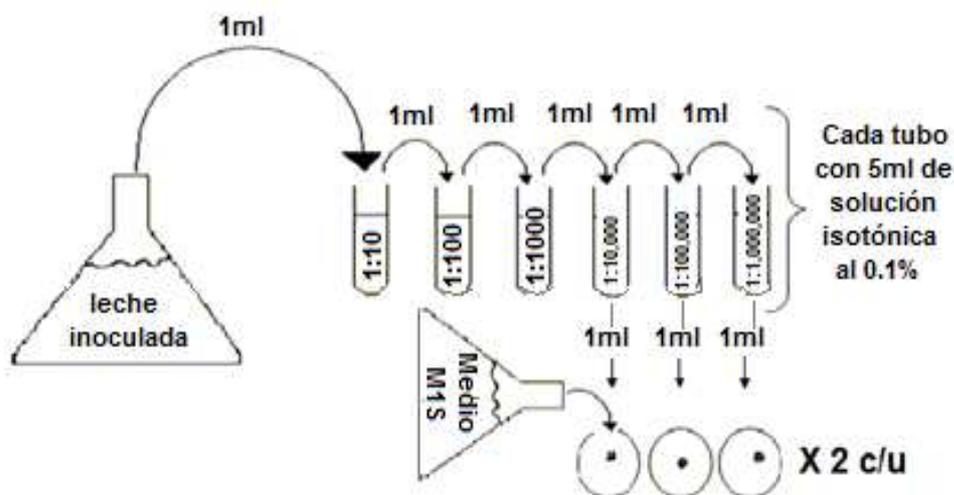


Figura 13. Ilustración del Método de placa vertida realizado durante este trabajo.

### 3.3 PROPIEDADES REOLÓGICAS DE BEBIDAS FERMENTADAS

Se evaluaron las propiedades viscoelásticas de los geles de leche fermentada, obtenidos una vez concluido el proceso de fermentación. Las determinaciones se realizaron a 40°C, después de haber concluido el proceso de gelificación (4h de fermentación y 2h de estabilización). Las pruebas se realizaron dentro de la zona lineal de viscoelasticidad lineal, la cual se confirmó con un barrido de deformación en las muestras.

### 3.4 EVALUACIÓN CUALITATIVA DE SINÉRESIS

Después de la cinética fermentativa, las muestras se refrigeraron a 4°C durante 15 días. Durante este lapso de tiempo los geles no fueron perturbados mecánicamente (el refrigerador permaneció cerrado, sin moverse). Al término del periodo de refrigeración se observaron los sistemas para evaluar cualitativamente el grado de sinéresis que presentaron.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS

Se aislaron 4 bacterias ácido lácticas (BAL) de productos comerciales. De acuerdo a la información técnica de los productos de procedencia (Lala<sup>MR</sup>; Sigma Alimentos<sup>MR</sup>; Yakult<sup>MR</sup>; Nestlé<sup>MR</sup>, así como a las características morfológicas observadas al microscopio, tanto de las células bacterianas como de las colonias crecidas en medio M1S, las cepas se identificaron como:

**Lac 1:** *Streptococcus thermophilus*

**Lac 2:** *Lactobacillus casei shirota*

**Bio:** *Lactobacillus La1*.

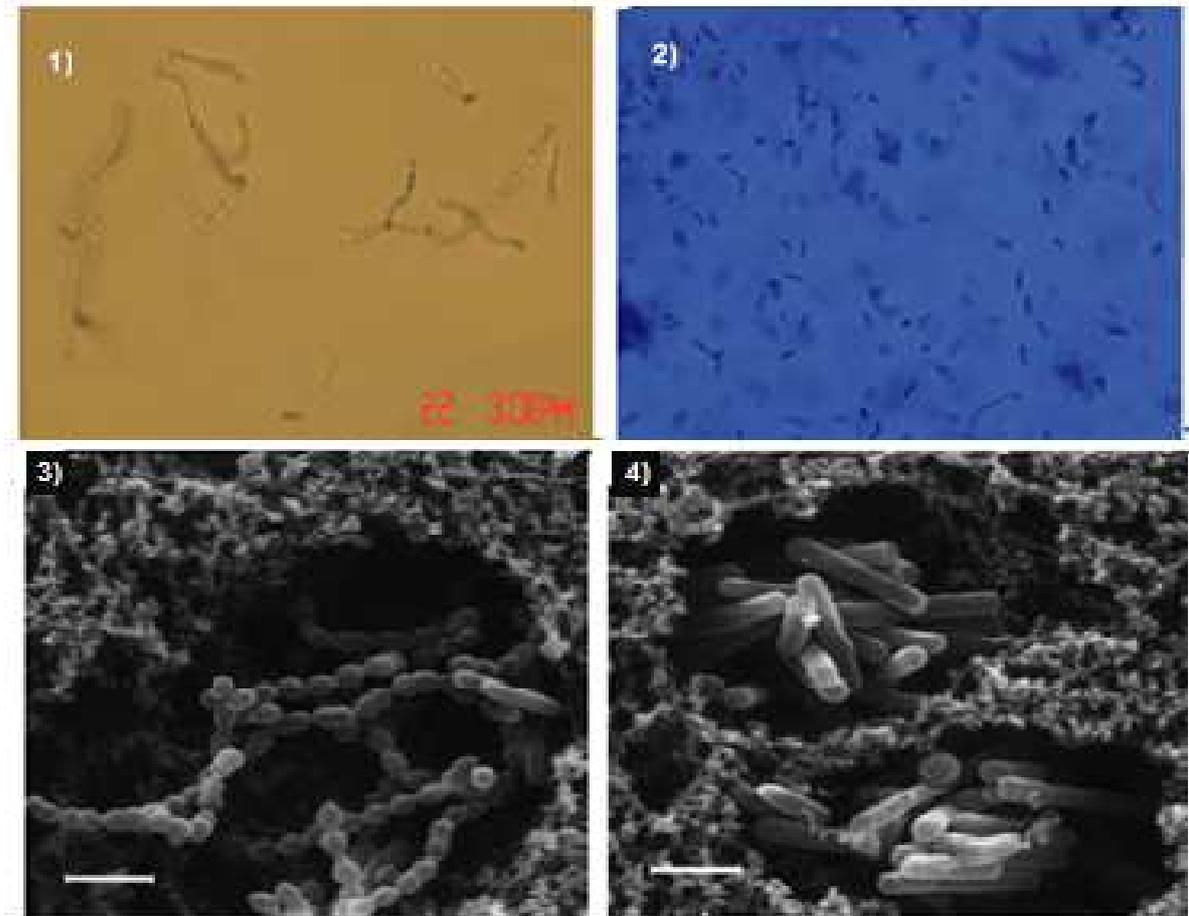
**Jsik:** *Streptococcus thermophilus*

Las BALs se resembraron por estría cruzada en medio M1S, al menos por 3 ocasiones más, para asegurar pureza. En todos los casos, los microorganismos aislados al crecer en medio M1 desarrollaron aromas agradables característicos de los productos de los cuales fueron aislados.

Mediante un seguimiento cualitativo, se observó que el aislado Bio involucraba aparentemente a dos microorganismos morfológicamente distintos: al observar las colonias en medio M1S, algunas de ellas presentaban forma circular-convexa de color blanco, opacas y de apariencia cremosa; mientras que otras se tornaban amarillentas y traslúcidas desarrollándose éstas últimas alrededor de las colonias blancas. Se procedió a purificar hasta obtener cada una de ellas por separado. Al microscopio se pudo observar que se trataba de una colonia de cocos (Bio), refiriéndose a los círculos blancos y otra de bastones (Bio2) provenientes de las manchas amarillentas, sin embargo al ser separadas los bastones no producían aromas (evaluación sensorial) que semejaran a una bebida láctea fermentada, más bien su aroma fue desagradable y diferente al resto de las BALs, por esta

razón fueron descartados del experimento; mientras que la colonia de cocos (Bio) fermentaba el medio M1 con características similares a las cepas Lac1, Lac2 y Jsik. De la misma manera se observó durante este proceso que las bacterias Lac 1 tardaban mucho más en fermentar que las demás y al microscopio se observó una concentración menor de microorganismos. Esto se comprobaba cada vez que se sembraban en medio M1S, pues éstas proliferaban en menor proporción, teniendo un número menor de UFC/mL que el resto. Cabe mencionar que la cepa Lac2 pertenece a un producto el cual tiene caracterizada su cepa (Yakult), de tal manera que decidimos tomar la cepa denominada Jsik para realizar los experimentos.

En la Figura 14 se presentan algunas fotografías de las diferentes morfologías microbianas que se observaron a través del microscopio en comparación con otras similares previamente reportadas. Estas fotografías pertenecen a las cepas Jsik y Lac2 respectivamente. En la figura mencionada, se observan similitudes morfológicas entre 1) y 3), sugiriéndose que el aislado Jsik puede ser *S. termophilus*. De acuerdo con Hernández (2003), este microorganismo puede desarrollarse en pH altos y al fermentar la lactosa alcanza pH menores a 5.5 (lo cual coincide con las características de las cinéticas fermentativas realizadas). Esta bacteria producen compuestos volátiles, a diferencia de *L. bulgaricus*. Cabe mencionar que el desarrollo de este microorganismo es posible a temperaturas cercanas a 40°C, que fue la temperatura que se utilizó durante las cinéticas de fermentación.



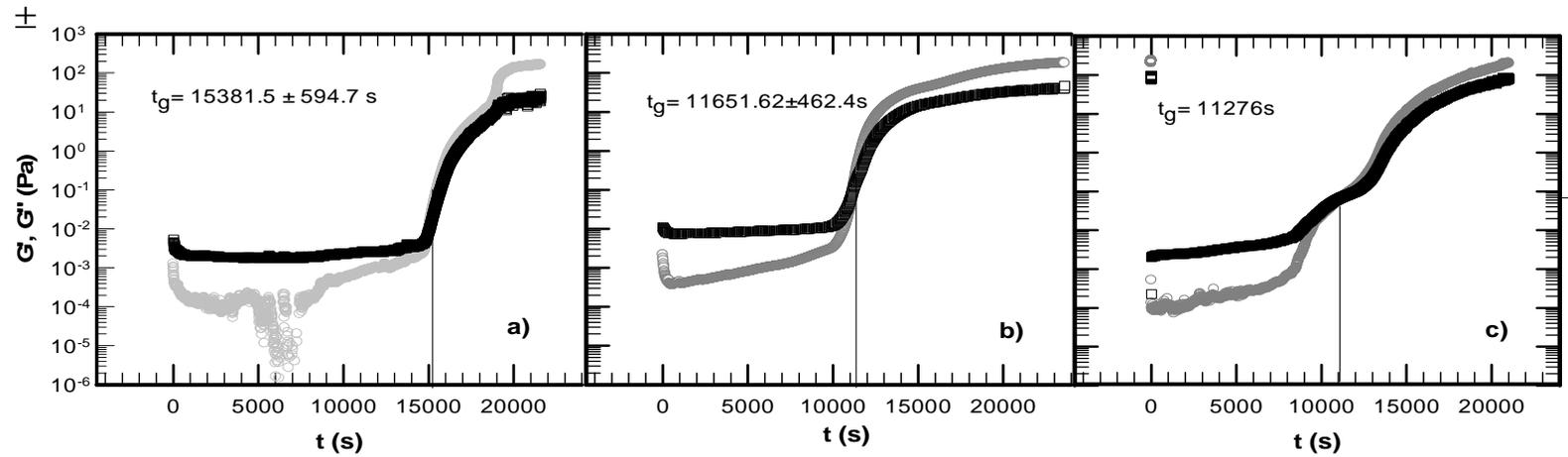
**Figura 14.** Fotografías tomadas durante la fase experimental de este trabajo de investigación 1) Colonias de cocos pertenecientes a la cepa denominada Jsik utilizada en las distintas formulaciones para realizar las cinéticas fermentativas; 2) Bastones que corresponden a la cepa Lac2 obtenidas durante el proceso de aislamiento y purificación de las cepas. Micrografías electrónicas de yogurt natural mostrando 3) un grupo de cocos *S. thermophilus* y 4) una colonia de bastones (*L. Delbrueckii subsp. bulgaricus*) (Microfotografías de yogurt tomadas de Tamime, 2006).

## 4.2 CINÉTICA DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN

**4.2.1 Evolución de las propiedades viscoelásticas.** En la Figura 15 se presenta la evolución de los módulos viscoelásticos,  $G'$  (módulo de almacenamiento) y  $G''$  (módulo de pérdida), durante el proceso de fermentación de los sistemas estudiados en este trabajo. Al inicio de la fermentación los valores de  $G'$  y  $G''$  son muy bajos,  $G'' \gg G'$ , característico de sistemas fluidos sin entrecruzamientos entre macromoléculas. En los tres sistemas se observa que a medida que avanza la fermentación,  $G'$

incrementa hasta igualarse a  $G''$  y posteriormente  $G' > G''$ , lo cual define la presencia de una red macromolecular en donde el carácter sólido o elástico, representado por  $G'$ , predomina sobre el carácter viscoso representado por  $G''$ . En este trabajo se usa el punto donde  $G' = G''$  (*i.e.*  $\tan \delta = 1$ ) como criterio para definir el punto de gelificación.

En el Cuadro 5 se resumen los valores de pH, acidez, tiempo y  $G'$  en el instante de la gelificación. Con las condiciones usadas en la fermentación (*i.e.* cantidad de inóculo, temperatura), los tres sistemas gelificaron en tiempos relativamente largos, 11.27 a 15.38ks (3.1 a 4.3 h). La leche sin polisacárido fue la que inició la gelificación tarde comparada con los sistemas que contenían pectina y gelana, y el valor de  $G'$  en el punto de gelificación fue notablemente inferior al presentado en los geles leche-polisacárido. Por otra parte, en la leche sin polisacárido, el pH para la formación de geles fue el más bajo, lo cual indica una acidificación prolongada para la formación de agregados de proteína de leche que dan lugar a un gel de partículas de caseína fortalecidas únicamente con la proteína sérica desnaturalizada durante el proceso térmico aplicado a la leche.



**Figura 15.** Evolución de los módulos viscoelásticos,  $G'$  (símbolos grises) y  $G''$  (símbolos negros) con respecto del tiempo, durante la fermentación de: **a) Leche descremada 8% sólidos**, **b) Leche descremada 8% sólidos - 0.02% de gelana**, **c) Leche descremada 8% sólidos - 0.02% pectina**. Mediciones realizadas a  $40^\circ\text{C}$  a  $\omega = 1\text{rad/s}$ , usando el valor mínimo de torca del equipo ( $T=10\mu\text{N m}$ ). Sólo se presentan los datos de una determinación para evitar saturación de símbolos en las gráficas.

Se ha reportado que las proteínas de suero desnaturalizadas tienen valores de pH en el punto isoeléctrico (PI) más altos que las caseínas. El punto isoeléctrico de la principal proteína del suero,  $\beta$ - lactoglobulina, es  $\sim 5.3$ , por lo tanto se ha observado que en geles ácidos de leche elaborados con leche sin ningún tratamiento térmico previo, el pH de gelificación de  $\sim 4.9$ , mientras que en la leche calentada a temperaturas  $\geq 80$  °C por 30 minutos se observó la gelificación a  $\text{pH} \geq 5.3$  (Lucey *et. al.*, 1998). Esta observación coincide con los resultados para el sistema testigo ( $\text{pH}_{\text{gelificación}}=5.25$ ).

**Cuadro 5.** Resumen de las propiedades reológicas como acidez y pH que presenta cada sistema en el punto de gelificación y al finalizar la cinética de gelificación,  $t=6\text{h}$ .

	Leche	Leche -0.02% Gelana	Leche - 0.02% Pectina
$\text{pH}_{\text{gelificación}}$	$5.25 \pm 0.06$	$5.40 \pm 0.06$	$5.55 \pm 0.04$
Acidez en el punto de gelificación (% p/v ácido láctico)	$0.42 \pm 0.02$	$0.34 \pm 0.03$	$0.26 \pm 0.06$
$t_{\text{gelificación}}$ (ks)	$15.38 \pm 0.59$	$11.65 \pm 0.46$	11.27
$G'$ en el punto de gelificación (Pa)	$0.02 \pm 0.018$	$0.10 \pm 0.0202$	$0.07 \pm 0.00$
$G'$ , $t=6\text{h}$ (Pa)	$101.85 \pm 59.96$	$192.25 \pm 20.58$	235.3
$\tan \delta$ , $t=6\text{h}$	$0.21 \pm 0.072$	$0.20 \pm 0.08$	0.42
pH, $t=6\text{h}$	$4.87 \pm 0.54$	$4.52 \pm 0.27$	$5.38 \pm 0.04$
Acidez, $t=6\text{h}$ (% p/v ácido láctico)	$0.22 \pm 2.56$	$0.48 \pm 0.25$	$0.39 \pm 0.04$

El sistema Leche-0.02% pectina fue el que presentó los tiempos más cortos de gelificación y presentó valores de  $G'$  de 0.07 Pa en el punto de gelificación. Sin embargo en este sistema la evolución de ambos módulos viscoelásticos fue similar,  $G'$  fue mayor a  $G''$  pero la diferencia entre ambos módulos fue pequeña, incluso al final de las pruebas reológicas ( $t=6\text{h}$ ). Este sistema fue el que presentó mayor dependencia de los módulos con el tiempo; en las últimas 2 horas del experimento, los módulos tienden a incrementar, los valores finales de los módulos fueron  $G'_f = 235.3$  Pa y  $G''_f = 97.99$  Pa (*i.e.*  $\tan \delta = 0.42$ ). Estos valores altos de  $\tan \delta$  indican la presencia de geles suaves o sistemas macromoleculares entrecruzados.

El sistema leche -0.02% de gelana tardó 10 minutos más en gelificar que el sistema leche-0.02% pectina, aunque  $G'$  en el punto de gelificación fue ligeramente superior. Al final de la fermentación ( $t=6h$ ), el sistema leche-gelana presentó valores de  $G'$  menores al sistema leche-pectina pero los valores de  $\tan\delta$  fueron notablemente inferiores, lo cual indica que la gelificación de la leche en presencia de gelana genera geles menos rígidos pero más elásticos. Al término de la cinética de gelificación, se observa que los módulos  $G'$  y  $G''$  se estabilizan en el sistema leche-gelana, mostrando una disminución importante en el módulo de pérdida,  $G''_f = 38.42Pa$  en comparación al módulo de almacenamiento  $G'_f = 192.25Pa$ .

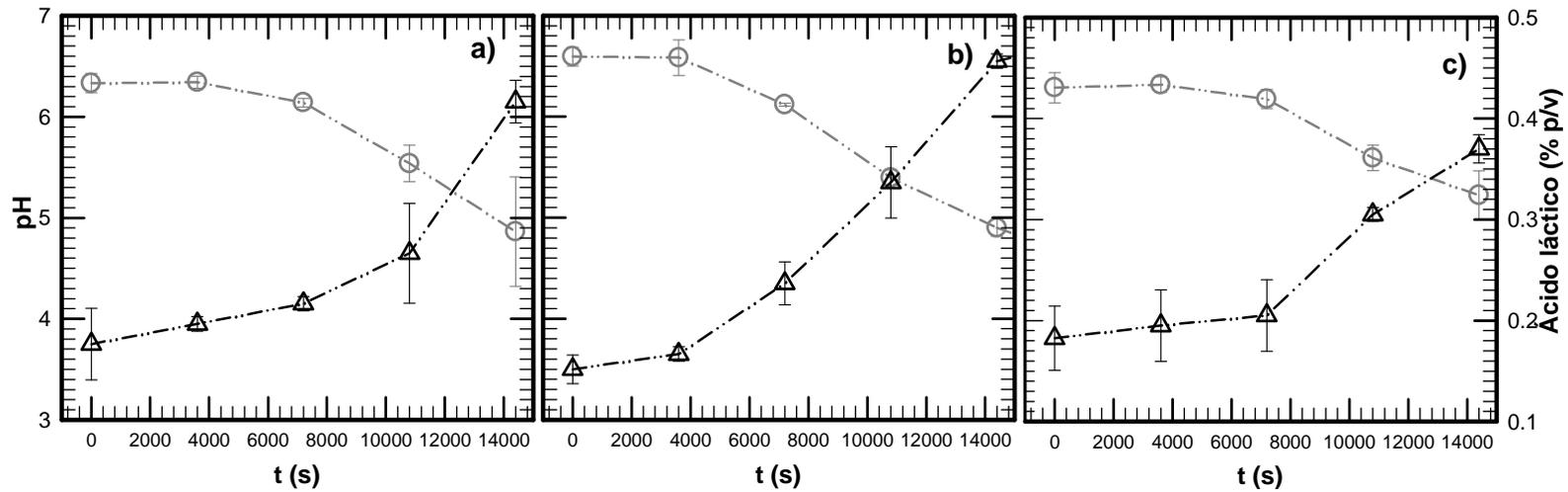
Algunos autores han definido la formación de un gel alimentario a partir del valor de  $\tan\delta$ . Un gel “fuerte” o “verdadero” tendrá valores de  $\tan\delta < 0.1$ , un gel suave o débil  $0.1 < \tan\delta < 1$ , mientras que valores de  $\tan\delta > 1$  indican la ausencia de una red macromolecular o entrecruzamientos entre cadenas poliméricas (Clark y Ross-Murphy, 1987). Por otra parte, en geles de leche se ha correlacionado el comportamiento de tangente de delta con la estabilidad de los geles de leche durante su envejecimiento, se ha sugerido que valores altos de este parámetro reflejan relajación de enlaces y mayores posibilidades de reacomodos estructurales en los geles (Lucey 2001). Por lo tanto los geles que presentaron valores más altos de  $\tan\delta$  al finalizar la gelificación, pueden ser menos estables y traducirse en “defectos tecnológicos” durante su almacenamiento, tales como la exudación de suero (sinéresis). En este sentido, los geles elaborados con leche sola fueron los más suaves ( $G'$  menor) y los elaborados con leche-pectina resultaron más rígidos, pero con mayor dependencia con el tiempo y con menor estabilidad ( $\tan\delta = 0.42$ ). Es decir, los módulos parecen incrementarse continuamente y probablemente los geles envejecidos sean más estables ( $\tan\delta$  menores), sin embargo, no se evaluaron las propiedades reológicas de los geles con el tiempo de almacenamiento.

La adición de polisacáridos aniónicos, en las bajas concentraciones evaluadas en este trabajo (*i.e.* 0.02%), reducen en más de una hora el tiempo de gelificación de la leche y fortalecen la red de proteínas de la leche, lo cual se evaluó con los valores de  $G'$  al finalizar la gelificación. La adición de gelana a la leche, un polisacárido que forma geles muy rígidos a medida que se incrementa la concentración de éste o la concentración de iones (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2003; Pérez-Campos, 2008), incrementó la rigidez de los geles de leche ( $G'=192$  Pa), sin afectar la estabilidad de éstos ( $\tan\delta=0.2$ ). El pH y la acidez de estos geles al finalizar la fermentación ( $t=6$  h), denota una velocidad de acidificación mayor en este sistema, la cual no afectó la estabilidad de los geles, evaluada a través de  $\tan\delta$  (en secciones posteriores se verificará si esta velocidad de acidificación promueve mayor sinéresis en el gel).

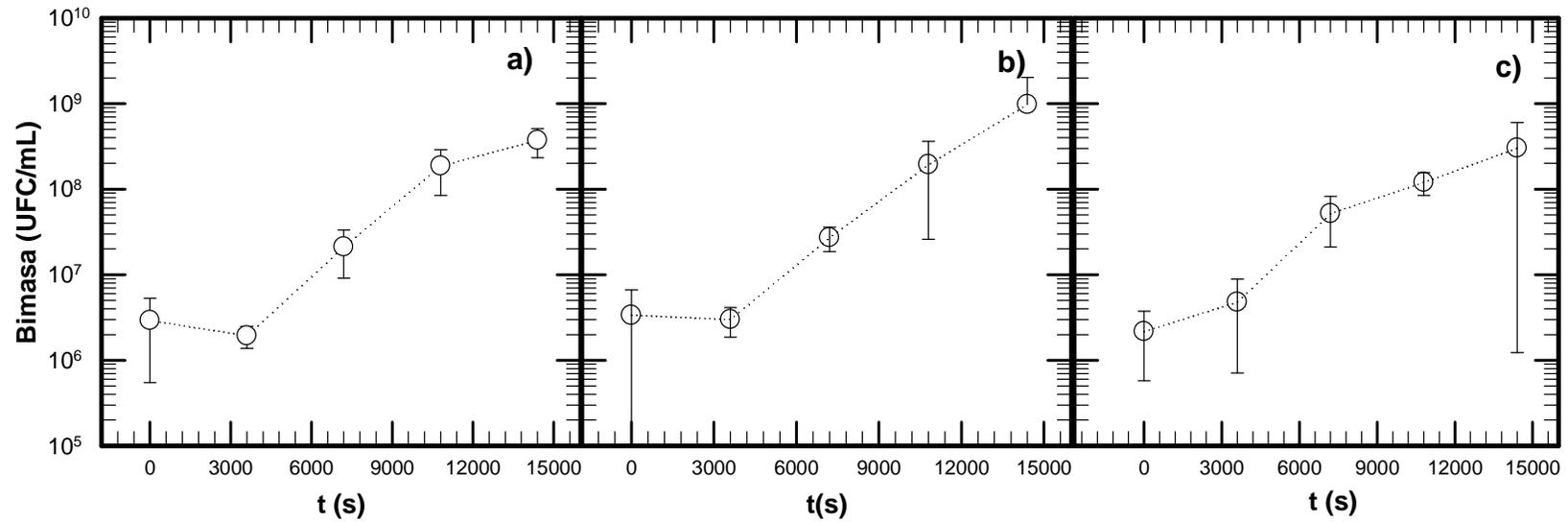
De acuerdo al mecanismo de gelificación de gelana (Grasdalen y Smidsrød, 1987) y al de las proteínas de la leche (De Kruif, 1997), discutida en sección 1.4; posiblemente, existió un efecto cooperativo durante la fermentación. A medida que se incrementó la cantidad de ácido láctico producido por las bacterias lácticas, la micela de caseína se desmineralizó (De Kruif, 1997), incrementando la disponibilidad de iones en el medio acuoso (entre ellos  $Ca^{2+}$ ), los cuales promueven la formación de entrecruzamientos gelana-gelana, dando origen a redes de gelana progresivamente más rígidas a medida que avanza la fermentación y con ésta, la gelificación de las proteínas de la leche. En trabajos previos se ha demostrado la cogelificación de proteínas de la leche con gelana al incrementar la acidez del medio (Trejo-Guerrero, 2010). Los geles de leche (12% sólidos) en presencia de 0.05% gelana, acidificados con glucono-delta-lactona se describieron por Trejo-Guerrero (2010) como “redes gelificadas de gelana que se refuerzan con el calcio liberado de la micela durante la acidificación, generando geles mixtos con partículas de caseína embebidas en una red densa de gelana”.

#### **4.2.2 Cinética microbiana: producción de ácido láctico, evolución del pH y biomasa.**

En la Figura 16 se presenta la cinética de pH y producción de ácido láctico durante las fermentaciones. En los tres sistemas los valores de pH y acidez fueron similares al momento de la gelificación (Cuadro 6). La velocidad de acidificación en  $\text{g}_{\text{ác. láctico}}/\text{L ks}$  fue de 0.16, 0.22 y 0.13 para leche, leche-gelana y leche pectina, respectivamente. Posiblemente, la baja velocidad de acidificación en el sistema leche-pectina generó geles “jóvenes” que no se estabilizan al final del experimento (6 h). Este sistema siempre fue más fluido que el compuesto por leche-gelana, su consistencia incrementó al envejecer el gel formado, pero no se realizaron determinaciones viscoelásticas en función del tiempo de almacenamiento para comprobar esta hipótesis. Estas diferencias en la velocidad de acidificación pueden ser debidas a la actividad microbiana, es importante recordar que los experimentos no se realizaron simultáneamente, éstos fueron llevados a cabo de forma aleatoria en días diferentes, debido al tiempo requerido en cada uno de ellos. De acuerdo a la Figura 17, la cuenta viable al inicio de la fermentación en los tres sistemas, fue del orden  $2\text{-}3 \times 10^6$  UFC/mL. En la primera hora de fermentación, en los tres sistemas no se observó un crecimiento importante. A partir de la segunda hora de iniciada la fermentación, se observó el crecimiento paulatino hasta llegar a valores de  $\sim 4 \times 10^8$ ,  $\sim 1 \times 10^9$  y  $\sim 3 \times 10^8$  UFC/mL en los sistemas leche, leche-gelana y leche-pectina, respectivamente. Es evidente que el sistema leche-gelana fue el que presentó mayor crecimiento bacteriano, incrementando la acidez del medio y generando los valores más bajos de pH al finalizar la fermentación (t=6 h).



**Figura 16.** Evolución del pH (○) y acidez (△) durante la fermentación de leche descremada; a) Leche 8% sólidos, b) Leche 8% sólidos - 0.02% de gelana, c) Leche 8% sólidos - 0.02% pectina. Mediciones realizadas a temperatura ambiente cada 60 minutos.



**Figura 17.** Evolución de biomasa durante la fermentación de a) Leche 8% sólidos, b) Leche 8% sólidos - 0.02% de gelana, c) Leche 8% sólidos - 0.02% de pectina.

**4.2.3 Propiedades reológicas de bebidas fermentadas.** En la Figura 18 se muestran los espectros mecánicos dinámicos obtenidos de las diferentes formulaciones al finalizar la cinética de gelificación ( $t= 6h$ ). Los valores de  $G'$  y  $G''$  corresponden a geles que han envejecido  $\sim 2h$  después del gelificar. El comportamiento de los módulos viscoelásticos del sistema testigo y leche-0.02% gelana se describe como geles “verdaderos” cuyos módulos tienen poca dependencia con la frecuencia de oscilación, como se describe con los valores de las pendientes en el Cuadro 6. En contraste, los geles de leche-0.02% pectina presentaron valores inferiores de  $G'$  y  $G''$  y estos módulos fueron dependientes con la frecuencia.

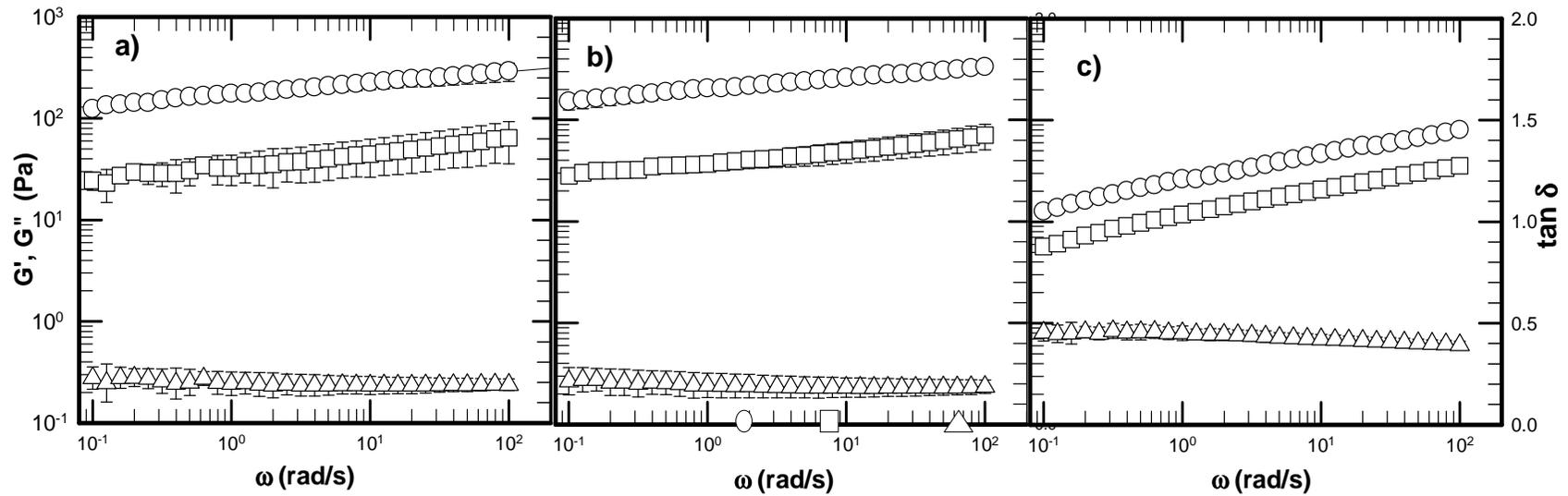
En la Figura 18 también se presentan los valores de  $\tan\delta$  de los geles obtenidos en cada sistema después de la cinética de gelificación. Este parámetro identifica a los geles como “geles suaves” (i.e  $\tan\delta > 0.1$ ). Los elaborados con leche-0.02% pectina presentaron los valores mayores de  $\tan\delta$ , lo cual indica que en este sistema existe una mayor tendencia al carácter líquido. Las propiedades viscoelásticas de este gel pueden traducirse en defectos tecnológicos como geles más quebradizos y con mayor tendencia a fluir, lo cual puede dar lugar al efecto de sinéresis durante el envejecimiento del gel.

**Cuadro 6.** Valores de las pendientes de  $G'=f(\omega)$  y  $G''=f(\omega)$ . Los valores de  $n$  y  $m$  corresponden a las pendientes de  $G'$  y  $G''$ , respectivamente.

Sistema	$n$	$m$
<b>Blanco</b>	0.1146	0.1278
<b>Leche – 0.02% gelana</b>	0.1116	0.1206
<b>Leche - 0.02% pectina</b>	0.2598	0.2580

Lucey *et. al.* (1998b) en el estudio que realizaron para observar el comportamiento de la gelificación con respecto al tratamiento térmico aplicado y el porcentaje de grasa que contiene la leche; muestran gráficos de espectros mecánicos similares a los que se obtuvieron en este trabajo de investigación, la razón es el tratamiento térmico que se dio a las formulaciones utilizadas ( $80^{\circ}C-30min$ ), el trabajo de Lucey *et. al.* (1998b),

concluye que el tratamiento térmico es más importante en la formación de geles que el contenido de grasa, ya que la finalidad del tratamiento térmico es disponer a las proteínas de manera que al ser desnaturalizadas, facilita el acomodo de éstas para formar una red que más tarde representará el gel ácido de proteína; de esta manera obtenemos geles suaves muy similares al yogurt con valores de  $G'$  cerca a los 400Pa.



**Figura 18.** Espectro mecánico dinámico de geles de leche acidificada,  $G'$  (círculos),  $G''$  (cuadros) y  $\tan \delta$  (triángulos). Sistemas: a) Leche 8% sólidos, b) Leche 8% sólidos - 0.02% de gelatina, c) Leche 8% sólidos - 0.02% pectina. Mediciones realizadas a  $40^{\circ}\text{C}$  a  $\omega = 1 \text{ rad/s}$ , usando el valor mínimo de torca del equipo ( $\sigma = 0.03 \text{ Pa}$ ). Determinaciones realizadas 6 horas después de iniciada la fermentación.

**4.2.4 Evaluación cualitativa de sinéresis.** Se realizó la evaluación cualitativa de sinéresis, refrigerando al menos 3 unidades experimentales de cada sistema después de finalizar la incubación, evitando perturbarlos durante el almacenamiento. En la Figura 19 se muestra la apariencia de las tres formulaciones al día 15 después de haber sido elaborados y refrigerados. Se observa una capa de suero en la superficie de cada formulación. El testigo (leche 8% sólidos) y el sistema leche- 0.02% pectina presentaron sinéresis en la misma proporción, a pesar de la presencia de un agente estabilizante en este último. Es importante mencionar que durante el monitoreo de sinéresis se observó que el sistema leche- 0.02% pectina desarrolló una textura de “gel quebradizo”, que posiblemente favoreció que pequeñas perturbaciones, incluyendo la gravedad, generaran la fractura del gel y por ende la liberación del disolvente (agua+ proteínas séricas). Otra posible razón para la generación de sinéresis en este sistema fue la acidificación baja (Figura 19).



**Figura 19.** Sinéresis en los diferentes tratamientos al día 15 de refrigeración; a) leche (8% sólidos), b) Leche 8% sólidos - 0.02% gelatina, c) Leche 8% sólidos – 0.02% pectina.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES PARA INVESTIGACIONES POSTERIORES

### 5.1 CONCLUSIONES

Se logró el aislamiento de una bacteria ácido láctica de un producto lácteo fermentado comercial. De acuerdo a las características morfológicas de la colonia y de la bacteria, así como a las propiedades de la leche fermentada, se identificó como *Streptococcus thermophilus*. Esta identificación es congruente con la información del proveedor del producto comercial fermentado.

El sistema leche-gelana fue el que presentó menor tiempo de gelificación y mayor crecimiento bacteriano; incrementando la acidez del medio y generando los valores más bajos de pH al finalizar la fermentación (t=6 h).

Las bebidas lácteas fermentadas con la bacteria aislada presentaron diferencias en sus propiedades reológicas debido a la presencia de polisacáridos gelificantes que posiblemente estabilizaron la gelificación por mecanismos diferentes. Los geles elaborados con leche sola fueron los más suaves ( $G'$  menor), los elaborados con leche-pectina resultaron más rígidos, pero con mayor dependencia con el tiempo y con menor estabilidad ( $\tan\delta=0.42$ ), mientras que los elaborados con leche-gelana fueron más rígidos que los elaborados con leche sola pero con rigidez inferior a los geles leche-pectina; sin embargo, los geles con gelana fueron más estables con el tiempo ( $\tan\delta=0.20$ ).

Los geles con gelana fueron los que presentaron menor exudación del disolvente, este fenómeno se correlacionó adecuadamente con las propiedades reológicas de este sistema: geles más rígidos ( $G'\sim 400\text{Pa}$ ), valores de  $\tan\delta \sim 0.2$  y los módulos, especialmente  $G'$ , fueron independientes de la frecuencia de oscilación, lo cual denota un gel estable con el tiempo (al menos en la escala de tiempo experimental

de las pruebas, *i.e.* 100 s). Contrariamente, los geles con leche sola y leche-pectina, presentaron mayor sinéresis durante el envejecimiento del gel.

De acuerdo a los resultados, la gelana puede ser una opción de aditivo estabilizante en productos lácteos fermentados, debido a su eficiencia en la cogelificación con las proteínas de la leche y a su capacidad de retención de agua.

## 5.2 RECOMENDACIONES PARA INVESTIGACIONES POSTERIORES

Con base a los resultados de este trabajo se sugiere que en futuras investigaciones se tomen en cuenta los siguientes puntos:

- a) Realizar pruebas reológicas de las bebidas lácteas fermentadas periódicamente durante su almacenamiento, (*i.e.* 3, 6, 9, 12, 15 días), para caracterizar el efecto del hidrocoloide en la estabilización del gel con el tiempo.
- b) Realizar la caracterización bioquímica de las bacterias ácido lácticas y su posterior identificación molecular.
- c) Llevar a cabo análisis sensorial de las formulaciones.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, J.M. (1995). Gelation Of Whey Proteins. *Food Technology*, **49**, 83-89.
- Aguilera, J.M., Stanley, D.W. (1999). Microstructural aspects of a fluid food: Milk. En *Microstructural Principles of Food Processing and Engineering*. An Aspen Publishers Inc. Maryland, Estados Unidos de América, 293-324.
- Alais, C. (1998). Ciencia de la leche. En *Principios de técnica lechera*, 3ª Edición, Reverté S.A., México, 103-112.
- Badui, D.S. (2006). Leche. En *Química de los Alimentos*. 4ª edición, Pearson Educación, México, 603-631.
- Cheffel J. C., Cuq J. L., Lorient D. (1992). Leche y Productos Lácteos. En *Introducción a la Bioquímica y la Tecnología de los Alimentos. Volumen 1*. 1ª. Edición. Acribia S.A., Zaragoza España. 43-63.
- Clark, A. H., Ross-Murphy, S. B. (1987). Structural And Mechanical Properties Of Biopolymer Gels. *Advances in Polymer Science*, **83**, 57-192.
- Clark, A.H. (1992). Gels and Gelling. En *Physical Chemistry of Foods*, H.G. Schwartzberg, R.W. Harter (eds.), Marcel Dekker, Inc., 263-305.
- De Kruif C.G. (1997). Skim Milk Acidification. *Journal of Colloid and Interface Science*, **185**, 19-25.
- De las Cagigas, A. L., Blanco-Anesto J. (2002). Prebióticos Y Probióticos, Una Relación Beneficiosa. *Revista Cubana Alimento y Nutrición*, **16**, 63-68.
- ENSANUT [Encuesta Nacional Salud y Nutrición] (2006). Disponible en: <http://www.insp.mx/encuesta-nacional-salud-y-nutricion-2006.html>. Último acceso: 26 de Julio del 2011.

- FAO/WHO [Food and Health Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization] (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Working Group Report. London, Ontario, Canada.
- Farnworth, E. R. (2008), Yogurt and Immunity: The Health Benefits of Fermented Milk. En *Handbook of Fermented Functional Foods*, 2ª Edición, CRC Press, Estados Unidos de América, 131-133.
- Ferry, J.D. (1948). Protein Gels. *Advances in Protein Science*, **4**, 1-76.
- Flory, P. J. (1974). Gels And Gelling Processes: Introductory Lecture. Faraday Discuss. *Chemical Society*, **57**, 7-18.
- Foegeding, E. A., Bowland, E. L., Harding, C. C. (1995). Factors That Determine The Fracture Properties Of Globular Protein Gels. *Food Hydrocolloids*, **9**, 237-249.
- Gálvez-Mariscal, A., Flores-Argüello, I., Farrés-González Saravia, A. (2006). Proteínas. En *Química de los Alimentos*. 4a Edición, Pearson Educación, México, 119-220.
- Grasdalen, H. y Smidsrød, O. (1987). Gelation Of Gellan Gum. *Carbohydrate Polymers*, **7**, 371-393.
- Guarner F., Khan A. G. Garisch, J., Eliakim R., Gangl A., Thomson A., Krabshuis J., Mair T. L. (2008). Probióticos y Prebióticos. *Organización Mundial de Gastroenterología, Guías prácticas: Probióticos y Prebióticos*, 4-5.
- Hernández, A. (2003). Microbiología industrial, EUNED, Costa Rica, 72-73.
- Ji, S., Corredig, M., Goff, H. D. (2008) Aggregation Of Casein Micelles And  $\kappa$ -Carrageenan In Reconstituted Skim Milk. *Food Hydrocolloids*, **22**, 56-64.

- 
- Kiani H., Mousavi M.E., Razavi. Morris H., E.R (2010). Effect Of Gellan, Alone And In Combination With High-Methoxy Pectin, On The Structure And Stability Of Doogh, A Yogurt-Based Iranian Drink. *Food Hydrocolloids*, **24**, 744-754.
- Livney Y. D. (2010), Milk Proteins As Vehicles For Bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **15**, 73-83.
- Lucey, J.A. (2001) The Relationship Between Rheological Parameters And Whey Separation In Milk Gels. *Food Hydrocolloids*, **15**, 603-608.
- Lucey, J.A. y Singh, H. (2003). Acid Coagulation of Milk. *En Advanced Dairy Chemistry*. Vol.1. Proteins. Part B. 3a edition. Fox, P.F. y Mc. Sweeney, P.L.H. (Eds.). Nueva York, Estados Unidos de América, 1001-1025.
- Lucey, J.A., Munro, P.A. y Singh H. (1998b) Whey Separation In Acid Skim Milk Gels Made With Glucono- $\delta$ -Lactone: Effects Of Heat Treatment And Gelation Temperature. *Journal of Texture Studies*, **29**, 413-426.
- Lucey, J.A., Munro, P.A., Singh H. (1998a) Rheological Properties And Microstructure Of Acid Milk Gels As Affected By Fat Content And Heat Treatment. *Journal of Food Science*, **63**, 660-664.
- Lucey, J.A., Singh, H. (1998). Formation And Properties Of Acid Milk Gels: A Review. *Food Research International*, **30**, 529-542.
- Madigan, M.T., Martinko J. M., Parker J. (2006). Nutrición, Cultivo y Metabolismo Microbiano. En *Brock, Biología de los microorganismos*, 10ª edición, Pearson Educación, España, **5**,120-123.
- Mckinley, M. (2005). The Nutrition And Health Benefits Of Yogurt. *International Journal of DairyTechnology*, **58**, 1-13.

- Pérez-Campos, S. J. (2008) Propiedades reológicas dinámicas de dispersiones acuosas de gelatina: efecto de la concentración de iones calcio en la formación de geles. *Tesis de licenciatura. Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.*
- Rodríguez-Hernández, A.I., Durand, S., Garnier, C., Tecante, A. y Doublier, J.L. (2003). Rheology-Structure Properties Of Gellan Systems: Evidence Of Network Formation At Low Gellan Concentrations. *Food Hydrocolloids*, **17**, 621-628.
- Roefs, S. P. F. M., de Groot-Mostert, A.E.A. y van Vliet T. (1990). Structure Of Acid Casein Gels. 2. Dynamic Measurements And Type Of Interaction Forces. *Colloids and Surfaces*, **50**, 161-175.
- Sánchez, B., Reyes-Gavilán, C., Margolles, A., Gueimonde, M. (2009). Probiotic Fermented Milks: Present And Future. *Journal of Dairy Technology*, **62**, 472-483.
- Santos, M.A. (1987). *Leche y sus derivados*. 2ª edición, Trillas. México D.F.
- Shimada, K., Matsushita, S. (1980). Relationship Between Thermocoagulation And Amino Acid Composition. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **28**, 413-417.
- Tamime A. Y., Robinson R. K. (1991). *Yogur Ciencia y Tecnología*, Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Tamime, A.Y. (2006). Starter Cultures. En *Fermented Milks*, Blackwell Science, Zaragoza, España, 11-16.

Totosaus A., Montejano J. M., Salazar J.A., Guerrero I. (2002). A Review Physical And Chemical Protein-Gel Induction. *International Journal of Food Science and Technology*, **37**, 589-601.

Trejo-Guerreo, M. (2010). Estudio reológico de la gelificación ácida de la leche en presencia de gelatina desacidada. *Tesis de licenciatura. Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.*

Valenzuela, A., Ronco A.M. (2004). Fitoesteroides Y Fitoestanoles: Aliados Naturales Para La Protección De La Salud Cardiovascular. *Revista Chilena de Nutrición*, **21(1)**, 161-169.

Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A., van Boekel, M.A.J.S. (1999) Milk Components. *En Dairy Technology Principles of Milk Properties and Processes*. Marcel Dekker, Inc. Nueva York, Estados Unidos de América, 27-100.

Walstra, P., Jenness R. (1987) *Química y Física Lactológica*. Acribia S.A. Zaragoza, España, 84-99.

Ye, A. (2008). Complexation Between Milk Proteins And Polysaccharides Via Electrostatic Interaction: Principles And Applications. *International Journal of Food Science and Technology*, **43**, 406–415.

[http://www.yakult.com.mx/images/stories/demo/04\\_Noticias/Boletines/BOLETIN\\_YAKULT\\_No22.pdf](http://www.yakult.com.mx/images/stories/demo/04_Noticias/Boletines/BOLETIN_YAKULT_No22.pdf). Ultimo acceso 21 de septiembre del 2011.

[http://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est\\_02/yogurs.pdf](http://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est_02/yogurs.pdf). Ultimo acceso 21 de septiembre del 2011.

<http://www.nestle.es/nutricion/userfiles/pdfs/dialogos/numero1/investigacionNestle.pdf>. Ultimo Acceso 21 de septiembre del 2011.