

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA**

DIVISION DE
CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

CARACTERIZACION REOLOGICA Y DE TEXTURA DE
UN PRODUCTO FERMENTADO PRODUCIDO POR
Lactobacillus delbrueckii ss. *bulgaricus* NCFB 2772



Tesis realizada para obtener el grado académico de:
MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

Presenta:

Julieta Domínguez Soberanes

Asesores:

M. en C. Mariano García Garibay
Dr. Fermín Pérez Guevara



1997

JURADO:

Presidente: M. en C. Mariano García Garibay
Vocal: M. en B. Alma E. Cruz Guerrero
Vocal: Dra. Laura Patricia Martínez Padilla
Secretario: Dr. Fermín Pérez Guevara

Sitios donde se desarrolló el tema:

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**

**LABORATORIO DE PROPIEDADES REOLOGICAS Y
FUNCIONALES EN ALIMENTOS
SECCION DE ALIMENTOS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
U.N.A.M.
BAJO LA TUTORIA DE:
Dra. Laura Patricia Martínez Padilla**

A Mariano y a Lorena,
por su apoyo y amistad, ya que además de ser excelentes asesores y
maestros supieron motivarme al logro de mis metas. Gracias!

A L. Patricia y Alma E.,
por su paciencia, entrega y amistad.

A mis compañeros y amigos de la Planta Piloto,
por la oportunidad y disposición de poder colaborar con ellos, en
especial a Judith y a Patricia R.

A mi familia,
por el ejemplo y apoyo que siempre me han brindado.

A mi esposo,
un reconocimiento especial, por el amor y la paciencia tan grande
que siempre me ha demostrado.

INDICE

1. Resumen	4
2. Introducción	5
3. Antecedentes Bibliográficos	
3.1. Definiciones	
3.1.1. Gelificación	7
3.1.2. Textura	7
3.1.2.1. Penetrómetro	8
3.1.2.2. Texturómetro	8
3.1.3. Reología	10
3.1.4. Microscopía Electrónica	14
3.2. Generalidades del yogurt	
3.2.1. Influencia de los factores tecnológicos sobre las características texturales del yogurt.	
3.2.1.1. Concentración de la leche	15
3.2.1.2. Pasteurización	16
3.2.1.3. Homogeneización	16
3.2.1.4. Fermentación	17
3.2.2. Cepas filantes	18
3.2.2.1. Efecto de las condiciones de fermentación sobre la producción del exopolímero	18
3.2.2.2. Composición química del exopolímero	20
3.2.2.3. Estudios de microscopía electrónica	21
3.3. Caracterización Reológica y de textura del yogurt	
3.3.1. Penetrometría	24
3.3.2. Análisis de perfil de textura	25
3.3.3. Caracterización reológica y de textura del yogurt	
3.3.3.1. Pruebas de flujo	25

3.3.3.1.1. Pruebas empíricas	26
3.3.3.1.2. Pruebas de histéresis	26
3.3.3.1.3. Pruebas a esfuerzo de cizalla constante	29
3.3.3.2. Pruebas dinámicas	29
3.3.3.3. Efecto de la cepa sobre las características reológicas del producto	31

4.- Objetivos

4.1. Objetivo General	34
4.2. Objetivos Particulares	34

5.- Metodología

5.1. Microorganismos	35
5.2. Fermentaciones	
5.2.1. Cultivo iniciador	35
5.2.2. Substratos	35
5.2.3. Condiciones de fermentación	36
5.2.4. Diseño Experimental	37
5.3. Cuantificación del exopolisacárido	37
5.4. Purificación del exopolisacárido	38
5.5. Determinación de la relación proteína-carbohidrato en el exopolisacárido puro	38
5.5.1. Técnica de Lowry	39
5.5.2. Técnica de Fenol-Sulfúrico	39
5.6. Caracterización reológica	40
5.7. Análisis de textura	42
5.7.1. Análisis de Perfil de textura	42
5.7.2. Pruebas de ciclo	43
5.8. Microscopía electrónica	44
5.9. Análisis estadísticos	45

6. Resultados y Discusiones	
6.1. Cinética de fermentación	46
6.2. Cuantificación del exopolisacárido	49
6.3. Determinación de la relación proteína-carbohidrato en el extracto puro	50
6.5. Caracterización reológica	52
6.6. Análisis de Textura	
6.6.1. Análisis de Perfil de Textura en productos tipo firme	59
6.6.2. Análisis de Perfil de Textura en productos tipo batido	65
6.6.3. Pruebas de ciclo	69
6.7. Microscopía electrónica de barrido	73
7. Conclusiones	84
8. Bibliografía	87
9. Anexos	92

1. RESUMEN

El uso de cepas filantes permite la elaboración de geles con adecuadas características de viscosidad y textura, generando sistemas menos susceptibles a presentar el fenómeno de sinéresis. Sin embargo, no se conoce el tipo de interacciones que existen entre la cepa filante, su exopolisacárido y los componentes de la leche. Por lo anterior, se planteó este proyecto, con el objetivo de establecer la contribución del polímero sintetizado por *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* NCFB 2772 (cepa filante) durante la fermentación láctica y el efecto de la caseína sobre las propiedades reológicas, de textura y microestructurales del producto. Los productos de fermentación se compararon con los obtenidos a partir de una cepa no filante, *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* NCFB 1489, encontrándose diferencias significativas en las variables respuesta analizadas. Durante la fermentación láctica la cepa filante mostró la capacidad de producir exopolisacárido en los cuatro substratos que se usaron (suero, suero adicionado con caseína, leche descremada y retenido de leche), observándose que a mayor contenido proteico presente en el substrato inicial mayor producción de exopolímero. La interacción de este exopolisacárido, al igual que el contenido proteico en el sistema, tienen influencia sinérgica sobre la caracterización reológica y de textura del producto, es decir, que al utilizar tanto un sistema con un mayor contenido de proteínas (caseína) como una cepa filante se genera un gel más rígido y más adhesivo. Esto último puede deberse a diferencias microestructurales, ya que las cepas filantes tienen la capacidad de unirse, mediante su exopolisacárido, con la matriz proteica del sistema, además de que la malla proteica que se genera es más compacta.

2. INTRODUCCIÓN

El yogurt es la leche fermentada que resulta del crecimiento de las bacterias lácticas *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en leche (García-Garibay *et. al.*, 1993). Se ha buscado la manera de producir yogurt sin problemas de sinéresis y que aporte al consumidor las características texturales deseables. Se ha visto que una forma de lograr esto es mediante el uso de cepas mucógenas o filantes, las cuales tienen como una de sus cualidades principales, la producción de polisacáridos exocelulares (García-Garibay *et. al.*, 1993). El aporte que tiene cada una de las cepas y la interacción entre el polímero producido por las mismas con los componentes de la leche no ha sido estudiada a detalle, aunque algunas caracterizaciones reológicas indican que probablemente interaccionan con las caseínas del sistema (Teggatz y Morris, 1990).

En general los estudios texturales y las caracterizaciones reológicas de productos elaborados con cepas filantes, reportados hasta la fecha, no ahondan con detalle en el estudio de la interacción entre los componentes de la leche y los polímeros producidos de los cultivos iniciadores (Rohm y Kovac, 1995; van Marle y Zoon, 1995; Wachter-Rodarte *et. al.*, 1993), así como la correlación que pueden tener estos con la microestructura del sistema (Kalab, 1979 y 1993).

En este trabajo se pretende caracterizar reológica, textural y microestructuralmente productos lácteos fermentados con una cepa filante de

Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus, a fin de poder explicar los tipos de interacciones entre los componentes de la leche, la cepa y el polímero producido por la misma y la contribución de estas propiedades a la caracterización reológica y textural del gel.

3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

3.1. Definiciones

3.1.1. Gelificación

La gelificación es un proceso complejo que lleva consigo, en un primer paso, el desdoblamiento o desnaturalización de las proteínas, para después favorecer la interacción proteína-proteína (matriz o malla proteica) que da origen a la estructura tridimensional ordenada en la que quedan retenidos el agua, los glóbulos de grasa, las sales y otras sustancias de bajo peso molecular, por estas razones, la dureza del gel depende de la intensidad de las fuerzas que constituyen dicha estructura y que están en función del pH, de la concentración del polímero, etc. (Badui, 1990). Un método para medir la gelificación implica la medición de alguna propiedad reológica o de textura del gel (Lewis, 1993; Bourne, 1982).

3.1.2. Textura

Un atributo de la textura es la manifestación de una combinación de propiedades físicas y químicas, que incluyen la forma, tamaño, número, naturaleza y disposición de los elementos estructurales presentes. Son a menudo, un reflejo de la estructura del producto. Este concepto es la base de gran parte de los métodos instrumentales para la evaluación de la textura. Algunos de estos instrumentos usualmente pueden medir solo una propiedad

física, pero en su mayoría miden la mezcla de una serie de propiedades físicas del producto bajo estudio; son métodos indirectos de medición de la textura, y sus resultados tienen sentido únicamente si se pueden demostrar que están relacionados conceptual y estadísticamente con los obtenidos por métodos sensoriales, los cuales deben ser contemplados como definitivos (Lewis, 1993 ; Bourne, 1982).

3.1.2.1. Penetrómetro

El penetrómetro es un dispositivo que mide la distancia que un cono o varilla se introduce en un alimento, en un tiempo determinado. La profundidad de penetración dependerá del peso del cono y del ángulo al cual se introduzca, el tipo de material, la temperatura del alimento y el tiempo de penetración (Lewis, 1993).

3.1.2.2. Texturómetro

De los métodos de penetrometría se derivaron los análisis de perfil de textura que han sido usados para analizar el yogurt tipo firme. Este tipo de pruebas consisten en simular dos mordidas imitando las funciones de la quijada. De las curvas de fuerza-tiempo que se generan durante estas compresiones se pueden obtener diferentes parámetros texturales que están altamente correlacionados con los parámetros sensoriales (Szczesniak *et. al.*, 1963). A continuación se mencionan cuales son y su significado:

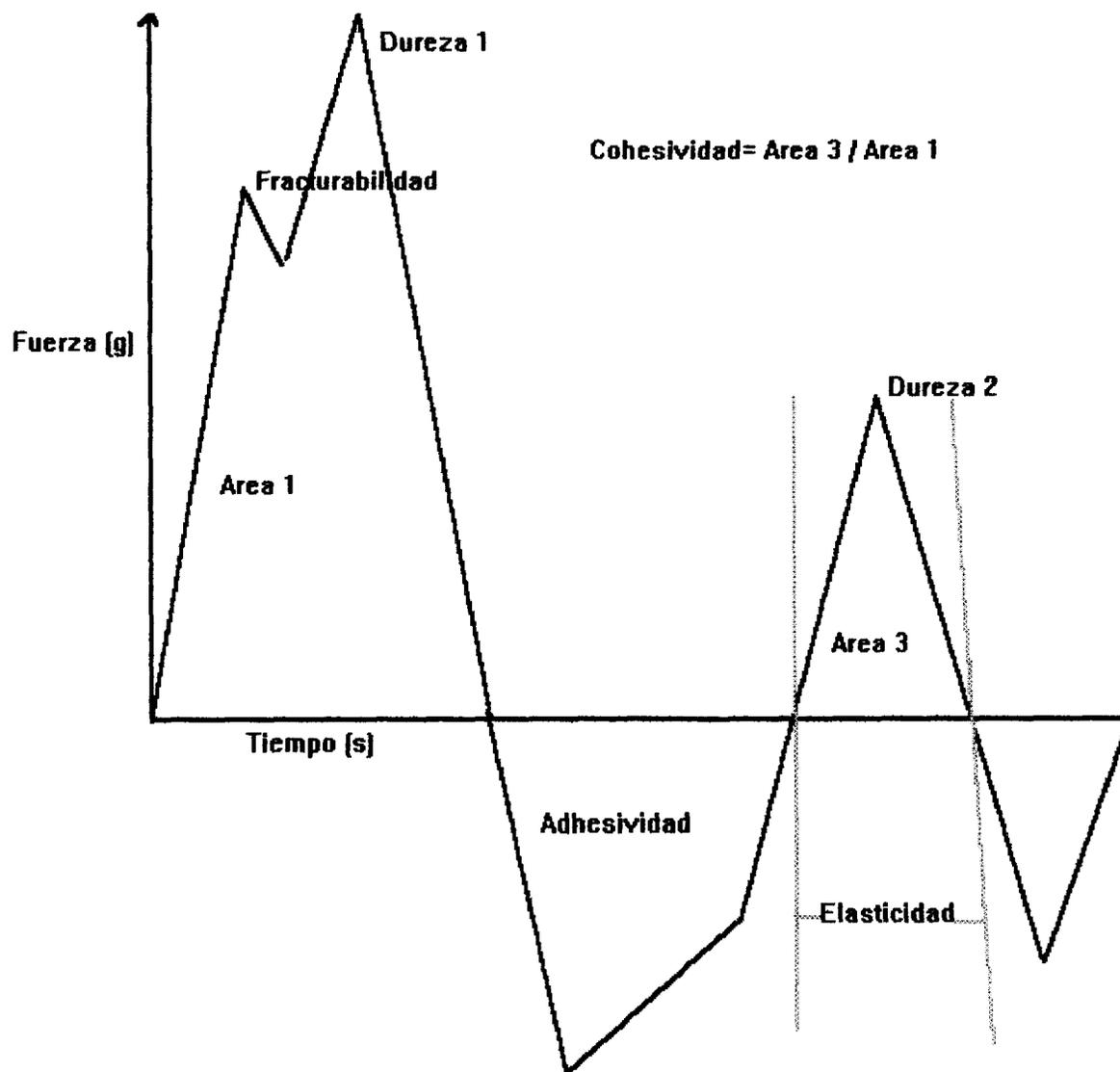


Figura 3.1.2.2.1. Gráfica que se genera durante el análisis de perfil de textura, en el cual se llevan a cabo dos compresiones que simulan dos mordidas. A partir de esta gráfica se calculan 6 parámetros: Elasticidad, Adhesividad, Fracturabilidad, Dureza 1 (referente a la primera mordida), Dureza 2 (referente a la segunda mordida) y Cohesividad.

- a) **Dureza** (firmeza).- Se define como la fuerza necesaria para lograr una deformación dada.
- b) **Cohesividad**.- Definida como la fuerza de interacción entre los enlaces internos que forman el cuerpo del producto.

c) **Elasticidad**.- Tasa a la cual un material deformado regresa a su condición inicial después de que se retira la fuerza deformante.

d) **Adhesividad** (pegajosidad).- Definida como la fuerza que necesita un alimento para sobreponerse a las fuerzas de atracción existentes entre su superficie y la de otros materiales con los que dicho alimento entra en contacto.

3.1.3. Reología

La reología, o ciencia de la deformación de la materia, se ocupa de la deformación de los cuerpos aparentemente continuos y coherentes, pero con frecuencia trata también de la fricción entre sólidos, del flujo de polvos, e incluso de la reducción a partículas, o molturación (Muller, 1973).

Conocer las propiedades reológicas de los alimentos fluidos es importante, en el diseño de procesos de flujo, el control de calidad, en las mediciones de estabilidad en almacenamiento y procesado así como en la comprensión y designación subjetiva de atributos de textura de alimentos (Rao, 1977).

En el experimento reológico más simple se aplica una fuerza a una muestra y se observa su comportamiento. Esta fuerza se aplica tangencialmente o normalmente a una superficie. En cualquiera de los dos casos la fuerza dividida por el área sobre la cuál se aplicó se conoce como **esfuerzo (stress)** y se representa con la letra griega σ . Si la muestra se deforma debido al esfuerzo tangencial aplicado, la deformación se conoce

como **deformación relativa de cizalla (shear strain)** y se representa con la letra griega γ . La velocidad a la cuál se lleva a cabo esta deformación se conoce como **velocidad de deformación relativa de cizalla (shear rate)** y se representa como $\dot{\gamma}$ (Prentice, 1992).

El módulo o coeficiente de rigidez (G) se define como el esfuerzo de cizalla entre la deformación relativa de cizalla. Lo que implica que la aplicación de un esfuerzo de cizalla (σ) provoca una deformación relativa (γ), siendo ambas directamente proporcionales. Cualquier cuerpo que presente esta propiedad se conoce como un sólido ideal de Hook (Prentice, 1992).

$$G = \sigma/\gamma$$

Un fluido para el cuál la velocidad de deformación es estrictamente proporcional al esfuerzo que se aplica se conoce como un fluido Newtoniano

$$\sigma = -\eta \dot{\gamma}$$

Algunos productos semi-líquidos presentan conjuntamente propiedades de flujo viscoso y sólido elástico, denominándose viscoelásticos. El conocimiento de las propiedades viscoelásticas es muy útil ya que nos ayuda a entender la interrelación entre la estructura y la respuesta mecánica lineal de macromoléculas, por otro lado determina las funciones materiales que caracterizan el comportamiento y movimiento o flujo dependiente del tiempo de

los sistemas, lo que ayuda a resolver problemas de interés en ingeniería que involucran la existencia de fenómenos de flujo no estacionario en los cuales la respuesta elástica del material es importante (Ferry, 1980; Lewis, 1993).

Las pruebas dinámicas muestran como, al aplicar una deformación o velocidad de deformación en forma oscilatoria continua a un esfuerzo constante o al aplicar un esfuerzo cortante en forma oscilatoria a una velocidad de deformación fija, aparece una onda sinusoidal de esfuerzo. Para los sólidos elásticos esta onda está en fase con la de la deformación aplicada, mientras que para el fluido viscoso perfecto existe un desfase de 90° . En los materiales viscoelásticos el ángulo de desfase está comprendido entre 0° y 90° (Ferry, 1980; Lewis, 1993).

La caracterización de estos materiales puede hacerse, entonces por medio de dos propiedades reológicas: el módulo de rigidez o almacenamiento (G') que representa la parte elástica del material, y el módulo de pérdida (G'') que representa su carácter viscoso. Si γ y σ son, respectivamente, las amplitudes de las ondas de deformación y esfuerzo, y ϵ el ángulo de desfase, los módulos G' y G'' vienen definidos por (Ferry, 1980; Prentice, 1992):

$$G' = (\sigma/\gamma) \cos \epsilon$$

$$G'' = (\sigma / \gamma) \text{sen } \epsilon$$

La viscosidad compleja se define como:

$$\eta^* = ((\eta')^2 + (\eta'')^2)^{1/2}$$

La η' es la componente viscosa, mientras que η'' es la componente elástica o desfasada. Estas funciones de viscosidad se definen por las siguientes ecuaciones, donde ω es la frecuencia (Ferry, 1980; Prentice, 1992).

$$\eta' = G''/\omega$$

$$\eta'' = G'/\omega$$

Otro parámetro que se puede cuantificar por medio de este tipo de pruebas es la $\tan \delta$ (tangente de pérdida) que representa la relación entre la energía disipada y la energía almacenada elásticamente, siendo una función del comportamiento de relajación entre las moléculas del sistema y los enlaces presentes (Ferry, 1980). Esta definida de la siguiente manera:

$$\tan \delta = G''/G'$$

3.1.4. Microscopía electrónica

Recientemente se ha utilizado la microscopía electrónica para descifrar la microestructura de algunos alimentos debido a que la resolución que ofrece puede ser hasta de nanómetros ($1\text{nm} = 1 \times 10^{-9}$) (Kalab, 1993). El interés de ésta herramienta en las compañías de alimentos ha ido en aumento, ya que se han podido establecer correlaciones entre la microestructura y las propiedades físicas del producto (Kalab, 1979). Básicamente dos tipos de microscopía electrónica se han usado con éstos fines: 1) Microscopía de barrido, que utiliza la dispersión de electrones reflejados que se producen al hacer incidir un rayo de luz a la muestra, formando una imagen tridimensional de ésta. 2) Microscopía de transmisión, en la cual la sombra producida por la muestra irradiada por un rayo electrónico, se observa en una pantalla fluorescente.

Para la microscopía de barrido, el tratamiento que se le tiene que dar a la muestra consiste en: atrapamiento de la muestra en agar; fijación, generalmente se utiliza el tetraóxido de osmio con éste propósito; deshidratación, se utiliza alcohol etílico absoluto con diferentes porcentajes de pureza y un secado posterior; montaje y finalmente recubrimiento con pequeñas capas de carbón y oro, siendo esta última un prerequisite para tener excelentes micrografías (Kalab, 1979). La microscopía de barrido tiene la ventaja de que pueden observarse los objetos tridimensionalmente, lo que en la industria láctea ha facilitado la visualización de objetos como matrices de proteína en quesos y yogurt, así como bacterias lácticas embebidas en éstas.

3.2. Generalidades del yogurt.

3.2.1. Influencia de los factores tecnológicos sobre las características texturales del yogurt.

Los cultivos iniciadores juegan un papel esencial en la producción de yogurt y por ende, en sus características texturales. Sin embargo, hay otros factores que tienen influencia sobre estas últimas como son: concentración de la leche, pasteurización, homogeneización y fermentación (Tamime, 1985; Prentice, 1992). A continuación se mencionará brevemente la contribución de cada uno de ellos sobre las características texturales de los geles.

3.2.1.1. Concentración de la leche.

Por lo general, la leche se modifica, ya sea por la adición de leche descremada en polvo u otros sólidos de leche (García-Garibay *et. al.*, 1993). Se ha visto que el aumento de materia seca dentro de 12-15 % S.T. (sólidos totales) aporta más firmeza al yogurt (Prentice, 1992; Arshad *et. al.*, 1993) ya que las interacciones proteína-proteína se ven favorecidas (van Marle y Zoon, 1995; García-Garibay y Marshall, 1991; Rohm, 1993 a y b). De esta manera se logra proporcionar al gel una mayor resistencia a los daños mecánicos, evitando así el desuerado durante su manejo (García-Garibay *et. al.*, 1993).

3.2.1.2. Pasteurización

El tratamiento térmico es esencial para un desarrollo adecuado de la estructura del yogurt. Cuando la leche se calienta a 85°C o más, la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina forman complejos con la κ -caseína (Parnell-Clunies *et. al.*, 1988). Se ha observado que la cantidad del complejo formado está relacionado con el grado de tratamiento térmico al que se somete la leche (Parnell-Clunies *et. al.*, 1988). Esta asociación es importante para la fusión y la hidratación de las micelas de caseína durante la fermentación (Prentice, 1992)

3.2.1.3. Homogeneización

Este proceso hace que la membrana original de los glóbulos grasos se desprenda y sea reemplazada por subunidades de un complejo κ -caseína- β -lactoglobulina. Por otro lado, este tratamiento contribuye a una reducción del tamaño de partícula y a una distribución más uniforme, lo que hace que la matriz se vuelva más homogénea, y como consecuencia, un aumento en la firmeza del gel. Si hay glóbulos de grasa con un diámetro mayor que 3 μm se encontrará una protuberancia en la red, lo que ocasiona desorden en la matriz proteica estructural formando consecuentemente un mayor número de regiones débiles (Prentice, 1992 ; Jost, 1993).

3.2.1.4. Fermentación

Durante este proceso ocurre una hidrólisis de la lactosa a ácido láctico, con la formación de pequeñas cantidades de otros metabolitos. El ácido láctico es responsable de la formación del coágulo, firmeza y sabor ácido característicos del yogurt (García-Garibay *et. al.*, 1993). La formación del coágulo durante la elaboración del yogurt, obedece al hecho de que a un pH cercano a 4.6 las micelas de caseína de la leche coalescen en forma de cadenas o conglomerados para formar una estructura tridimensional en la cual queda atrapado el suero (Prentice, 1992 y García-Garibay *et. al.*, 1993). A pH altos (>5.4) las micelas de caseína mantienen su estado nativo (100-250 nm), pero cuando el pH alcanza valores de 5.1, las partículas sufren disociaciones parciales formando subpartículas de 30 a 40 nm, y cuando se alcanza pH del orden de 4.8 a 4.3 las partículas de caseína forman grandes conglomerados que atrapan la grasa y el suero, y que son responsables de las altas viscosidades del producto (Prentice, 1992; García-Garibay *et. al.*, 1993). A lo largo de este proceso la viscosidad aumenta dramáticamente mientras que el pH disminuye llegando a un máximo cuando el pH alcanza un valor de 5 (Prentice, 1992).

Esta matriz es un gel donde la fase acuosa constituye la fase discontinua y es el sistema que corresponde al yogurt firme. Este gel puede batirse sin que ocurra pérdida de suero, pero entonces una inversión de fases toma lugar, quedando así en el yogurt tipo suizo un sistema donde la fase continua es la fase acuosa (García-Garibay *et. al.*, 1993).

3.2.2. Cepas filantes

Para proporcionar características de textura y cuerpo deseable en el yogurt se han usado cepas mucógenas de *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (García-Garibay, 1993). Se cree que las cepas mucógenas o filantes proporcionan una mayor unión entre la cepa y la matriz proteica, lo que provoca un aumento en su consistencia (Benezech y Maingonnat, 1994). Otro aspecto importante que se ha observado es que los geles formados por cepas filantes son menos susceptibles a la sinéresis (Teggatz y Morris, 1990; Wachter-Rodarte, 1993). Se ha demostrado que ésta es una característica deseable en países como Francia, Holanda y México donde el uso de estabilizantes está prohibido (García-Garibay *et. al.*, 1993). Adicionalmente, la tendencia en el consumidor hacia los productos “100% natural”, es decir sin aditivos, puede satisfacerse mediante el uso de este tipo de cepas (Schellhaass y Morris, 1985).

3.2.2.1. Efecto de las condiciones de fermentación sobre la producción del exopolímero

Estudios previos (Cerning, 1995; Gancel y Novel, 1994 a y b) han llegado a la conclusión de que las condiciones de fermentación (temperatura y tiempo de incubación) y la composición del medio (fuente de carbono y nitrógeno) afectan la producción del polímero y la composición de éste.

La producción de exopolímero por *Lactobacillus casei* es favorecida a temperaturas entre 32°C y 37°C como lo demuestra Mozzi *et. al.* (1995) y Arshad *et. al.* (1993). Por otro lado, se ha visto que la producción de exopolímero aumenta en un 50% cuando los organismos de *Lactococcus lactis* crecen a 25°C en lugar de 30°C (Cerning *et. al.*, 1992).

Las investigaciones de cepas filantes fermentando otro tipo de substratos que no son leche como: sueros concentrados, retenidos de leche y medios sintéticos facilitan la separación del exopolisacárido y permiten el estudio de la influencia de determinados componentes del medio (Gruter *et. al.*, 1993; Cerning *et. al.*, 1994; Marshall *et. al.*, 1995; Gassem *et. al.*, 1995).

Se ha reportado que el aumento en la concentración de la leche no tiene influencia directa sobre la producción de exopolisacárido (Wacher-Rodarte *et. al.*, 1993). Otros estudios citan que cuando se utiliza ultrafiltrado de leche como substrato la producción del exopolímero por *Lactococcus lactis* es menor que en leche (Cerning, 1992). Estos estudios no coinciden con los realizados por García-Garibay y Marshall (1991) quienes reportan que al agregar hidrolizado de caseína a leche descremada, las cepas de *Lb. bulgaricus* producen mayor cantidad de exopolímero. Cerning, *et. al.* (1990) por otro lado menciona que *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* pueden formar polisacáridos exocelulares en retenido de leche enriquecido con casaminoácidos. Se ha reportado que la presencia de elementos como calcio y manganeso estimulan la producción de exopolímero (Mozzi *et. al.*, 1995).

3.2.2.2. *Composición química del exopolímero*

La composición química y la estructura del exopolímero producido por estas cepas no ha sido establecida. Se ha reportado que la goma formada es un heteropolisacárido compuesto de unidades lineales y ramificadas que se acomodan desde disacáridos hasta heptosacáridos, siendo el peso molecular final de 1 a 2×10^6 (Cerning, 1995). Los componentes principales son: glucosa y galactosa, sin embargo, la proporción en la que se encuentran ambos compuestos varía.

Algunos autores describen al polisacárido como un hexopolímero de galactosa, glucosa y ramnosa en una proporción de 5:1:1 (Gruter *et. al.*, 1993) mientras que otros afirman que la relación de los azúcares antes mencionados es de 4:1:1 (Cerning *et. al.*, 1986). Grobben *et. al.* (1995) reportan que el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* NCFB 2772 en un medio químicamente definido con glucosa y lactosa, como fuente de carbono, presentaba una composición en el exopolisacárido purificado de glucosa, galactosa y ramnosa en una proporción de 1:6.8:0.7. A pesar de que estos autores no coinciden en la proporción exacta con los otros mencionados, los componentes del polímero detectados son los mismos.

Hay estudios que difieren a este respecto, por ejemplo se encontró que el polímero de *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* CRL 420 producido en leche tenía una composición de glucosa y fructosa en una proporción de 1:2. (Manca de Nadra *et. al.*, 1985). El exopolisacárido producido por

Lactobacillus casei CG11, aislado de queso presentaba una composición de glucosa y ramnosa (75% y 15%) (Kojic *et. al.*, 1992). Zourari *et. al.* (1992), aislaron los polímeros exocelulares producidos por 3 cepas de lactobacilos procedentes de yogurts griegos tradicionales, encontrando que su composición era de galactosa (50-70%), glucosa (20-40%) y el resto de manosa y arabinosa. Doco *et. al.* (1991), mencionan que el polímero aislado de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* estaba conformado por galactosa y glucosa.

Hay investigaciones que sugieren que el polisacárido está unido a una proteína (Cerning *et. al.*, 1986 y 1990; García-Garibay *et. al.*, 1991; Tegatz, *et. al.*; 1990). Autores como Nakajima *et. al.* (1990) aislaron un polímero de *Lactococcus lactis* ss. *cremoris* SBT 0495, el cuál era una glicoproteína. Al realizar electroforésis encontraron 5 bandas con pesos moleculares dentro del rango de 20,000 a 200,000. Esta confirmación también se ha sustentado con estudios realizados por medio de microscopía electrónica (Schellhaass y Morris, 1985; Tegatz y Morris, 1990).

3.2.2.3 .Estudios de microscopía electrónica

Se ha observado la microestructura del yogurt mediante microscopía de barrido y de transmisión, de manera que se ha establecido que el yogurt consiste en una red tridimensional formada por las interacciones de las micelas de caseínas, formando pequeñas cadenas interconectadas (Kalab, 1979 y 1993). Esta matriz tiene espacios intersticiales que contienen la fase líquida, la cual depende de la concentración de caseína presente: a mayor concentración de

proteína, menores los espacios intesticiales, por lo que la estructura de la matriz es uno de los factores más importantes que tienen efecto sobre la susceptibilidad de sinéresis (Kalab, 1979 y 1993). Existen espacios un poco más grandes donde se encuentran localizadas las cepas iniciadoras. Las cepas filantes tienen la particularidad de unirse con la matriz proteica mediante el exopolímero que producen (Schellhaass y Morris, 1985; Tegatz y Morris, 1990), a estas se les atribuye la función de atrapar agua por lo que se conocen como mucógenas, razón por la cuál pueden también disminuir la susceptibilidad de sinéresis.

En micrografías de muestras que han sido deshidratadas previamente al examen microscópico, el exopolímero aparece en forma de filamentos y no como una mucosa. Esto es debido a que los exopolisacáridos no pueden ser fijados químicamente, por lo que se encogen y se deshidratan (Kalab, 1993).

Con base a esta información, Hess *et. al.* (1997) establecen dos sistemas bidimensionales que se muestran a continuación (Figura 3.2.2.3.1 y 3.2.2.3.2)

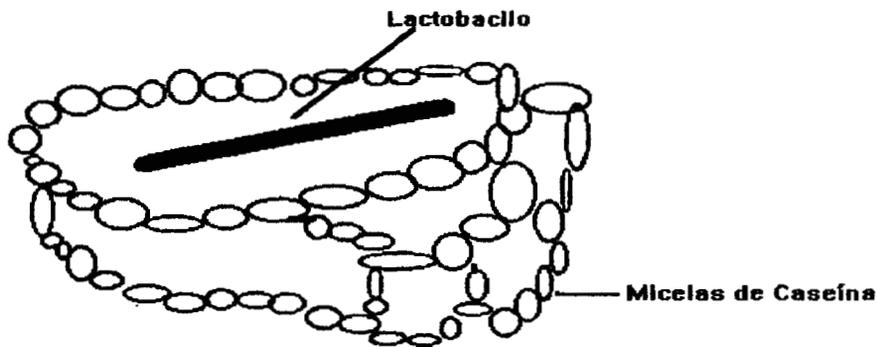


Figura 3.2.2.3.1. Modelo bidimensional de un producto fermentado elaborado a partir de una cepa no filante, donde la matriz tridimensional esta formada por cadenas de micelas de caseína. Se forman dos tipos de espacios, uno de los cuales esta ocupado por *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus*, mientras que los otros contienen la fase acuosa del producto fermentado.

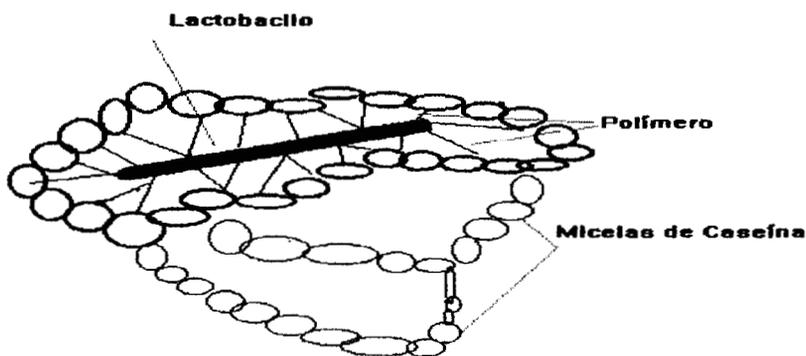


Figura 3.2.2.3.1. Modelo bidimensional de un producto fermentado elaborado a partir de una cepa filante: Los filamentos del exopolisacárido conectando a *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* con la matriz de micelas de caseína.

3.3. Caracterización reológica y de textura del yogurt.

3.3.1. Penetrometría

Tamine y Robinson (1985) mencionan que la técnica más apropiada para medir la firmeza del yogurt firme es mediante el uso de un penetrómetro. Las ventajas de este tipo de prueba son los bajos costos del equipo y la característica de correlacionar los resultados obtenidos con pruebas subjetivas.

Autores como Kalab *et. al.* (1974); Labrapoulos *et. al.* (1981); Schellhaass y Morris (1985); Motar y Bassier (1989); Rohm (1989), Tamime *et. al.* (1989), Rohm y Kovac (1994) y Hess *et. al.* (1997) han realizado experimentos de este tipo; desafortunadamente, el método difiere en las tasas y profundidades de penetración y aparatos utilizados; por lo anterior los resultados difícilmente se pueden comparar. Sin embargo, este tipo de pruebas empíricas han sido útiles para determinar el efecto de las diferentes condiciones de proceso sobre el comportamiento del gel producido durante la fermentación láctica.

Por otro lado, Hess *et. al.* (1997) desarrollaron pruebas usando el analizador de textura (TA-XT2; Stable Micro Systems, Surrey, England) para observar el comportamiento filante. En dicho analizador, el gel se sometía a una compresión (5 mm sobre la base), la geometría se retiraba (100 mm a una velocidad de 10 mm/s) y se observaba el tiempo de rompimiento de la “hebra”

producida, calculándose con este parámetro la extensibilidad del gel (distancia para romperse (s) x 10 mm/s).

3.3.2. Análisis de perfil de textura

Se han reportado pocos estudios en productos lácteos al respecto. Uno de ellos, Anon (1995), menciona que los resultados obtenidos de esta prueba pueden correlacionarse con pruebas sensoriales.

Autores como Toba *et. al.* (1990), estudiaron las características de adhesividad, cohesividad y dureza, mediante un análisis de perfil de textura (Reómetro NES-200J, Japón), en una leche fermentada nórdica llamada “villi” elaborada a partir de una cepa filante y una no filante de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. La prueba se llevó a cabo introduciendo un émbolo de acero inoxidable (20 mm de diámetro y 5 mm de grueso) a una profundidad de 20 mm de la superficie del gel, con una velocidad constante de 6.0 cm/min. Se encontró que solo había una pequeña diferencia entre la dureza y la cohesividad de ambas muestra, mientras que la adhesividad resultaba ser el doble en la cepa filante que en la no filante.

3.3.3. Caracterización reológica y de textura del yogurt

3.3.3.1. Pruebas de flujo

El comportamiento de flujo del yogurt tipo firme y en particular del batido es de gran importancia para definir las características de la calidad de un

producto; así como las condiciones de proceso (velocidad de agitación) o para definir las características de la maquinaria que debe usarse (bombas, tuberías, sistema de enfriamiento, etc. (García-Garibay *et. al.*, 1993).

3.3.3.1.1. Pruebas empíricas

En este tipo de pruebas se miden parámetros específicos como son: índice de viscosidad expresado como porcentaje, tiempo, índice de Brookfield (Tabla 3.3.3.1.1.1.). Este tipo de análisis es conveniente sólo en sistemas altamente estandarizados. Los experimentos se pueden llevar a cabo en el yogurt tipo firme (Labropoulos *et. al.*, 1981) o puede batirse antes de la prueba por medio de procedimientos arbitrarios (Mottar y Bassier . 1989). Los aparatos usados son principalmente del tipo industrial (Parnell-Clunies *et. al.*, 1988) y los procedimientos así como la temperatura son muy específicos.

3.3.3.1.2. Pruebas de histéresis

En este tipo de experimentos se cuantifica la ruptura de la estructura por efecto del cizallamiento, con una posterior recuperación de la misma en el reposo, permitiéndose obtener el grado de tixotropía. Mottar y Bassier (1989) calcularon las áreas de las curvas de histéresis reportándolo como el grado de tixotropía (Tabla 3.3.3.1.2.1). Por otro lado, Ramaswamy y Basak (1991), llevaron a cabo tres ciclos sucesivos de histéresis, observando el traslape en dos de las curvas. Demostraron que al aplicar una velocidad de deformación en forma cíclica, es decir aumentándola y posteriormente disminuyéndola, ocurre

una degradación estructural (Tabla 3.3.3.1.2.1.). Rohm (1992) mostró que este tipo de caracterizaciones son altamente dependientes del procedimiento que se le aplique. Estudió el efecto de diferentes períodos de tiempo y el efecto de la velocidad de corte escogida, logrando con esto que las curvas de histéresis aumentarán dramáticamente. Se encontró que el aumento en el área de las curvas de histéresis era proporcional a la rapidez de deformación cuando estas eran mayores a 100 s^{-1} . A partir de estos resultados, Rohm (1992) sugiere estandarizar el método para llevar a cabo este tipo de pruebas, y así poder comparar los resultados obtenidos.

Tabla 3.3.3.1.1.1. Condiciones de pruebas empíricas efectuadas.

Autores	Viscosímetro	Tipo de yogurt	Forma en la que se preparó la muestra	Mediciones
Labropoulos <i>et al.</i> (1981)	Haake Rotovisco RV3, cilindros coaxiales, rotor MVII	Firme	Se esperó 3 minutos antes de cada medición	Viscosidad aparente a 24.4 s^{-1} después de 13 minutos de cizalla a 4°C , 1.5 r/min , a 6°C
Parnell-Chimes <i>et al.</i> (1988)	Nametre vibrating sphere	Firme		Índice de viscosidad a 45°C .
Mottar y Bassier (1989)	Haake Rotovisco RV2, cilindros coaxiales, rotor MVI	Firme	Homogeneización estándar durante 10 s a 43°C	Curvas de histéresis (nivel de rompimiento) proporción de los índices de viscosidad a 7°C

Ramaswamy y Basak (1992) propusieron evaluar la dependencia del tiempo en yogurt tipo batido manteniendo las pruebas a una velocidad de corte constante durante 10 a 60 minutos a diferentes temperaturas. Los resultados muestran como después de 60 minutos de cizalla a velocidades de corte entre 100 y 500 s^{-1} , las muestras presentaban rompimiento estructural (Tabla 3.3.3.1.2.1). Esto fue confirmado posteriormente por los mismos autores en 1994, donde también observaron la tixotropía del yogurt. En este estudio se observó que el yogurt adicionado con pectina y azúcar, genera un gel más agradable para el consumidor.

Tabla 3.3.3.1.2.1. Condiciones de prueba de las curvas de histéresis efectuadas.

	Tipo de yogurt	Reómetro	Condiciones de Medición
Ramaswamy y Basak (1991)	Batido	Haake RV20, cilindros coaxiales, rotor MVI	Curvas histéresis Temperatura: 10-25°C, 0-500 s^{-1} en 5 min.
Ramaswamy y Basak (1992)	Batido	Haake RV20, cilindros coaxiales, rotor MVI	Temperaturas: 10,15, 20 y 25°C. Rapidez de deformación constante: 10,100,200, 300,400 y 500 s^{-1} . Tiempo: 0-600 o 3600s
Basak y Ramaswamy (1994)	Batido	Haake RV20, cilindros coaxiales, rotor MVI	Temperatura: 10°C, se les llevó de una rapidez de deformación de 0 a 300 s^{-1} en 3 minutos, manteniéndolo ahí 10 minutos, para posteriormente regresarlo a 0 s^{-1} en los siguientes 3 minutos.
Rohm (1992)	Batido	Rheometrics RFS2, cono y plato, platos paralelos y cilindros coaxiales.	Temperatura: 15°C, Diámetro del cono: 0.05m, ángulo del cono: 0.04 rad, diámetro de los platos: 0.05 m, espacio anular: 0.0005 m, diámetro de geometría interna: 0.034m, diámetro de geometría externa: 0.032 m, altura: 0-0.0335m

3.3.3.1.3. Pruebas a esfuerzo de cizalla constante

Steventon *et. al.* (1990) sometieron muestras a esfuerzos de cizalla constante y observaron la viscosidad aparente a través del tiempo bajo diferentes condiciones de temperatura. El objetivo era simular el cizallamiento de los yogurts durante el proceso.

Tabla 3.3.3.1.3.1. Condiciones de prueba a esfuerzo de cizalla constante efectuada.

	Tipo de Reómetro yogurt	Mediciones
Steventon <i>et. al.</i> (1990)	Batido, Firme	Carrimed CS 100, cono y plato Temperaturas: 44°C (primer paso) y 10°C Diámetro del cono: 0.04 m, ángulo del cono: 2°, Esfuerzo de cizalla 40 Pa (19s); 199 Pa (40s); 50 Pa (30s); descanso durante 16 horas; 50 Pa (30s) y 150 Pa (10s).

3.3.3.2. Pruebas dinámicas.

Recientemente las pruebas dinámicas se han usado para caracterizar las propiedades reológicas del yogurt. Steventon *et. al.* (1988, 1990) y Xiong y Kinsella (1991 a y b) han evaluado las propiedades viscoelásticas de este tipo de geles, en donde el módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G'') describen, respectivamente, las propiedades elásticas y viscosas del gel. Estas variables respuestas proporcionan más información sobre la estructura del material que las mediciones de viscosidad y facilitan la comparación de los resultados aunque se usen diferentes instrumentos.

3.3.3.2.1. Condiciones de pruebas dinámicas efectuadas.

Autores	Tipo de yogurt	Reómetro	Condiciones de medición
Stevenson et al., (1988)	Batido	Rheometrics platos paralelos diámetro: 50 mm espacio anular: 0.5 y 1 mm	Frecuencia de oscilación: 0-1 rad/s Temperatura: Ambiente
Stevenson et al., (1990)	Batido Firme	Rheometrics platos paralelos diámetro: 50 mm espacio anular: 0.5 y 1 mm	Frecuencias de oscilación: 0.1,1,10 y 100 rad/s. Temperatura: ambiente
Xiong y Kinsella, (1991b)	Tipo firme	Rheometrics platos paralelos espacio anular: 1 mm	Frecuencia de oscilación 0.631 rad/s. Grosor de la muestra: 1 mm. Deformación: 2%

Xiong y Kinsella (1991 a y b) observaron el cambio de los valores de G' y G'' durante la formación de la red en el gel. Establecen, con base en publicaciones previas (van Kleef *et. al.*, 1978) que la magnitud del componente G' es proporcional al número de uniones entre las proteínas que forman el gel.

3.3.3.3. Efecto de la cepa sobre las características reológicas del producto.

Schellhaass y Morris (1985) observaron por medio de microscopía de barrido que había diferencias entre una cepa filante y una no filante en cuanto a su microestructura. La cepa filante generaba un exopolímero que estaba unido con la matriz proteica y el lactobacilo, en cambio la cepa no filante solo contenía a estos microorganismos embebidos en la malla tridimensional del sistema. Estas diferencias tenían efecto sobre las características de viscosidad aparente del gel (Tabla 3.3.3.2.1.).

Teggatz y Morris (1990) usaron una cepa filante de *L. delbrueckii* ss. *bulgaricus* y una cepa no filante de *Streptococcus thermophilus*, para producir un gel que sometieron a pruebas de flujo. Las muestras fueron analizadas por microscopía de barrido después de someterlo a diferentes velocidades de corte. Observaron que a una velocidad de corte de 139 s^{-1} no se aprecian diferencias entre un yogurt no cizallado y uno cizallado. Sin embargo, cuando la rapidez de deformación se encontraba en el rango de 222 a 833 s^{-1} se observó menos exopolisacárido y una matriz tridimensional amorfa. Teggatz y Morris (1990) concluyeron que bajo estas condiciones de cizallamiento (Tabla 3.3.3.2.1.) ya no era posible ver la bacteria unida al exopolisacárido, por lo que, probablemente ésta debió unirse a la matriz proteica, donde continuaba ejerciendo influencia sobre las propiedades reológicas del mismo.

Rohm y Schmid (1993) evaluaron curvas de flujo en yogurt usando tres diferentes cultivos iniciadores. El estudio presenta curvas de esfuerzo de cizalla contra velocidad de corte (Tabla 3.3.3.2.1.) y se muestra que a bajas velocidades de corte los yogurts filantes muestran un esfuerzo de cizalla menor que los yogurts no filantes, mientras que a altas velocidades de corte, los yogurts muestran mayor esfuerzo de cizalla que los yogurts no filantes. Tomando en cuenta lo que postularon Skriver *et. al.* (1993) y Teggatz y Morris (1990) podemos atribuir esto a que las interacciones entre el polímero y la proteína requieren de mayor energía para romperse que las interacciones entre las proteínas que son responsables de dar la estructura al yogurt. Por lo que la disminución de la viscosidad inicial puede deberse a la ruptura entre las interacciones de las proteínas, y por otro lado, el adelgazamiento puede deberse al aumento en la energía requerida para romper las interacciones entre bacteria, polímero y proteína.

Rohm y Kovac (1994 y 1995) estudiaron la influencia de 11 cepas sobre las características reológicas (Tabla 3.3.3.2.1.) del gel del yogurt, encontrando que el uso de cepas filantes genera un gel más firme, probablemente por las interacciones caseína-cepa filante que se generan.

Autores como Hess *et. al.* (1997) mencionan que los yogurts hechos a partir de cepas filantes presentan menos adelgazamiento que los productos hechos con una cepa no filante. Los módulos de almacenamiento y pérdida disminuían cuando la deformación excedía 5% para los elaborados a partir de la cepa no filante y 10% para la cepa filante (Tabla 3.3.3.2.1.), lo que sugiere que los mecanismos de degradación estructural son diferentes para estos tipos de

yogurt. Todas las mediciones reológicas que llevaron a cabo demuestran que los geles elaborados a partir de una cepa filante son muy débiles.

Tabla 3.3.3.2.1. Condiciones a las que se evaluaron el efecto de la cepa sobre las características reológicas del gel.

Tipo de Reometro		Variables Respuesta	
yogurt			
Schellinas y Morris (1983)	Firme	Haake RV2 Cilindros coaxiales, sistema MVI	curvas de histéresis 12-250 s ⁻¹ durante 18 min.
Skriver, et. al. (1993)	Batido	Bohlin Van Rheometer. Se varía la velocidad de corte de 29.23 s ⁻¹ a 326.7 s ⁻¹ . Temp: 5°C, sistema de medición coaxial: C25	Curvas de esfuerzo de cizalla contra velocidad de corte
Rohm y Schmid (1993)	Batido	Rheometric RFS3 Fluids Spectrometer, cilindros concéntricos, cilindro inferior (d= 34mm) cilindro superior (d= 32mm, h= 33.5mm) Temperatura 15°C.	Curvas de esfuerzo de cizalla contra velocidad de corte. Se ajustaron al modelo de Herschel- Bulkley
Rohm y Kovac (1995 y 1994)	Batido	Rheometric RFS3 Spectrometer, cilindros concéntricos, cilindro inferior (d=34 mm) cilindro superior (d= 32 mm, h=33.5) Temperatura 15°C)	Se llevaron pruebas dinámicas, cuyas variables respuesta fueron G', G'' y tan δ
Hess et al., (1997)	Firme	Rheometric RFS Fluids Spectrometer, usando platos paralelos con una geometría de diámetro de 50 mm y con un espacio axial de 1.000 mm. 4°C.	Se hicieron barridos de frecuencia a una deformación constante (2%) y la frecuencia de oscilación varió de 0.1 a 100 rad/s. Los barridos de deformación se llevaron a cabo a una frecuencia constante de 1 rad/s, y la oscilación de deformación varió de 0.1 a 1000%. La viscosidad aparente se midió usando barridos de esfuerzo de 0.1 a 100 s ⁻¹ .
Tegatz y Morris (1990)	Firme	Haake Rotórico RV2, cilindros concéntricos, rotor MVI	Se tomaron muestras a diferentes velocidades de corte: 0, 139, 167, 194,22, 250, 278, 416 y 833 s ⁻¹ , que correspondían a 0, 0.5,0.6,0.7,0.8,0.9,1,1.5 y 3.0 minutos del ciclo de cizalla.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Establecer la contribución del polímero sintetizado por *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* NCFB 2772 y su interacción con la caseína sobre las propiedades reológicas de los productos lácteos fermentados.

4.2. Objetivos Particulares

- Determinar el efecto del substrato en la producción de exopolisacárido.
- Determinar la relación proteína-carbohidrato del extracto purificado producido por cepas mucógenas.
- Determinar la influencia del tipo de substrato y del exopolisacárido producido por las bacteria filante sobre la caracterización reológica y textural del producto.
- Efectuar un estudio de microscopía electrónica de los diferentes tipos de productos lácteos y establecer si existe correlación entre la estructura microscópica y la caracterización reológica y textural de los productos fermentados.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Microorganismos

Las cepas utilizadas fueron *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* NCFB 2772 (cepa filante) y *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* NCFB 1489 (cepa no filante), ambas de la National Collection of Food Bacteria, Reading, Inglaterra. Se resembraron cada 3 semanas en Litmus Milk (Difco, USA) a 37°C durante 12-15 horas.

5.2. Fermentaciones

5.2.1. Cultivo iniciador

Se preparó leche descremada (Nestlé, México) al 10% de sólidos, la cual se sometió a un proceso de esterilización (121°C durante 5 min); posteriormente se inoculó con la cepa seleccionada guardando una proporción de 5% v/v. Esta se fermentó 37°C durante 12 h.

5.2.2. Substratos

Se utilizaron cuatro diferentes substratos: suero (Kerry, México), suero adicionado con caseína al 1.5% (Sigma, México), leche descremada (Nestlé,

México) y retenido de leche por ultrafiltración (New Zeland Dairy Board, Nueva Zelanda). Se obtuvieron 4 niveles de sustrato con contenido proteico diferente, tanto en tipo de proteína presente como en cantidad (Tabla 5.2.2.1). Estos se prepararon al 12% de sólidos totales; posteriormente se sometieron a un proceso de pasteurización 85°C durante 5 minutos, seguido de 5 minutos en un baño de hielo. Esta operación se repitió 2 veces.

Tabla 5.2.2.1 Descripción de los sustratos utilizados

Substrato	Tipo de proteína presente	Cantidad de proteína presente (Técnica de Lowry)
Suero	proteínas de suero	9.074 mg/ml
Suero adicionado con caseína al 1.5%	proteínas de suero y caseínas	20.3 mg/ml
Leche descremada	proteínas de suero y caseínas	27.73 mg/ml
Retenido de Leche por ultrafiltración	proteínas de suero y caseínas	36.87 mg/ml

5.2.3. Condiciones de fermentación

Las fermentaciones se llevaron a cabo a 42°C hasta alcanzar un pH de 4.6; se monitoreó el cambio de pH (Conductronic pH 20) y acidez total expresada en % de ácido láctico, titulando con 0.1 N NaOH (Sigma, México) y fenolftaleína como indicador (Richardson, 1985).

5.2.4. Diseño Experimental

Se llevó a cabo un diseño experimental con 2 criterios, el primero con dos niveles, referentes a la cepa utilizada: *Lb. delbrueckii* ss. *bulgaricus* NCFB 2772 (cepa filante) y *Lb. delbrueckii* ss. *bulgaricus* NCFB 1489 (cepa no filante). Se manejaron cuatro diferentes niveles de sustrato: suero, suero adicionado con caseína (en una proporción de 1.5%), leche descremada y retenido de leche. Se realizaron 4 repeticiones, por lo que el tamaño de la muestra fue de 32.

5.3. Cuantificación del exopolisacárido

A 6 ml de sustrato fermentado se le adicionó 1 ml de TCA (Ácido Tricloroacético, J. T. Baker) al 80% y se agitó en el vórtex unos segundos. Posteriormente se centrifugó (centrífuga Beckman modelo J2-MI) a 10,000 rpm, 30 min, se tomaron 2 ml del sobrenadante y se adicionaron 2 ml de etanol (J.T. Baker). Después de reposar 20 minutos, se leyó la turbiedad a $\lambda = 720$ nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160A. Se interpoló en una curva patrón elaborada con dextrana (Sigma D-3759, Dextran Industrial Grade, P.M. = 71,500 Da) a diferentes concentraciones (0- 0.12 mg/ml)

5.4. Purificación del exopolisacárido

A un cultivo de 200 ml de substrato se le adicionó 33.4 ml de TCA (J.T. Baker) al 80%, se mezcló y posteriormente se centrifugó (centrífuga Beckman modelo J2-MI) a 10,000 rpm a 30 min. Se tomó el sobrenadante y se le ajustó el pH a 7 con NaOH (J.T. Baker) 4N. Esto se mezcló con tres volúmenes iguales de etanol absoluto (J.T. Baker), se dejó reposar durante 20 min. Se centrifugó a 4,000 rpm durante 20 min. El precipitado se resuspendió en 80 ml de agua destilada y el pH se ajustó a 4 con HCl N (Baker). Se centrifugó a 4,000 rpm durante 20 min. Al sobrenadante se le adicionaron 3 volúmenes iguales de etanol absoluto y se le dejó reposar 20 minutos, posteriormente se centrifugó a 4,000 rpm durante 20 min. El precipitado se disolvió con 80 ml de agua destilada, posteriormente se le ajustó el pH a 4. Se dializó (12,000 Daltones, Sigma) 48 hrs a 4°C, con agitación continua y contra cambios frecuentes de agua destilada.

5.5. Determinación de la relación proteína-carbohidrato en el exopolisacárido puro

La proteína se cuantificó por el método de Lowry, *et. al.* (1951) y los carbohidratos por el método de Doubois *et. al.* (1956). Posteriormente se calculó la relación existente entre estos dos (mg de proteína / mg de carbohidrato).

5.5.1. Técnica de Lowry

Se mezclaron 50 volúmenes de Na_2CO_3 (J.T. Baker) al 2% en NaOH (J.T. Baker) 0.1 N con un volumen de CuSO_4 (J.T. Baker) al 1% en H_2O y con un volumen de tartrato de Na y K (J.T. Baker) al 2% en H_2O . A cada ml de muestra se le adicionaron 5 ml de la solución anterior. Se dejó reposar 10 minutos en la obscuridad y se le agregaron 0.5 ml de reactivo de Folin Ciocalteu (Sigma) 1:1 en agua. Se dejó reposar 30 minutos en la obscuridad y se leyó a $\lambda = 590 \text{ nm}$ en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160A.

La curva patrón se preparó a partir de una solución de 500 mg/ml de seroalbúmina (Sigma) que se diluyó a diferentes concentraciones para abarcar un intervalo de 0 a 500 mg/ml.

5.5.2. Técnica de Fenol-Sulfúrico

Se colocó 1 ml de solución acuosa de la muestra y se adicionaron 0.6 ml de fenol (J.T. Baker) al 5%. Se agitó perfectamente después de la adición. Inmediatamente se adicionaron cuidadosamente 3.6 ml de ácido sulfúrico concentrado (J.T. Baker), agitando perfectamente. Se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente (aproximadamente 30 minutos) y se determinó la intensidad de color naranja obtenido en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160A a 480 nm, frente a un blanco preparado de la misma manera utilizando agua en lugar de muestra.

Se reportó con base en una curva patrón elaborada con glucosa (Sigma) (0-100 μg de glucosa/ml).

5.6. Caracterización reológica

Para los geles que tenían una menor consistencia, es decir aquellos que se elaboraron a partir de suero, suero adicionado con caseína al 1.5% y leche descremada, las propiedades viscoelásticas se llevaron a cabo en un reómetro Physica (Low Stress Rheometer LS100 Spring, Texas, USA), usando la geometría de doble espacio anular DG-1, con las siguientes características: diámetro del cilindro exterior: 50 mm; diámetro del cilindro interior: 48 mm, $l_b=36$ mm. La temperatura a la cual se realizaron las mediciones fue de $5\pm 0.2^\circ\text{C}$, controlada por un baño de temperatura controlada (Julabo F20).

Para poder establecer las condiciones de prueba se procedió a definir la zona de viscoelasticidad lineal mediante un barrido de esfuerzos (anexo1). Con base en estos resultados se seleccionó un torque para cada producto de fermentación dentro de la zona de viscoelasticidad lineal (Fig. 5.6.1). Todas las pruebas se llevaron a cabo a este torque.

Tabla 5.6.1. Torque dentro del rango de zona de viscoelasticidad lineal al cual se llevaron a cabo las pruebas oscilatorias.

Substrato	Cepa	Torque
Suero	no filante	4.50×10^{-3} mNm
Suero	filante	1.50×10^{-2} mNm
Leche descremada	no filante	5.00×10^{-2} mNm
Leche descremada	filante	1.00×10^{-1} mNm

Las muestras fueron extraídas con pipetas de los frascos donde se efectuaron las fermentaciones correspondientes, y se colocaron en el cilindro de medición. Se procedió a realizar el barrido de frecuencia a un esfuerzo constante.

Para las muestras de mayor consistencia (geles elaborados a partir de retenido de leche) se utilizó un reómetro Physica MC100 (Spring, Texas, U.S.A.) usando la geometría de cono y plato MK24 (diámetro= 0.075m y ángulo del cono 1°). La temperatura se controló con un baño de temperatura controlada Rheotherm RT51 y las mediciones se llevaron a cabo a $5^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Se llevó a cabo un barrido de deformación para encontrar la zona de viscoelasticidad lineal (Anexo 1) y así poder establecer las condiciones de prueba ($\gamma=0.35$, para ambas cepas).

Para el retenido de leche fermentado, se tomó la muestra con una espátula. Se colocó en el centro del cono tratando de que la cantidad de muestra fuera similar en todas las pruebas. Se retiró el exceso con una espátula de madera y se procedió a realizar las pruebas de barrido de frecuencia a una deformación constante.

Para todos los casos las variables respuesta fueron las siguientes:

G' (módulo de almacenamiento o módulo elástico), G'' (módulo de pérdida o módulo viscoso), η^* (viscosidad compleja) y $\tan \delta$ (tangente de pérdida).

5.7. Análisis de Textura

A partir de la caracterización reológica se procedió a realizar los experimentos texturales en aquellos geles en los que el módulo de almacenamiento predomina ($G' > G''$), es decir, geles semi-sólidos.

Se colocaron los substratos con los inóculos en recipientes de yogurt comercial con las siguientes dimensiones: altura 75mm, ancho 50 mm y largo 50 mm y se dejó fermentar a 37°C durante toda la noche. Posteriormente éstos se enfriaron a 4°C durante 48 h más y se realizaron las mediciones de textura en los mismos recipientes. Las pruebas se llevaron a cabo en un analizador de textura TA.XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems Ltd. Haslemere U.K.) a 10°C.

5.7.1. Análisis de Perfil de Textura (TPA)

Las pruebas de perfil de textura se llevaron a cabo usando como geometría un cilindro de acrílico de 1 pulgada, la fuerza del trigger que se utilizó fue de 2 g y el tiempo fue de 5 s. La velocidad previa a la que se llevó a cabo la prueba fue de 2.0 mm/s, la velocidad durante la prueba fue de 1.7 mm/s y la velocidad después de la prueba fue de 5.0 mm/s, teniendo como área de contacto 506.71 mm². Durante esta prueba se hacen dos penetraciones, simulando dos mordidas, siendo las variables respuesta : fracturabilidad, dureza, adhesividad, fuerza adhesiva y cohesividad.

Se llevó a cabo este experimento tanto en productos de fermentación tipo firmes como en los del tipo batido. Para estos últimos, se llevó a cabo un batido arbitrario para cada uno de los geles formados, produciendo de esta manera una inversión de fases, donde la fase continua es la fase acuosa. Para los yogures elaborados a partir de retenido de leche se introdujo una cuchara de metal y se batió 20 veces hacia un lado y 20 veces hacia el otro. Para los yogures elaborados a partir de leche descremada se batió 10 veces hacia un lado y 10 veces hacia el otro. Posteriormente se procedió al análisis.

5.7.2. Pruebas de ciclo.

Se llevaron a cabo usando como geometría una esfera de acero inoxidable de $\frac{1}{4}$ de pulgada, teniendo como área de contacto 31.670 mm^2 . La geometría penetró el recipiente 20% antes de comenzar la prueba. Se dejó reposar unos minutos y se procedió a iniciar las mediciones correspondientes. Las velocidades previas, durante y posterior a la prueba fueron de 0.1 mm/s , 2.0 mm/s y 0.1 mm/s , respectivamente, con una duración aproximada de 50 s. Durante esta prueba se hacen 10 penetraciones cíclicas. En este tipo de experimentos se estudia el comportamiento de las variables dureza, adhesividad, fuerza adhesiva y cohesividad al someter el gel a 10 compresiones secuenciales.

5.8. Microscopía electrónica

a) Preparación de muestra (atrapamiento en agar)

Se preparó agar bacteriológico (Bioxon) al 2%, el cuál se sometió a un proceso de esterilización de 121°C durante 15 minutos. Se dejó gelificar en cajas petri pequeñas y se procedió a hacer pozos con capilares calientes. Dentro de estos capilares se colocó el substrato previamente inoculado en una proporción de 5%(v/v) y se llevó a cabo la fermentación a 37°C durante 12 h. Se quitó el exceso de muestra y se colocó una capa de agar bacteriológico al 2%. Después de la fermentación se procedió a cortar en cubos de aproximadamente 2 a 4 mm, de tal manera que se lograra un encapsulamiento en el agar bacteriológico.

b) Fijación

Se colocó la muestra encapsulada en agar en frascos de rosca de 3.6 ml y se colocó en glutaraldehído (Electron Microscopy Science) al 1% durante 24 horas a 4°C. Posteriormente se colocó la muestra en 0.5 ml de textraóxido de osmio (Electron Microscopy Science) al 2%, para llevar a cabo un proceso de post-fijación, durante 1 hora a 4°C.

c) Deshidratación

La muestra se colocó en alcohol etílico absoluto a diferentes porcentajes (25%, 50%, 75%, 99% y 100% (3 veces)) durante 10 minutos cada uno.

d) Secado a Punto Crítico

Se colocó la muestra en cajas microporosas y se procedió a secar a punto crítico (Samdri-780-B, Sample Drying at the Critical Point Tousimis, Tousimis Research Corporation, Japan) usando dióxido de carbono como medio de transición.

e) Montaje

Se colocó la muestra en un portamuestras de aluminio con una cinta de carbono de doble vista. Se recubrió con oro (Bal-Tec SCD 050, Sputter Coater, Suiza) con un espesor final de 50 Å.

f) Observaciones en el Microscopio de Barrido Diferencial

Se llevaron a cabo observaciones en el microscopio de barrido diferencial (Zeiss DSM 940 A, Digital Scanning Microscope, Alemania) con un haz de electrones 100% secundarios y 10 kV.

5.9. Análisis Estadísticos

Para las pruebas de textura se utilizó el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System), llevándose a cabo una prueba de ANOVA y en caso de haber diferencia estadística, se procedió a realizar la prueba de Duncan con $\alpha = 0.05$

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1. Cinética de fermentación

Se sabe que existen pruebas indirectas que nos sirven para conocer la velocidad de crecimiento de las bacterias lácticas, como son los análisis de desarrollo de acidez y disminución de pH. La producción de ácido láctico contribuye a la desestabilización de las micelas de caseína que conduce a la precipitación de la caseína a valores de pH de 5.0 a 4.6, dando lugar a la formación del gel (Amiot, 1991).

Los resultados muestran que el tipo de sustrato usado para la fermentación láctica tiene influencia tanto sobre la producción de ácido láctico como sobre el tiempo requerido para alcanzar el pH final de 4.6.

Con base en los resultados se puede establecer que el tiempo de fermentación fue más corto en suero (Fig. 6.6.1), 7:10 h para la no filante, 9:30 h para la cepa filante. El tiempo de fermentación en suero adicionado con caseína al 1.5% (Fig. 6.6.2) fue el más largo probablemente debido a que no se logra una perfecta solubilización de la caseína en el medio, generando un sistema heterogéneo y consecuentemente difícil de fermentar por las bacterias lácticas.

Se observó que la cantidad de proteína presente tenía influencia sobre la producción de ácido láctico. En suero fermentado por ambas cepas la acidez final fue de 0.38% (Fig. 6.6.1), mientras que en suero adicionado con caseína

(Fig. 6.6.2) la acidez para la cepa filante fue de 0.32 % y de 0.45% para la no filante. En leche descremada (Fig. 6.6.3) la acidez final fue de 0.56% para la cepa filante, y de 0.58% para la no filante. Por último, la acidez en retenido de leche (Fig. 6.6.4) fue para la cepa filante y la no filante de 0.63% y 0.72% respectivamente, lo que indica que a mayor contenido de proteínas presentes en el medio hay mayor producción de ácido láctico, lo que puede deberse a una proteólisis de la caseína por bacterias lácticas lo que genera aminoácidos que estimulan el crecimiento de los microorganismos (Amiot, 1991).

Fig. 6.6.1. Cinética de fermentación en suero usando como inóculo una cepa filante y una no filante.

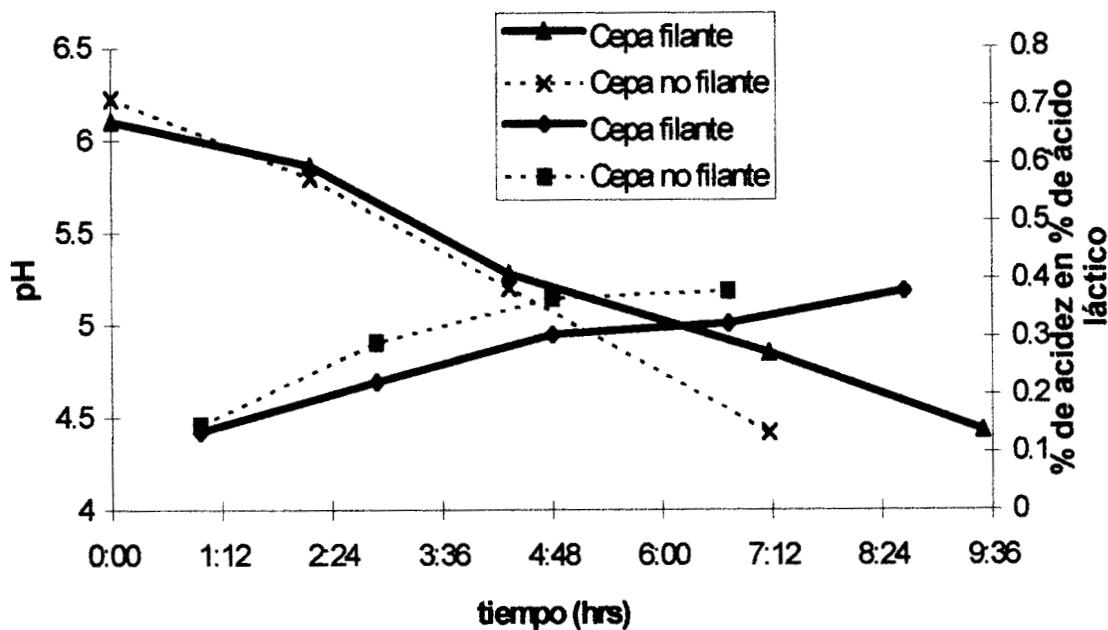


Fig. 6.6.2. Cinética de fermentación en suero adicionado con caseína en una proporción de 1.5%, usando como inóculo una cepa filante y una no filante.

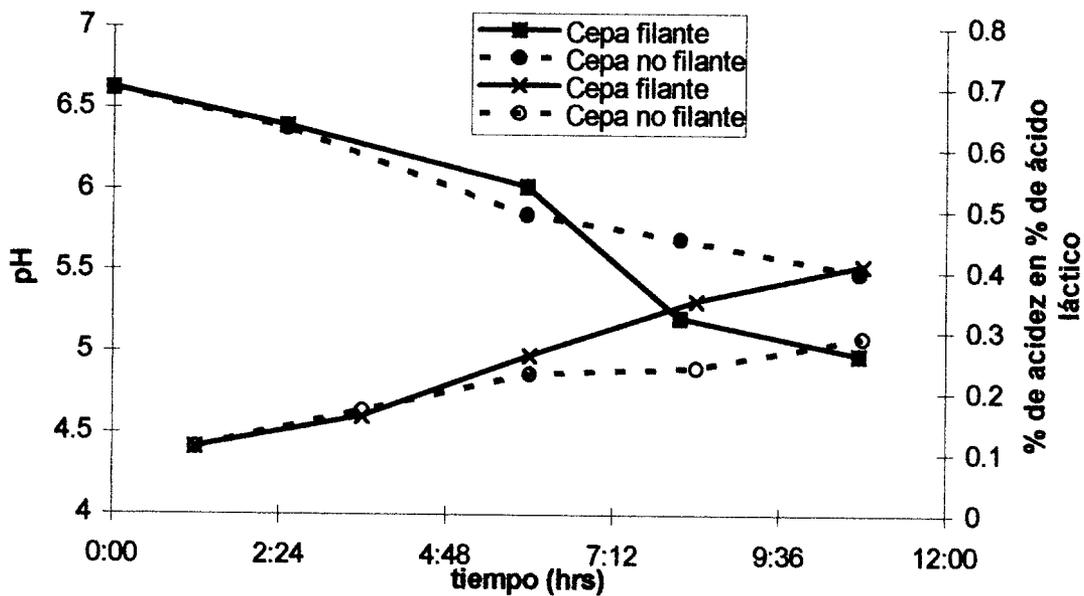


Fig. 6.6.3. Cinética de fermentación en leche descremada, usando como inóculo una cepa filante y una no filante.

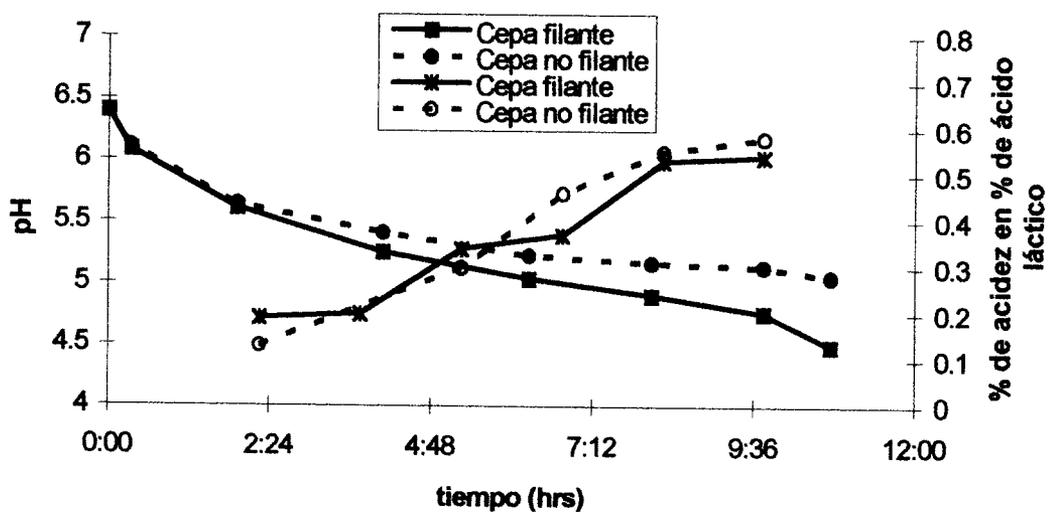
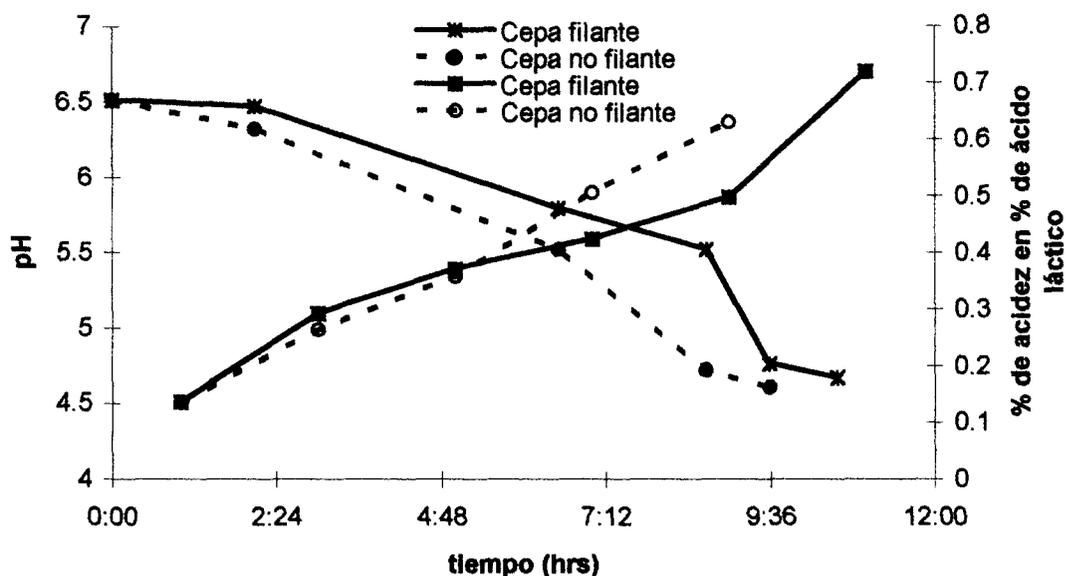


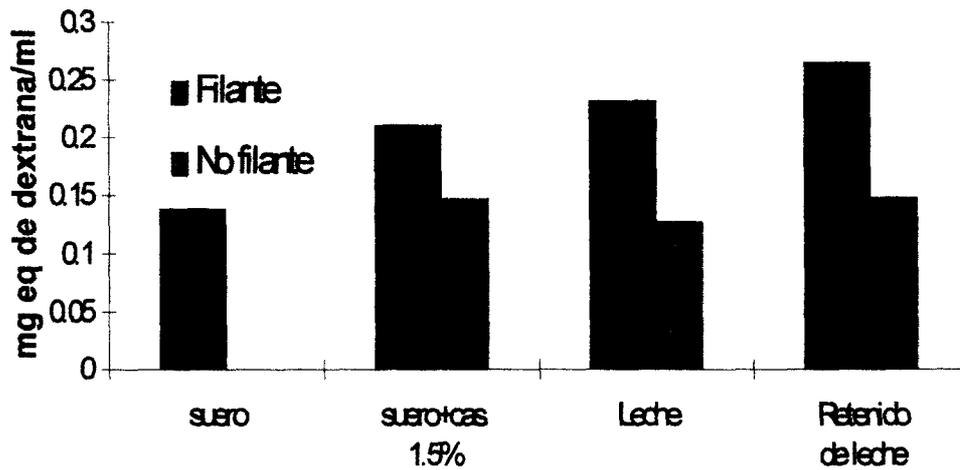
Fig. 6.6.4. Cinética de fermentación en retenido de leche por ultrafiltración, usando como inóculo una cepa filante y una no filante.



6.2. Cuantificación del exopolisacárido

Al analizar la cantidad de polímero presente en cada uno de los diferentes substratos fermentados, se puede observar (Fig.6.3.1) que la cantidad de proteína tiene influencia sobre la producción de exopolisacárido producido ($\alpha < 0.05$) y por supuesto la producción depende también del tipo de cepa, se puede suponer que ambos factores afectan sinérgicamente para aumentar la producción del mismo. Al fermentar el suero con una cepa filante se obtiene 0.13 mg eq de dextrana/ml, mientras que la misma cepa produce 0.26 mg eq de dextrana/ml en retenido de leche. Es decir, que aproximadamente se obtiene el doble de exopolisacárido al utilizar un sustrato cuyo contenido de proteína es cuatro veces mayor (Ver materiales y métodos, pp. 36)

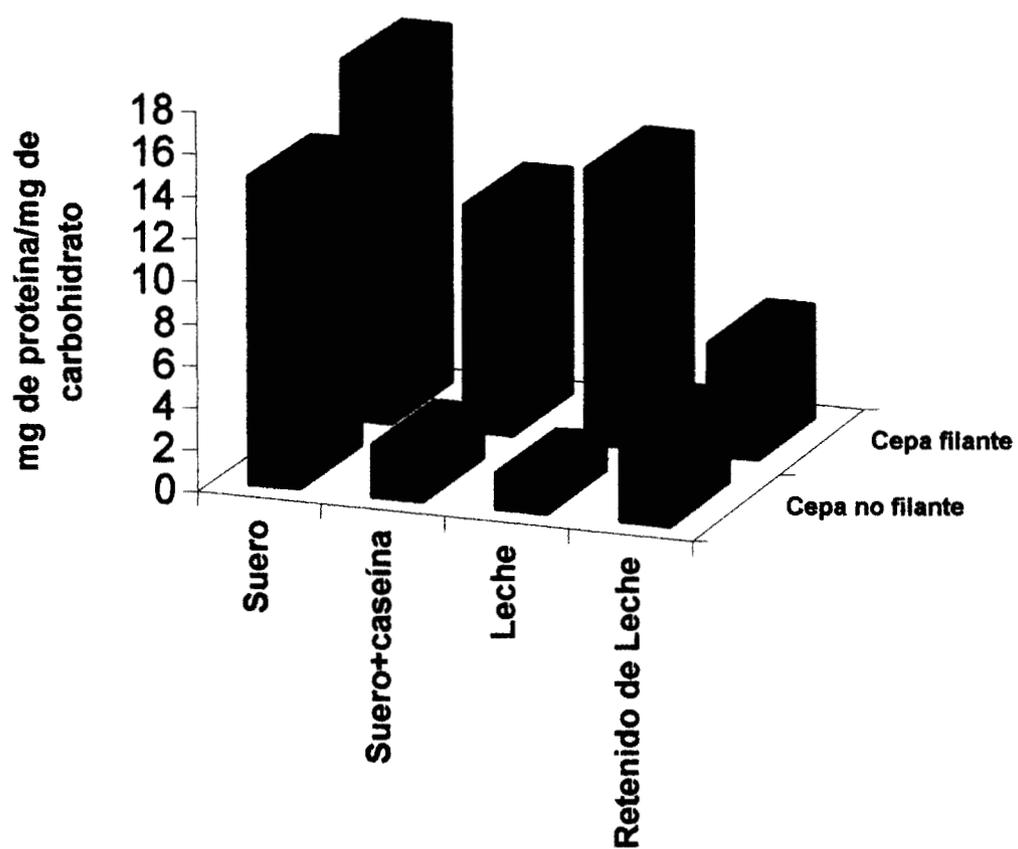
Fig. 6.6.2.1 Cuantificación del exopolisacárido producido en diferentes sustratos.



6.3. Determinación de la relación proteína-carbohidrato en extracto puro.

Después de someter el sustrato fermentado a un largo proceso de extracción para poder cuantificar la relación proteína-carbohidrato existente en este, se encontró que las características fisicoquímicas del exopolisacárido son diferentes. Es decir, la cantidad de proteína presente en el sustrato, al igual que la cepa, no tiene influencia ($\alpha > 0.05$) sobre la relación proteína-carbohidrato del extracto puro, como puede observarse en la figura 6.3.1., aunque hay una tendencia a una mayor proporción de proteína en los sustratos fermentados por una cepa filante.

Fig. 6.3.1. Determinación de la relación proteína-carbohidrato en el extracto puro.



6.5. Caracterización reológica.

En la Gráfica 6.5.1. se muestra el módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G'') de los diferentes productos de fermentación, se observa que ambos módulos son dependientes de la frecuencia angular (ω) a la cual se somete el sistema. Tanto la leche fermentada como el retenido de leche fermentado presentan un comportamiento semi-sólido, es decir, el módulo de almacenamiento es superior al módulo de pérdida ($G' > G''$) lo que se debe principalmente a que se forma una matriz proteica conformada por micelas de caseína. Este comportamiento reológico es similar al que presentan geles de agar, alginato, gelana o κ -carragenina donde también se forma una red tridimensional.

Al evaluar el efecto de la cepa sobre las características reológicas del sistema, se observa que en el caso de leche fermentada por una cepa filante se obtienen valores del módulo elástico aproximadamente 200 % mayores ($G'_{\text{leche fermentada por una cepa no filante}} \cong 3 G'_{\text{leche fermentada por una cepa filante}}$). Esta diferencia puede deberse a que el exopolisacárido producido por éste microorganismo tiene la capacidad de unirse a la matriz proteica del sistema generando una unión *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* NCFB 2772-exopolisacárido-matriz proteica, dando lugar a un mayor número de interacciones en el sistema lo que a su vez se traduce en una red tridimensional más rígida.

En retenido de leche el módulo elástico predomina. Al comparar los resultados obtenidos con los de la leche descremada fermentada, se observó

que en este último caso los componentes del módulo de almacenamiento están comprendidos dentro de 10 y 100 Pa, mientras que en retenido de leche los valores son del orden de 1000 Pa. De lo anterior se deduce que el contenido de sólidos tiene influencia sobre el módulo de almacenamiento; ésto puede deberse a que la matriz proteica que se forma es más compacta, es decir, las uniones existentes entre las micelas de caseína son mayores.

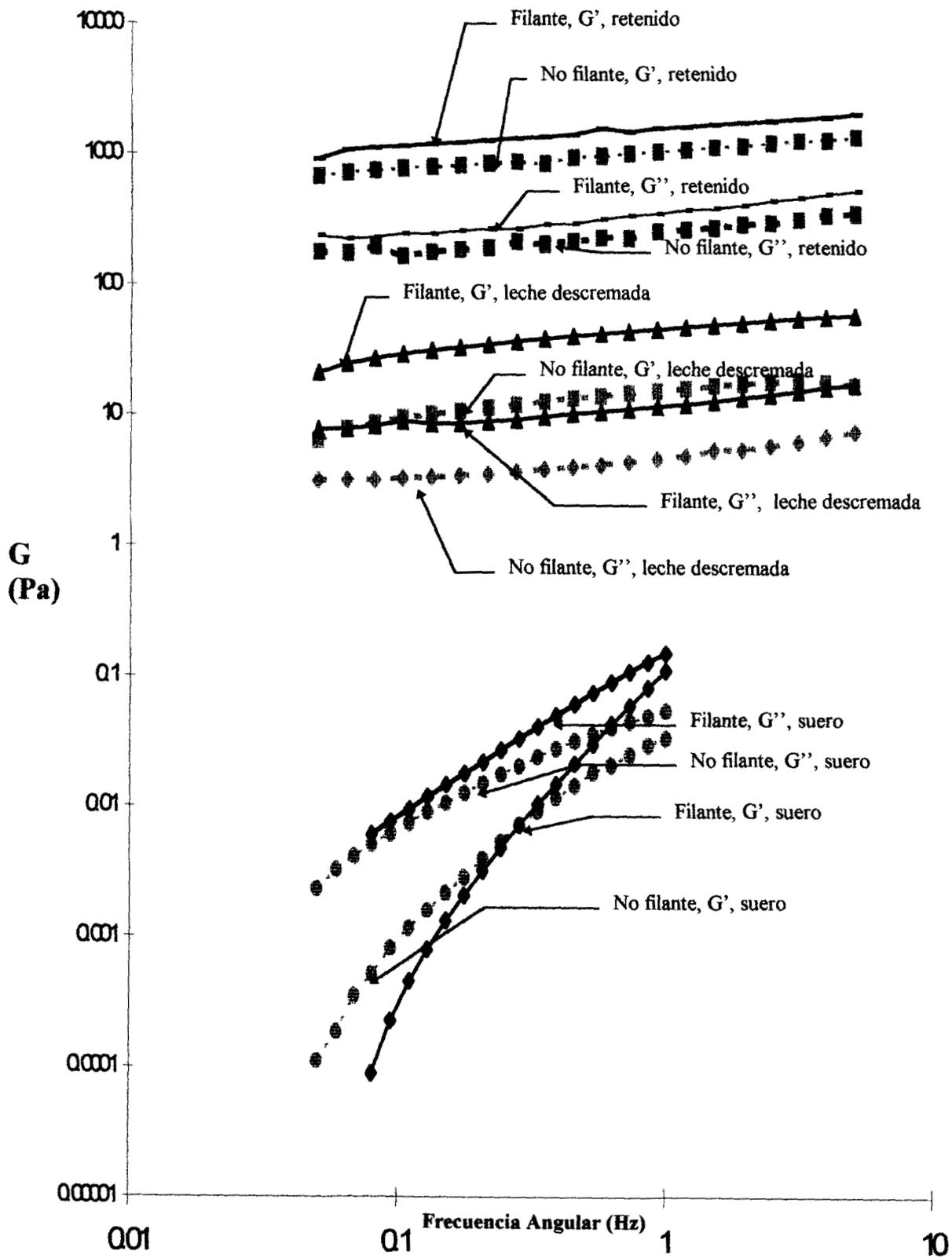
En retenido de leche fermentado la influencia de la cepa filante es significativa, sin embargo, la diferencia no es tan grande como en leche descremada fermentada. Se observa en la Gráfica 6.5.1 que la diferencia en orden de magnitud es aproximadamente 50 % mayor; ($G'_{\text{retenido de leche fermentado por una cepa no filante}} \cong 0.3 G'_{\text{retenido de leche fermentada por una cepa filante}}$).

En suero fermentado se observó que el producto lácteo es predominantemente viscoso ($G'' > G'$), esto es evidencia de que las micelas de caseína son responsables de la firmeza del sistema, lo cual concuerda con investigaciones realizadas por Arshad *et. al.* (1993), Rohm y Schmid (1993) y Hess *et. al.* (1997). En este tipo de sistema es recomendable utilizar la viscosidad compleja (η^*) para caracterizar las propiedades reológicas (Gráfica 6.5.2.). Como se observó, el suero fermentado por una cepa filante presenta una viscosidad independiente de la frecuencia, es decir, se comporta como un fluido newtoniano. Por otro lado, la cepa filante tiene un comportamiento ligeramente reoespesante lo que puede atribuirse a un reordenamiento del exopolisacárido presente en este tipo de substrato fermentado.

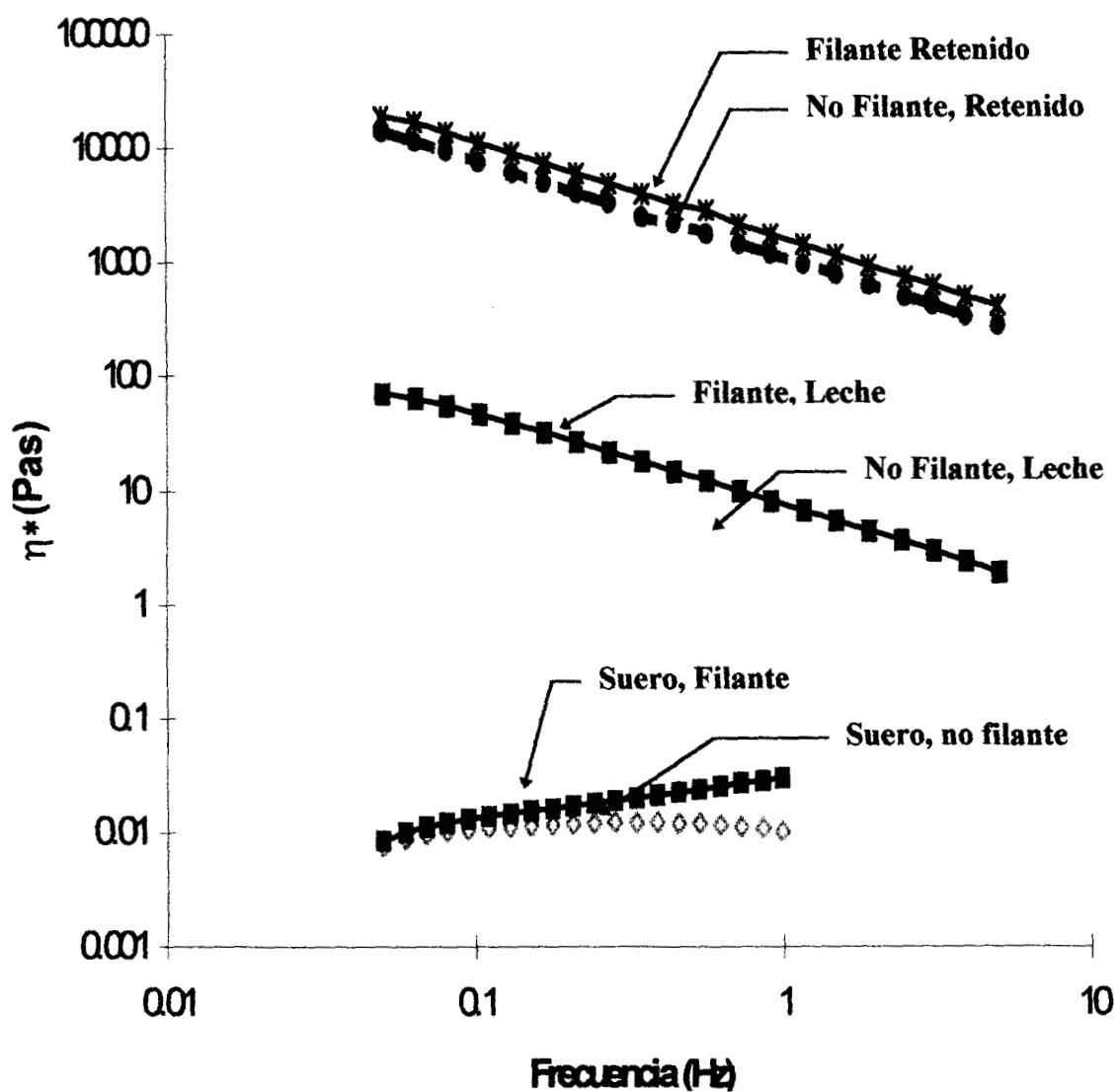
Si se compara la viscosidad compleja entre una cepa filante y una no filante al utilizar como substrato tanto leche descremada como retenido de leche, se observa claramente la pérdida de estabilidad en la estructura del gel; ésto es una característica clásica de productos lácteos fermentados como el yogurt. Por otro lado, se constata que la cepa filante presenta una viscosidad compleja (η^*) mayor a la de la cepa no filante en ambos substratos fermentados, siendo evidencia de que ambos parámetros analizados, contenido proteico así como cultivo iniciador, tienen influencia sobre la viscosidad compleja del sistema.

Como se sabe la tangente delta ($\tan \delta$) representa la relación entre la energía disipada y la energía almacenada elásticamente, y para este tipo de productos puede interpretarse como una medida cualitativa de la proporción de las interacciones presentes entre las micelas de caseína y los demás componentes del sistema en un tiempo de relajación dado (Rohm y Kovac, 1994). Este parámetro está definido como la relación G''/G' , por lo que también se usa como parámetro para indicar la firmeza del gel. Van Marle y Zoon (1995) reportaron que la $\tan \delta$ para muestras fluidas como leche es de aproximadamente 1, y que esta $\tan \delta$ disminuye durante una fermentación láctica, por lo que la definieron como un parámetro que podía indicar los cambios en la naturaleza de las interacciones y la importancia de los diferentes tipos de unión. Otros autores como Van Vliet *et. al.* (1991) y Roefs *et. al.* (1990) establecieron que la relación entre la susceptibilidad de sinéresis y $\tan \delta$ era proporcional, es importante señalar que ningún otro módulo dinámico está relacionado con esta característica. Extrapolando estos criterios podemos

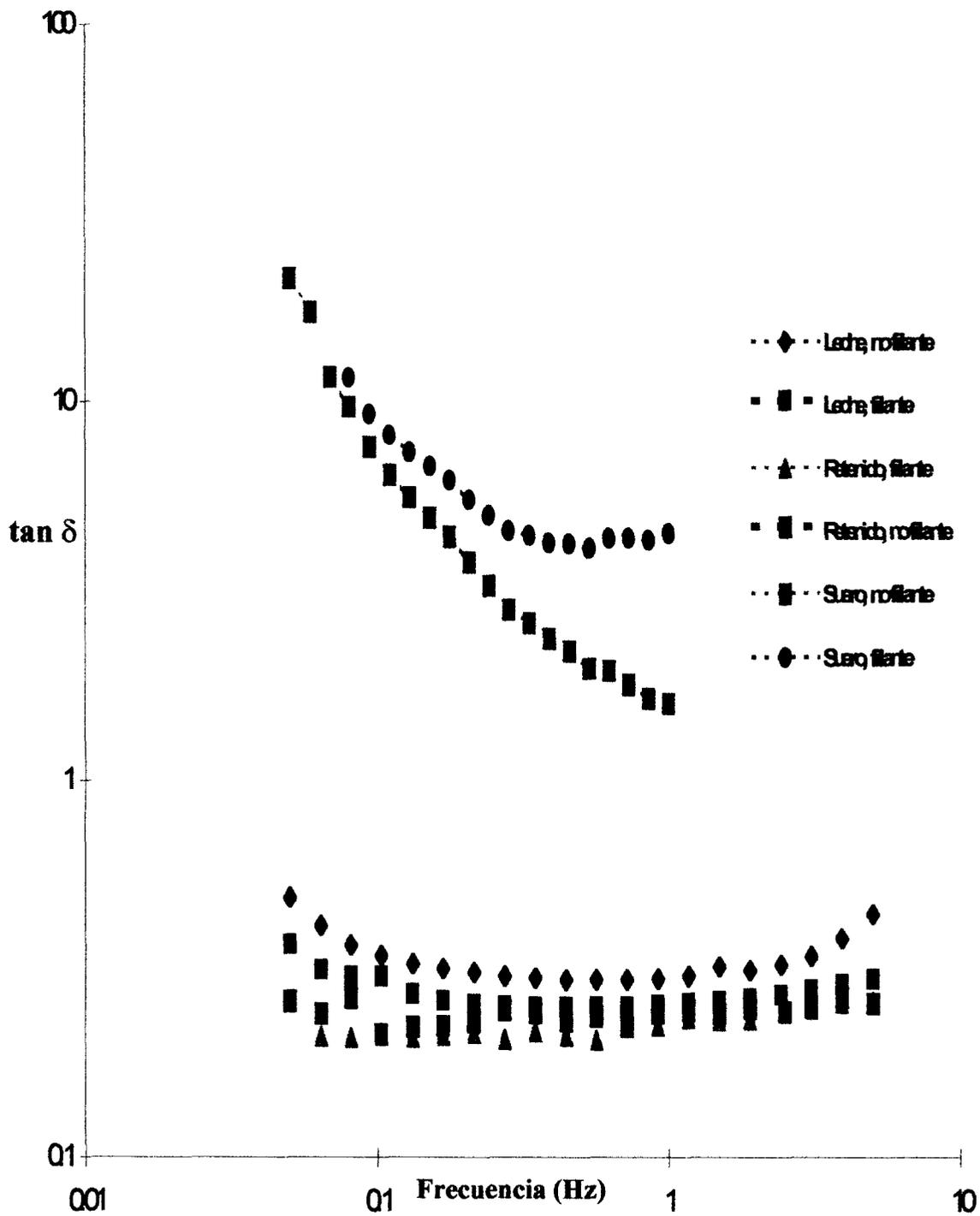
definir al suero fermentado tanto con la cepa filante como con la no filante como sistemas sin muchas uniones ($G'' > G'$ - $\tan \delta > 1$), muy parecidos a sistemas fluidos, como la leche. Como se aprecia en la Gráfica 6.5.3. a mayor contenido de proteína en el sustrato inicial y el uso de una cepa filante durante la fermentación láctica se refleja en valores de $\tan \delta$ menores, es decir, geles más firmes y con menos susceptibilidad de sinéresis.



Gráfica 6.5.1. Comparación del Módulo Elástico (G') y Módulo Viscoso (G'') en retenido de leche, leche descremada y suero fermentados por una cepa filante (*Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* NCFB 2772) y una no filante (*Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* NCFB 1489).



Gráfica 6.5.2. Comparación de la viscosidad compleja (η^*) en retenido de leche, leche descremada y suero fermentados por una cepa filante y una no filante.



Gráfica 6.5.3. Comparación de la $\tan \delta$ en retenido de leche, leche descremada y suero fermentados por una cepa filante y una no filante.

6.6. Análisis de Textura

6.6.1. Perfil de Textura en producto fermentado tipo firme

a) **Fracturabilidad:** se define como la fuerza bajo la cual un material se fractura (Szczesniak *et. al.*,1963), los únicos geles que presentaron esa característica fueron los elaborados a partir de retenido de leche. Se observó (Fig. 6.6.1.1.) que había una diferencia significativa ($\alpha < 0.0015$) entre el gel elaborado a partir de una cepa filante y el elaborado a partir de una cepa no filante, siendo necesario aplicar una mayor fuerza para fracturar el primero, ésto puede deberse a que las interacciones que existen entre las micelas de proteína se rompen más fácilmente que las interacciones proteína-exopolisacárido, como se establece en el estudio realizado por Teggatz y Morris, (1990). Por otro lado, indica que puede haber un mayor número de interacciones con los demás constituyentes del sistema en los productos elaborados por una cepa filante.

Figura 6.6.1.1. Comparación del parámetro fracturabilidad de un gel elaborado en retenido de leche por ultrafiltración usando como inóculo una cepa filante y una no filante.



b) **Dureza:** Se define como la fuerza necesaria para obtener una determinada deformación (Szczesniak, *et. al.*, 1963) . Esta se divide en dos componentes (Ver Fig. 3.1.2.2.1.):

Dureza 1.- La fuerza pico durante el primer ciclo de compresión (primera mordida).

Dureza 2.- La fuerza pico durante el segundo ciclo de compresión (segunda mordida).

Figura 6.6.1.2. Comparación del parámetro dureza 1, entre la cepa filante y la no filante fermentada en leche descremada y retenido de leche.

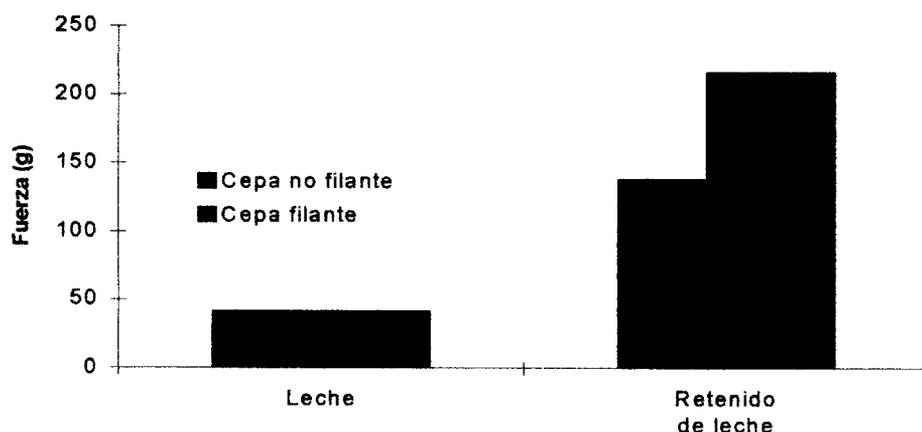
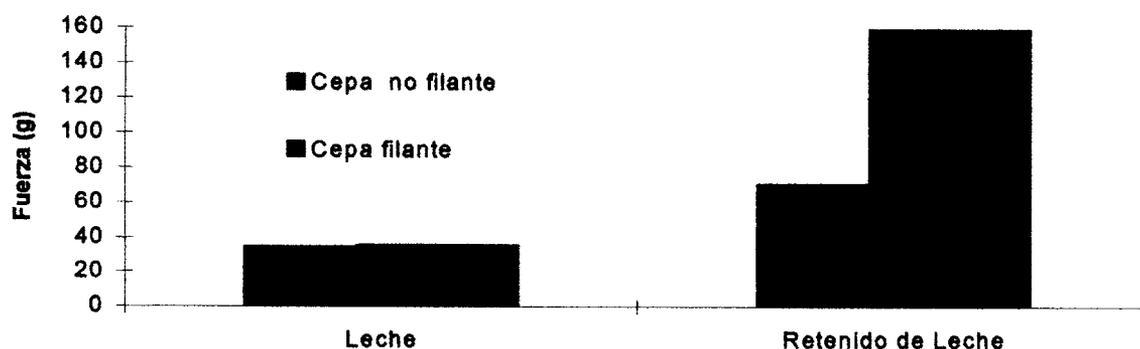


Figura 6.6.1.3. Comparación del parámetro dureza 2, entre la cepa filante y la no filante fermentada en leche y retenido de leche por ultrafiltración.

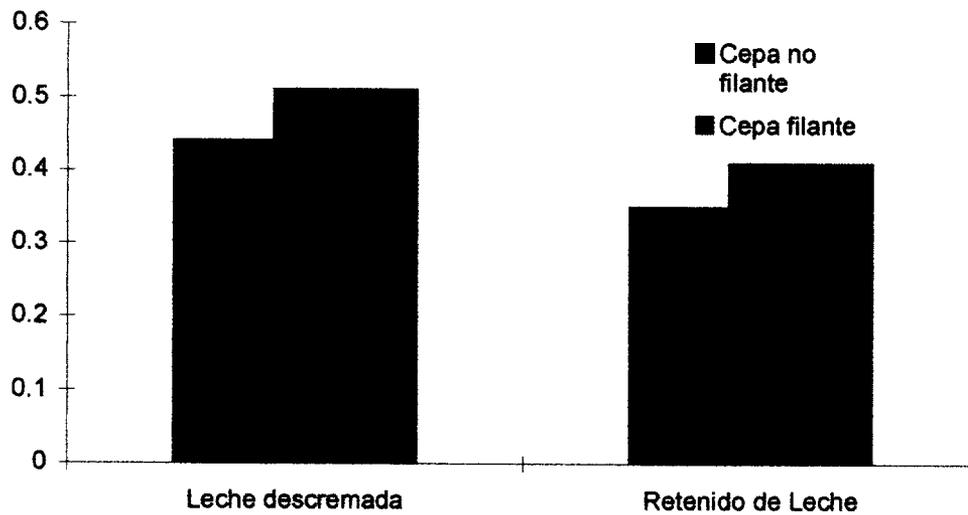


Tanto para la dureza 1 como para la dureza 2, el substrato, la cepa, y la interacción de ambos tienen efecto sobre este parámetro con una $\alpha < 0.0009$ (Fig. 6.6.1.2 y 6.6.1.3). El gel presenta mayor dureza durante la simulación de la primera mordida que durante la segunda, esto se debe a que existe un rompimiento en la estructura tridimensional del sistema, lo que concuerda con estudios realizados previamente (Van Marle *et. al.*, 1995).

Si se comparan los geles elaborados a partir de retenido de leche con los de leche descremada se observa (Fig. 6.6.1.2.) en gel más rígido en el primer caso, ya que hay evidencia de que se forma una matriz más densa de pequeñas cadenas y agregados de caseína (Prentice, 1992). Por otro lado, al utilizar una cepa filante se obtiene un gel más rígido, lo que hace suponer que las interacciones polímero-proteína se ven favorecidas (Cerning *et. al.*, 1986; Teggatz y Morris, 1990; Schellhaass y Morris, 1985), obteniéndose un producto más resistente a los daños mecánicos, evitando así el desuerado durante su manejo.

c) **Cohesividad:** esta definida como la fuerza de las uniones internas que conforman un producto, y describen la extensión a la cuál un material puede deformarse antes de romperse (Szczeniak, *et. al.*, 1963). Se puede observar que valores de cohesividad en substratos fermentados por cepas filantes son mayores, como se aprecia en la Figura 6.6.1.4.

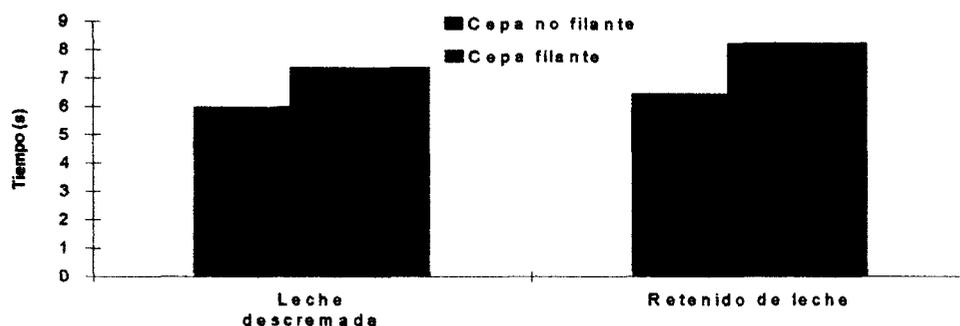
Fig. 6.6.1.4. Comparación del parámetro cohesividad, entre la cepa filante y la no filante fermentada en leche descremada y retenido de leche por ultrafiltración.



Tanto el substrato ($\alpha < 0.0001$) como la cepa ($\alpha < 0.0017$) tienen efecto sobre la cohesividad del sistema, sin embargo, la interacción de ambos no tiene influencia sobre este parámetro ($\alpha < 0.7213$).

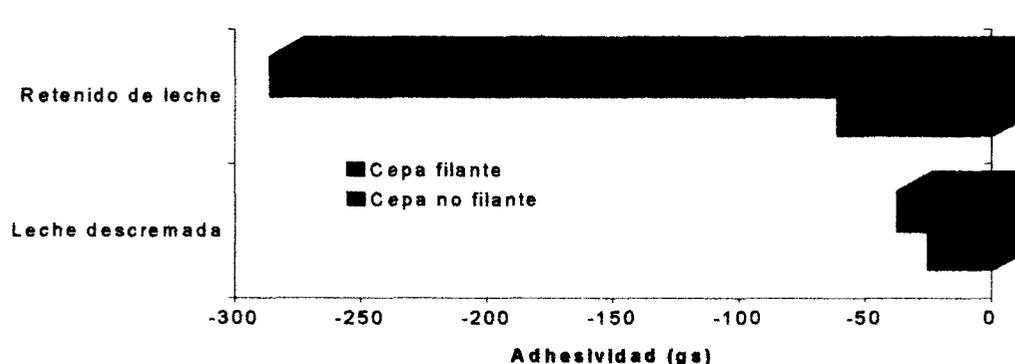
d) **Elasticidad:** se define como la capacidad que tiene un material para recuperar su condición original (Szczesniak, *et. al.*, 1963). A partir de los resultados estadísticos se establece que ni la cepa, ni el substrato, ni la interacción de ambos tienen influencia significativa sobre este parámetro, como se observa en la Figura 6.6.1.5.

Figura 6.6.1.5. Comparación del parámetro elasticidad, entre la cepa filante y la no filante fermentada en leche descremada y retenido de leche por ultrafiltración.



e) **Adhesividad:** este puede ser el mejor parámetro para determinar el carácter filante de las bacterias lácticas, ya que puede definirse como la capacidad de hacer “hebra”; y se observó (Fig. 6.6.1.6) que al usar el retenido de leche como sustrato, la diferencia entre cepa filante y cepa no filante es cuatro veces mayor, existiendo también diferencia significativa en leche fermentada.

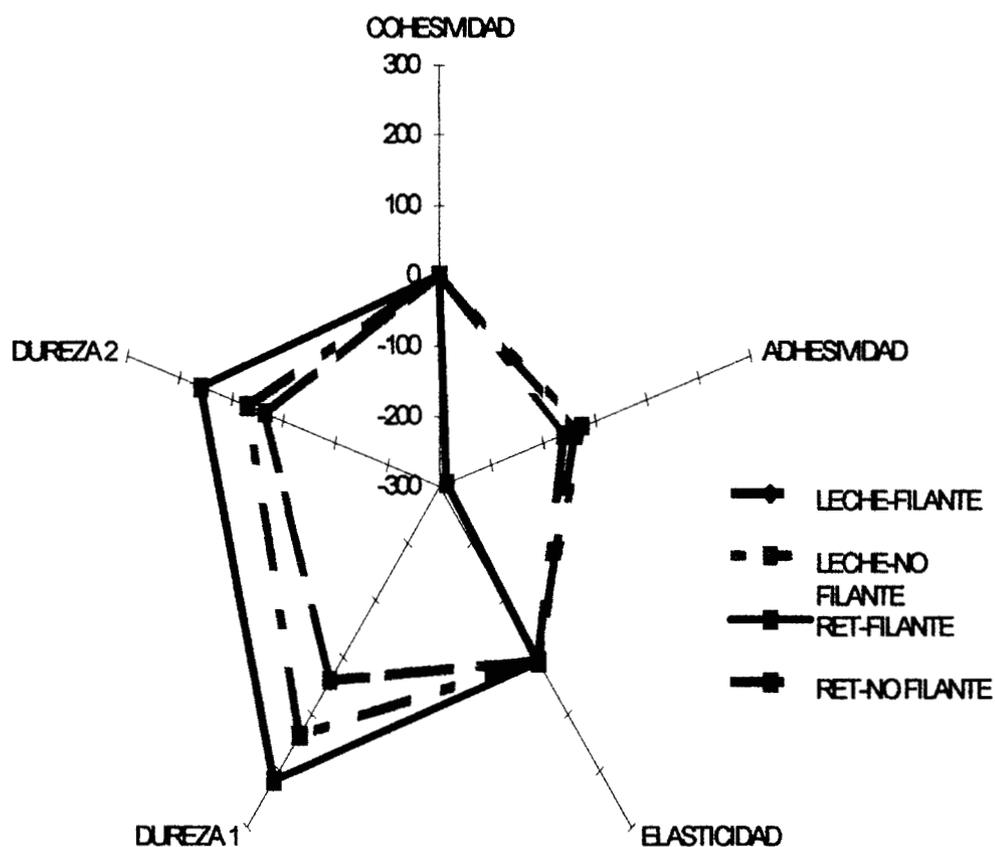
Fig. 6.6.1.6. Comparación del parámetro adhesividad, entre la cepa filante y la no filante fermentada en leche descremada y retenido de leche por ultrafiltración.



Por lo anterior, puede decirse que tanto la cepa como el substrato fermentado, así como la interacción de ambos, tienen influencia ($\alpha < 0.008$) sobre este parámetro.

Englobando estas características se procedió a realizar un perfil de textura, el cual se muestra en la Figura 6.6.1.7.

Fig. 6.6.1.7. Comparación de las variables respuestas obtenidas mediante el análisis de perfil de textura en geles fermentados por una cepa filante y una no filante en leche descremada y retenido de leche por ultrafiltración.



6.6.2. Perfil de textura en productos fermentados tipo batido

Al llevar a cabo el perfil de textura en este tipo de substratos se observó que hubo un decremento en las propiedades texturales si se comparan con productos tipo firmes, debido al esfuerzo mecánico al que se sometieron por el batido previo a la prueba.

a) Dureza. Al realizar la prueba y someter los datos al análisis estadístico se observó (Fig. 6.6.2.1.y Fig. 6.6.2.2.) que tanto la cepa como el substrato, así como la interacción de ambas, tiene influencia sobre éste parámetro ($\alpha < 0.05$). Si se compara con geles tipo firmes, se observa (6.6.1.2 y 6.6.1.3.) que el orden de magnitud es significativamente menor ($\alpha < 0.05$), esto se debe al rompimiento de parte de la estructura del sistema al realizar el batido.

Figura 6.6.2.1. Comparación del parámetro dureza 1, entre la cepa filante y la no filante fermentadas en leche descremada y retenido de leche.

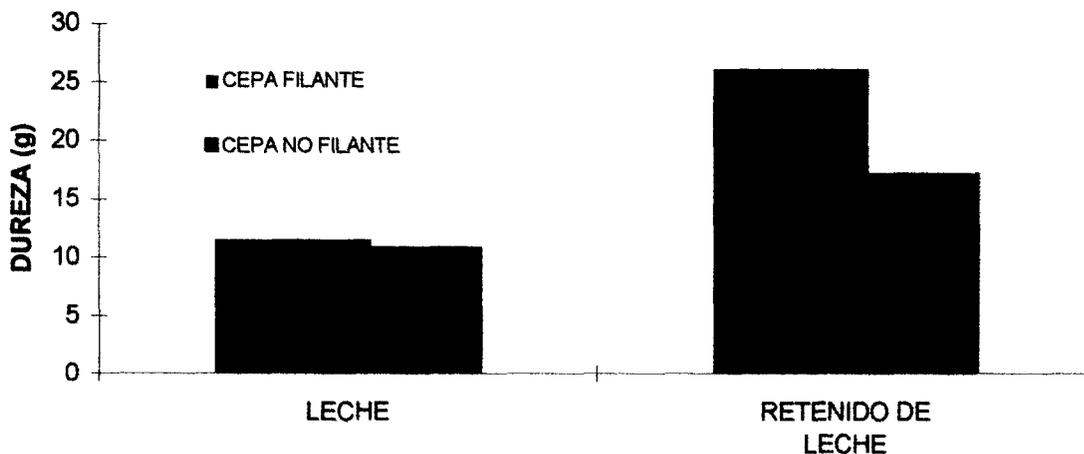
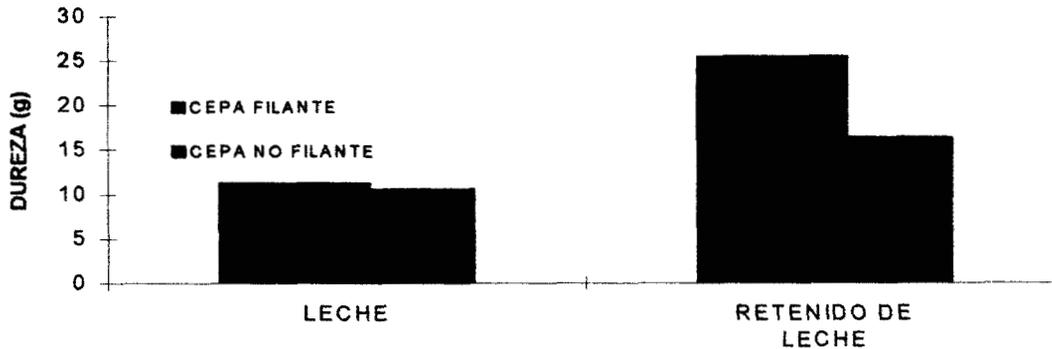
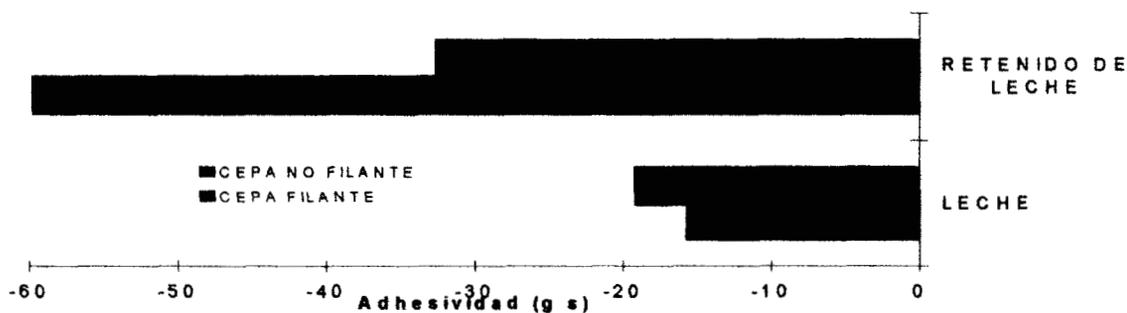


Figura 6.6.2.2. Comparación del parámetro dureza 2, entre la cepa filante y la no filante fermentadas en leche descremada y retenido de leche.



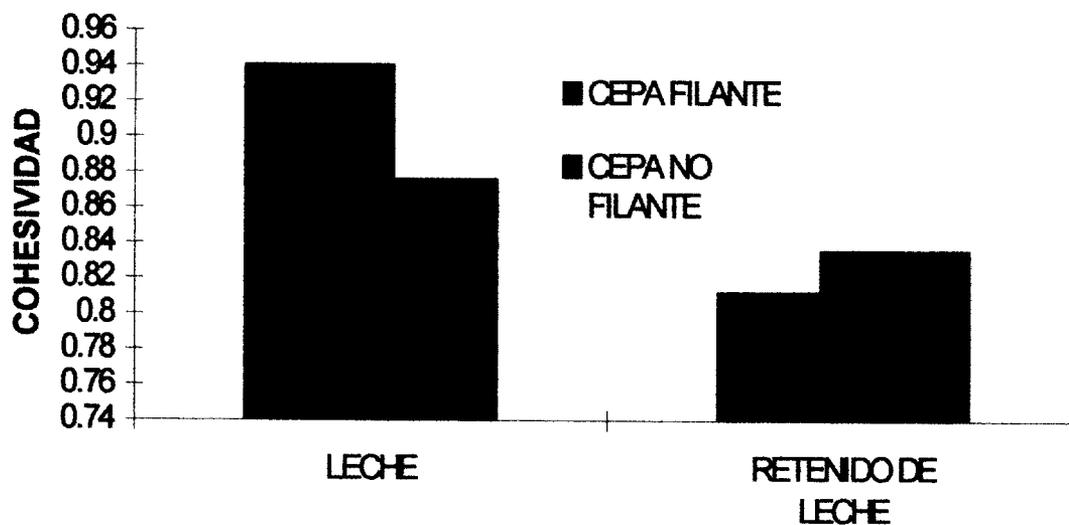
b) Adhesividad. Los productos batidos son, por lo menos, cinco veces menos adhesivos que los productos firmes. Se observó (Figura 6.6.2.3) que los substratos fermentados en retenido de leche presentan un valor más elevado en ésta propiedad, siendo la bacteria filante la que contribuye en mayor medida a que ésta característica se pueda manifestar ($\alpha < 0.05$). Sin embargo, en leche descremada la cepa no filante es la que es más adhesiva, siendo diferente este resultado a los encontrados en productos fermentados tipo firme ($\alpha < 0.05$); lo que implica que de alguna manera, esta característica se pierde al someter el gel a un esfuerzo.

Figura 6.6.2.3. Comparación del parámetro adhesividad, entre la cepa filante y la no filante fermentadas en leche descremada y retenido de leche.



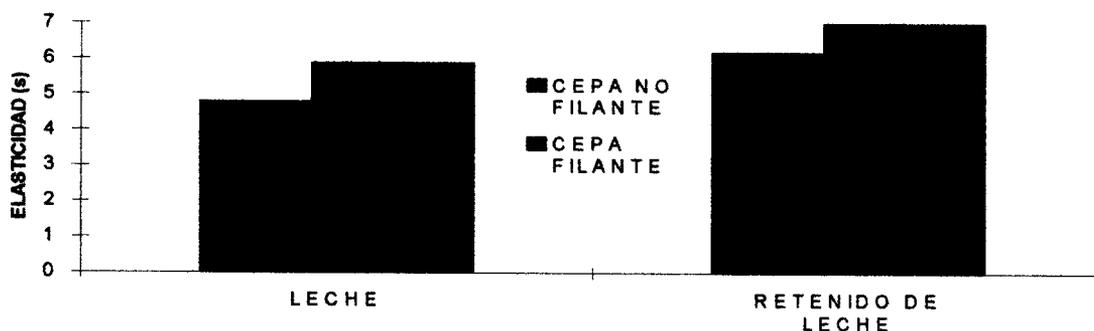
c)Cohesividad. Se observó (Fig. 6.6.2.4.) que solo el substrato es el que tiene influencia ($\alpha > 0.05$) sobre ésta parámetro, siendo el orden de magnitud mayor en productos de fermentación que usaron a la leche descremada como substrato inicial. A pesar de que a simple vista se aprecia una diferencia en cuanto a la cepa utilizada, ésta no es significativa debido al alto valor de desviación estandard que presentan los datos obtenidos.

Figura 6.6.2.4. Comparación del parámetro cohesividad, entre la cepa filante y la no filante fermentadas en leche descremada y retenido de leche.



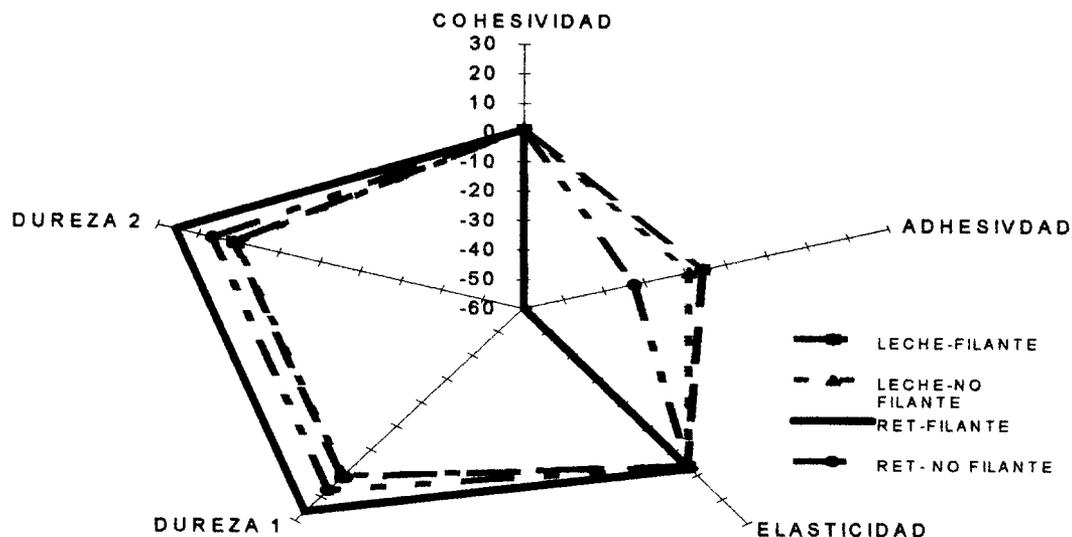
d)Elasticidad. Por otro lado se evaluó la elasticidad en este tipo de productos, observándose (Fig. 6.6.2.5) un comportamiento similar a los productos firmes, es decir, el tiempo para recuperar su condición original no es significativamente diferente.

Figura 6.6.2.5. Comparación del parámetro elasticidad, entre la cepa filante y la no filante fermentadas en leche descremada y retenido de leche.



Posteriormente se englobaron éstos parámetros y se procedió a realizar un perfil de textura, el cuál se muestra en la Figura 6.6.2.6.

Figura 6.6.2.6. Comparación de las variables respuestas obtenidas mediante el análisis de perfil de textura en geles fermentados por una cepa filante y una no filante en leche descremada y retenido de leche por ultrafiltración.



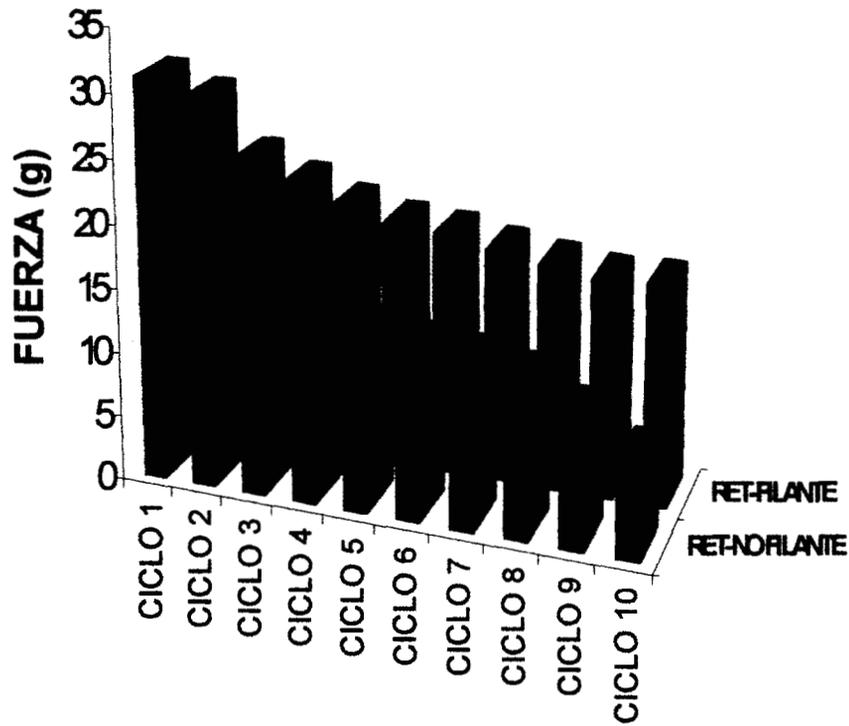
6.6.3. Pruebas de ciclo

En todos los casos, lo que se observó fue que los geles que se elaboraron a partir de leche descremada tienen una estructura más débil, lo que, a la hora de llevar a cabo ésta prueba, se tradujo en mucha interferencia en las mediciones, por lo que no se pudieron cuantificar las variables respuesta, motivo por el cual en esta sección solo se mencionan las pruebas elaboradas en retenido de leche fermentado tipo firme.

La Figura 6.6.2.1. muestra una gráfica que representa el comportamiento de la dureza en geles cuyo substrato inicial fue retenido de leche, observándose que entre mayor contenido de proteína presente, se genera un gel más resistente a un esfuerzo mecánico aplicado; ésta característica se incrementa al utilizar una cepa filante durante la fermentación. Debido a las características que aporta esta última, se observa que se genera una estructura más rígida y más difícil de romper.

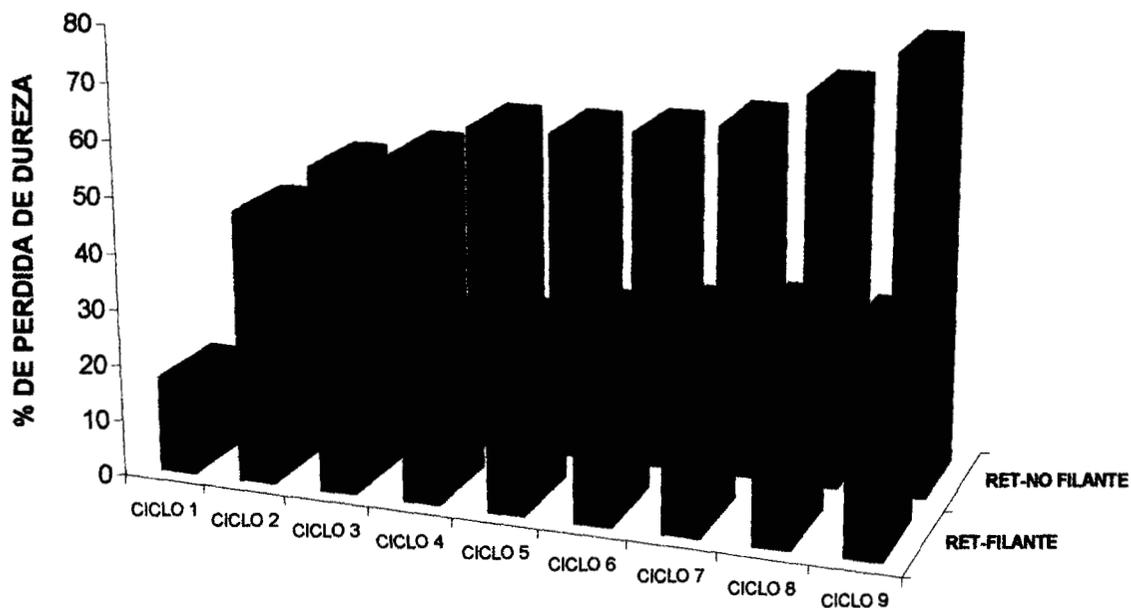
Al graficar el porcentaje de pérdida de dureza durante cada uno de los ciclos se ve que la cepa no filante pierde el 76.57% de ésta, a medida que transcurre el experimento, mientras que los productos de fermentación elaborados a partir de una cepa filante solo pierden el 38.11%.

Figura 6.6.2.1. Comparación del cambio de fuerza entre una cepa filante y una no filante fermentada en retenido de leche al aplicarle un esfuerzo cíclico



Estos resultados concuerdan con investigaciones que sugieren que el polisacárido generado por estas cepas mucógenas se unen a las proteínas, en particular las caseínas (Cerning *et. al.*, (1986); Cerning *et. al.*, (1990); García-Garibay y Marshall, (1991); Tegatz y Morris, (1990)), y probablemente la forma de entrelazarse en la red tridimensional proteica hace que ésta sea mucho más rígida y con mayores uniones internas lo que la hacen más difícil de romper, dando como resultado geles con mayor dureza.

Figura 6.6.2.2. Comparación del porcentaje de pérdida de dureza entre una cepa filante y una no filante fermentadas en retenido de leche al aplicarle un esfuerzo cíclico



En las Figuras 6.6.2.3 y 6.6.2.4. se presentan las gráficas del comportamiento de la fuerza adhesiva en las fermentaciones llevadas a cabo en retenido de leche; lo que se puede notar es que no hay mucha diferencia entre ellas, sin embargo, la cepa no filante es la que presenta mayor fuerza adhesiva durante los primeros ciclos. La diferencia es mínima después del sexto ciclo, sin embargo, sí hay diferencia en la adhesividad, siendo mayor ésta característica en la cepa no filante.

Figura 6.6.2.3. Comparación de fuerza adhesiva entre una cepa filante y una no filante fermentadas en retenido de leche cuando se le aplica un esfuerzo cíclico

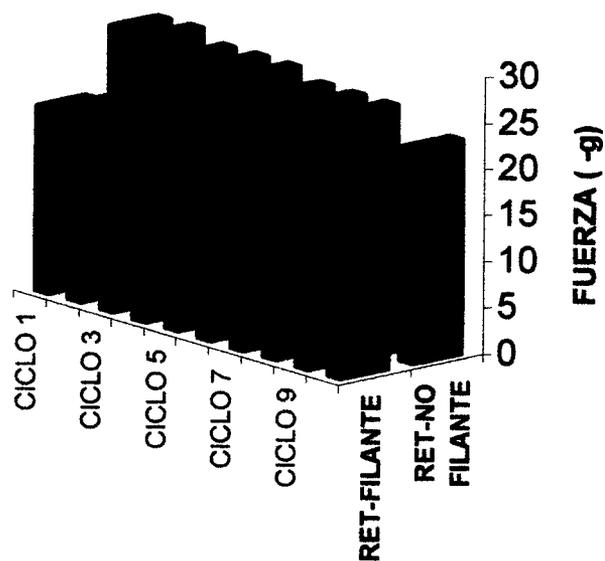
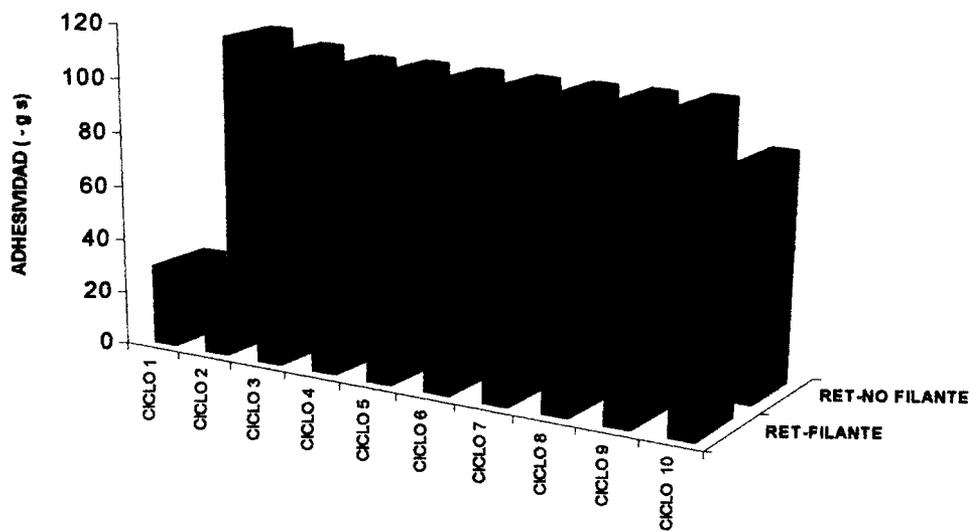
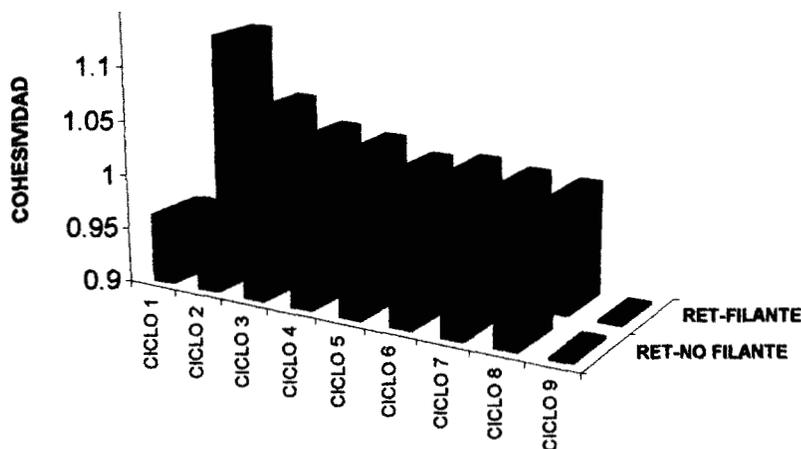


Figura 6.6.2.4. Comparación de la adhesividad entre la cepa filante y la no filante fermentadas en retenido de leche al aplicarle un esfuerzo cíclico.



En la Figura 6.6.2.5. se presenta el comportamiento de la cohesividad, o sea la fuerza de interacción entre los enlaces internos que forman el cuerpo del producto, observándose que esta característica es mayor en la cepa filante que en la no filante, siendo esto evidencia de que la cepa filante tiene una matriz muy densa y rígida la cual es más difícil de romper.

6.6.2.5. Comparación del comportamiento de la cohesividad entre la cepa filante y la no filante fermentadas en retenido de leche



Todo lo anterior es la prueba de que en el mismo substrato inicial (retenido de leche) y el tipo de cepa utilizada tienen efecto directo sobre las características texturales del producto.

6.7. Microscopía electrónica de barrido.

Mediante el empleo de microscopía electrónica de barrido se pudo apreciar que tanto la cepa utilizada como el substrato tienen influencia en la microestructura de los diferentes productos de fermentación. Estas diferencias pueden explicar propiedades reológicas y de textura de los diversos sistemas utilizados.

Se observó que el suero fermentado, por ambas cepas (Fig. 6.7.1), presenta una red tridimensional muy débil y con muchas cavidades (espacios intersticiales), estos resultados son similares a lo que encontraron Kalab y Harwalkar (1972). Esto último, se traduce en pocas interacciones entre los compuestos presentes en el sistema, lo cual puede explicar el carácter predominantemente viscoso ($G'' > G'$) que presentan estos productos (Gráfica 6.5.1). Se observó que el tamaño de *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* NCFB 2772 (cepa filante) es aproximadamente menor a 3 μm , mientras que *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* NCFB 1489 (cepa no filante) (Fig. 6.7.1.B) es aproximadamente mayor a 6.8 μm en promedio. Por otro lado, se observó, que ambas cepas son capaces de producir exopolisacárido; sin embargo, cualitativamente la cantidad de goma producida por la cepa filante es mayor que la producida por la cepa no filante, lo cual también se observó al cuantificar el exopolisacárido presente en ambos sistemas (Fig. 6.6.2.1.). Esta última característica puede explicar el comportamiento reoespesante que se presenta al realizar las pruebas dinámicas correspondientes (Gráfica 6.5.2.).

Al analizar el suero fermentado adicionado con caseína al 1.5% se observó (Fig. 6.7.2) la producción de exopolisacárido por ambas cepas, sin embargo, la cepa filante (Fig. 6.7.2.A.) sintetizó mayor cantidad de éste lo que concuerda con los resultados presentados en la Figura 6.6.2.1. Cabe señalar que los productos analizados fueron heterogéneos debido a que no se logró una perfecta solubilización de la caseína en el medio, lo cual se refleja en la ausencia de una red tridimensional ordenada y en la presencia de lactobacilos solo en determinadas zonas de la muestra, razón por la cual no fué posible llevar a cabo las mediciones reológicas y texturales de los sistemas.

La leche descremada fermentada mostró estar constituida por una matriz proteica tridimensional formada por micelas de caseína conectadas entre sí (Fig. 6.7.3.), información que concuerda con estudios previos hechos por Kalab, (1979 y 1993) y Hassan *et. al.* (1995). La estructura de éstos productos de fermentación da como resultado la formación de geles semisólidos ($G' > G''$), es decir, sistemas donde el módulo de almacenamiento, es superior al módulo de pérdida (Gráfica 6.5.1.).

Al estudiar el efecto de la cepa sobre la microestructura de los productos de fermentación elaborados a partir de leche, se observó que el exopolisacárido producido tiene la capacidad de unir a los lactobacilos con la matriz proteica del sistema. Estos resultados confirman lo expuesto por Hess *et al* (1997); Schellhaass y Morris, (1985); Tegatz y Morris, (1990) y Kalab, (1993). Mediante las micrografías (Fig. 6.7.3.), se apreció que la cepa filante (Fig. 6.7.3.A.) tiene la capacidad de producir más exopolisacárido que la cepa no filante (Fig. 6.7.3.B.), lo que confirmó los resultados obtenidos en la Gráfica

6.6.2.1, donde se muestra que la cantidad de exopolisacárido presente en la muestra expresado en mg eq de dextrana/ml, es aproximadamente el doble que en la leche descremada fermentada por una cepa filante. Como se estableció anteriormente, la composición química (relación proteína-carbohidrato) de la goma también difiere (Fig. 6.3.1), lo que puede reflejarse en diferente tipo y cantidad de interacciones presentes entre el exopolisacárido generado y el lactobacilo, con la matriz proteica de sistema (Fig. 6.7.3). Se observó (Fig. 6.7.3.A.) que la goma producida por la cepa filante tiene además la característica de unir a otras cepas entre sí con la matriz proteica del sistema. Por otro lado, al medir los lactobacilos presentes en ambos sistemas se observó que la cepa filante (Fig. 6.7.3.A.) midió aproximadamente $7\mu\text{m}$ en promedio mientras que la cepa no filante (Fig. 6.7.3.B.) midió aproximadamente $6\mu\text{m}$ en promedio.

Con base en lo anterior podemos establecer que las diferencias entre la composición y la cantidad de exopolisacárido generado; así como la interacción de éste con la red tridimensional de la leche descremada fermentada (Fig. 6.7.3.), pueden explicar las diferencias entre las propiedades reológicas y texturales del sistema, es decir, el gel elaborado a partir de una cepa filante presenta un componente elástico (G') aproximadamente 3 veces mayor que el que se obtuvo al analizar el gel elaborado por una cepa no filante dentro del rango de medición establecido (Fig. 6.5.1.). Por otro lado, se observó que éstas diferencias en la microestructura del producto elaborado por una cepa filante generan un gel más rígido y adhesivo (Fig. 6.6.1.2 y 6.6.1.6).

Por otra parte, en el retenido de leche fermentado se observó una malla tridimensional mucho más compacta que la que se forma en leche descremada (Fig. 6.7.3. y 6.7.4.), lo que concuerda con estudios realizados por Mistry y Hassan, (1992); Kalab y Harwalkar (1972 y 1974). Estas diferencias en la microestructura del sistema pueden explicar la diferencia en orden de magnitud del módulo elástico (G') al compararla con leche fermentada dentro del rango de medición, ya que para productos elaborados a partir de leche los valores oscilaron entre de 10 y 100 Pa y en retenido de leche fueron de aproximadamente 1000 Pa (Fig. 6.5.1.). Por otro lado, al comparar las diferencias en orden de magnitud en los parámetros dureza y adhesividad de los productos elaborados a partir de leche y los elaborados a partir de retenido de leche, se observa que son significativamente mayores en el segundo sustrato fermentado (Fig. 6.6.1.2.; Fig. 6.6.1.3. y Fig. 6.6.1.6.).

En retenido de leche fermentado también se observó (Fig. 6.7.4) una interacción de la goma producida, con los lactobacilos y con la matriz proteica del sistema. Al evaluar la influencia de la cepa sobre las características reológicas y texturales puede observarse (Fig. 6.7.4) una mayor producción de exopolisacárido presente en el sustrato fermentado por una cepa filante (Fig. 6.7.4.B.) Con base en la relación proteína-carbohidrato presentada en la Figura 6.3.1, se observan diferencias significativas entre la goma producida por ambas cepas lo que también puede reflejarse en diferente tipo y cantidad de interacciones con los otros componentes del sistema. De los experimentos de textura (ciclo) se deduce que el polímero que se genera por la cepa no filante, así como las interacciones de éste con otros componentes del sistema son más débiles ya que después de someterlo a 10 compresiones cíclicas, el gel pierde

el 76% de su estructura, mientras que el elaborado mediante una cepa filante solo pierde el 27% (Fig. 6.6.2.2). Se observa también que los geles elaborados en retenido de leche mediante una cepa filante presentan una adhesividad significativamente mayor (-280 gs vs -47 gs), por lo que podemos decir que éste parámetro puede ayudar a caracterizar a una cepa filante. Ambos estudios concuerdan con lo observado en la Figura 6.7.4.

Mediante estudios de microscopía electrónica de barrido se puede apreciar que ambas cepas fermentadas en retenido de leche produjeron mayor cantidad de exopolisacárido (Fig. 6.7.1; Fig. 6.7.2; Fig. 6.7.3; Fig. 6.7.4) que en los substratos anteriores, lo que concuerda con los resultados presentados en la Figura 6.6.2.1, lo cual puede traducirse en que la cantidad de caseína presente en los substratos iniciales tiene influencia en la producción de goma en los sistemas lácteos fermentados. Como se observa, hay una mayor producción de exopolisacárido por la cepa filante en todos los casos, lo cual se puede ver también en la Figura 6.6.2.1.; sin embargo, la composición de éste (relación proteína-carbohidrato) difiere, aunque se aprecia una tendencia a una mayor proporción de proteína en los sistemas elaborados a partir de una cepa filante.

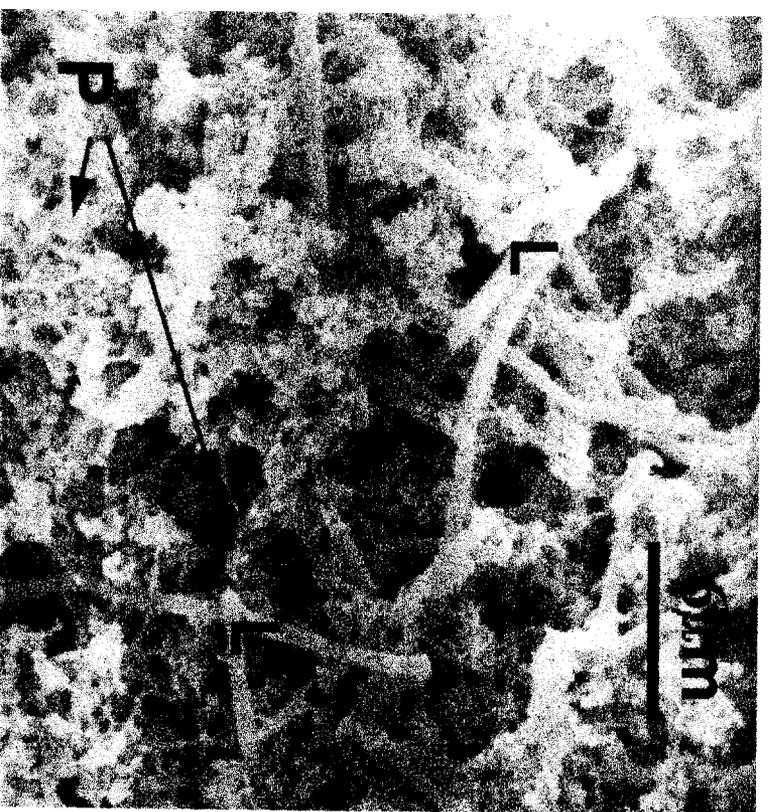
Se observó también que mientras mayor contenido de proteína presente en el sistema, mayor era el tamaño de las bacterias filantes (Fig. 6.7.1.A; Fig. 6.7.2.A; Fig. 6.7.3.A; Fig.6.7.4.B.), ya que en suero, suero adicionado con caseína, leche descremada y retenido de leche fermentado miden en promedio 3µm, 3.5µm, 7µm y 9µm respectivamente. Esto puede ser evidencia de que *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* NCFB 2772 (cepa filante) tiene la capacidad de llevar a cabo una proteólisis de la caseína, lo que

a su vez genera aminoácidos que pueden estimular su crecimiento y la producción de exopolisacárido.

Por otro lado, se observó (Fig. 6.7.1.B.; Fig. 6.7.2.B.; Fig. 6.7.3.B.; Fig. 6.7.4.A.) que al aumentar el contenido de proteínas presentes en sustrato inicial el tamaño de *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* NCFB 1489 (cepa no filante) disminuyó, ya que en suero, leche descremada y retenido de leche fermentado las bacterias miden en promedio 6.8 μm , 6 μm y 1.5 μm respectivamente, siendo la excepción el suero adicionado con caseína al 1.5% fenómeno que puede deberse a la heterogeneidad del sustrato inicial. Se observó que el tamaño de la bacteria es inversamente proporcional a la cantidad de goma producida, como se observa en las micrografías y en la Figura 6.6.2.1., lo que puede indicar que ésta cepa tiene capacidad de producir más exopolisacárido al someterla a condiciones de estrés, como lo es un alto contenido de proteína en el sustrato inicial.

Con base en lo anterior es posible establecer que las diferencias en las propiedades reológicas y texturales de los sistemas analizados pueden entenderse mediante estudios de microscopía electrónica, ya que ésta herramienta permite correlacionar las propiedades físicas con la microestructura de los productos fermentados.

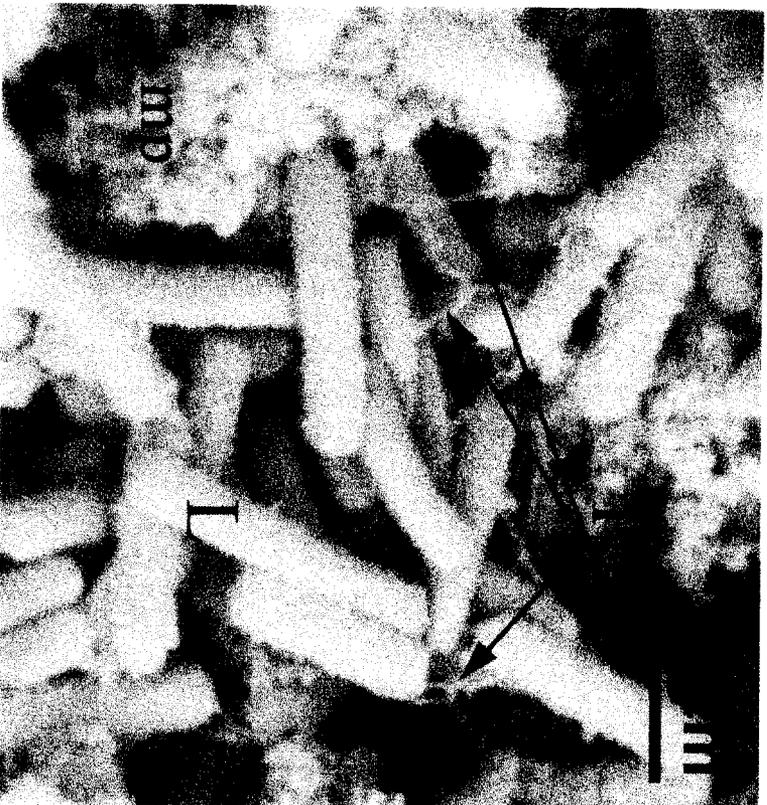
Figura 6.7.1. Comparación entre la cepa filante y la no filante fermentadas en suero mediante microscopía electrónica de barrido (L= lactobacilo; P= exopolisacárido).



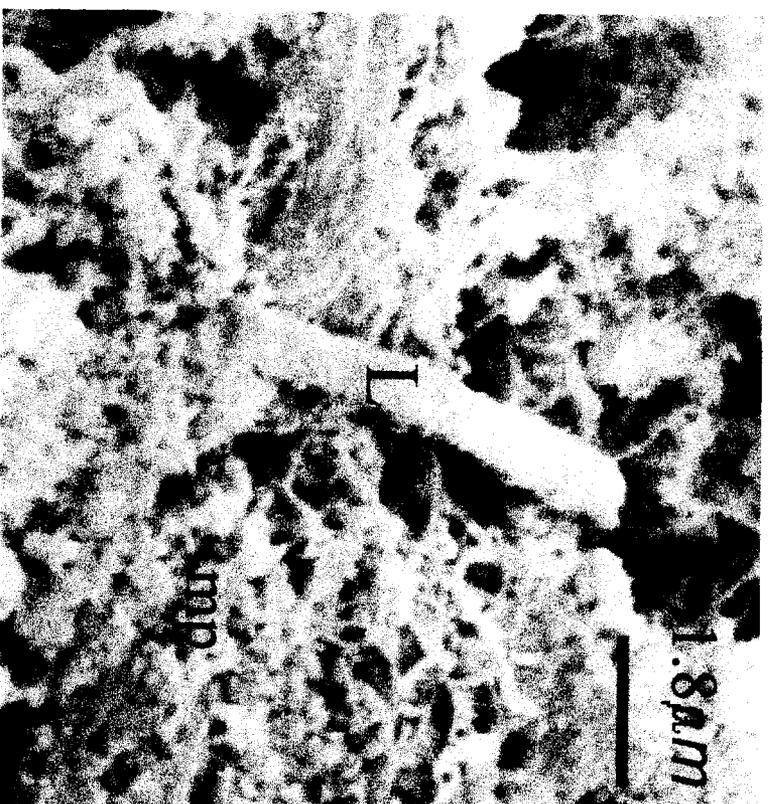
**A. *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus*
NCFB 2772 (Cepa filante).**

**B. *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus*
NCFB 1489 (Cepa no filante).**

Figura 6.7.2. Comparación entre la cepa filante y la no filante fermentadas en suero adicionado con caseína al 1.5%, mediante microscopía electrónica de barrido (mp= matriz proteica; L= lactobacilo; P= exopolisacárido).

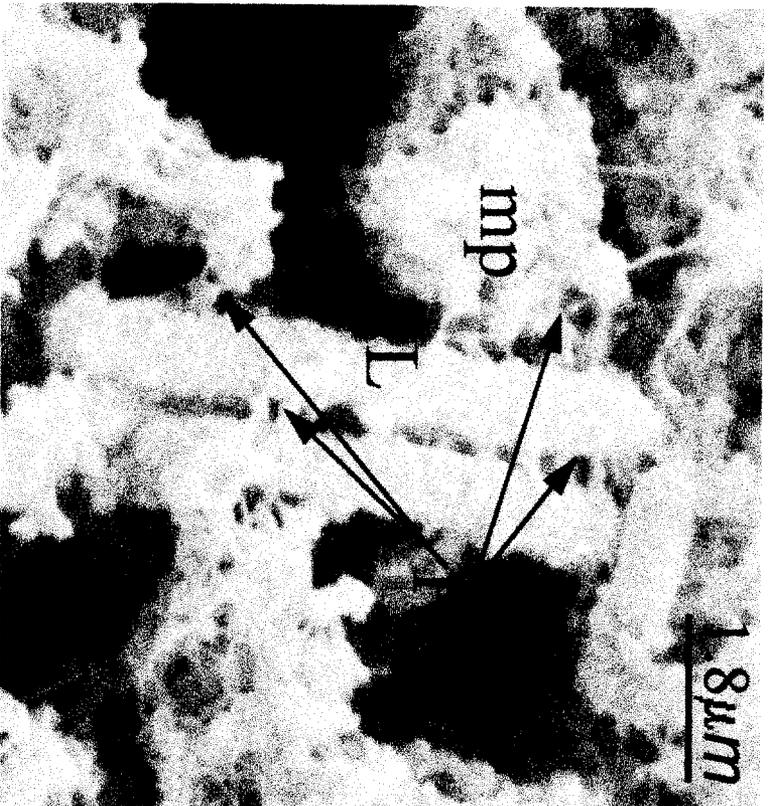


A. *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* NCFB 2772 (cepa filante).

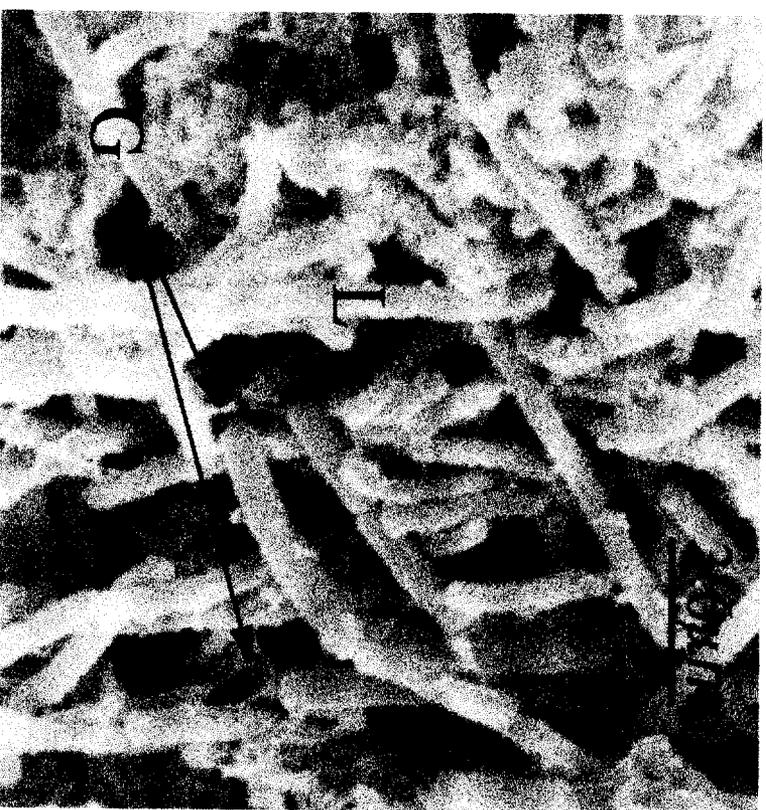


B. *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* NCFB 1489 (cepa no filante).

Figura 6.7.3. Comparación entre la cepa filante y la no filante fermentadas en leche descremada, mediante microscopía electrónica de barrido (mp = matriz proteica; L = Lactobacilo; P = exopolisacárido).

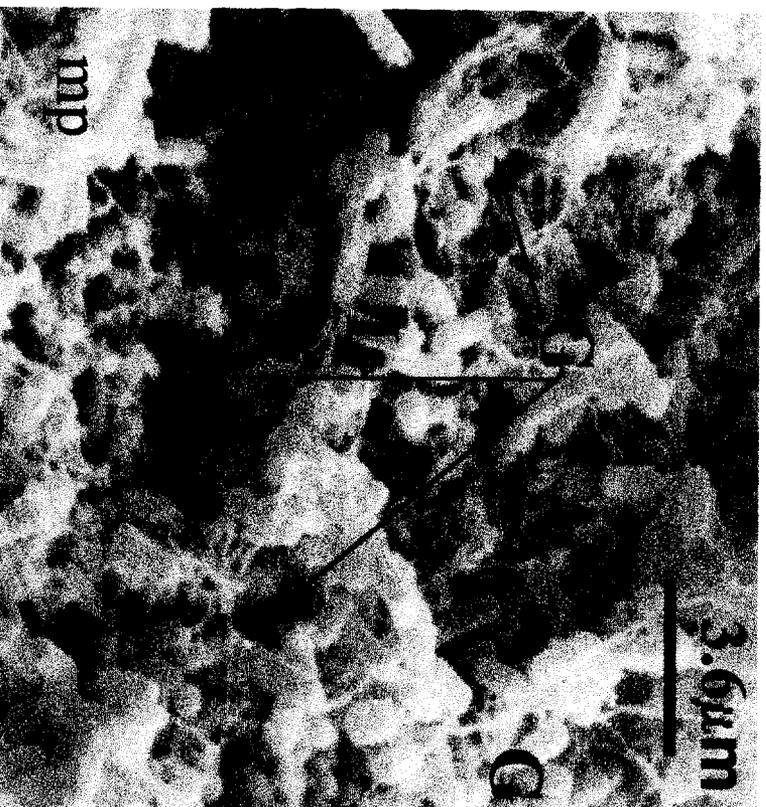


**A. *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus*
NCFB 2772 (cepa filante)**



**B. *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus*
NCFB 1489 (cepa no filante)**

Figura 6.7.4. Comparación entre la cepa filante y la no filante fermentadas en retenido de leche, mediante microscopía electrónica de barrido (mp= matriz proteica; L= lactobacilo; P= exopolisacárido).



A. *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* NCFB 1489 (cepa no filante)



B. *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* NCFB 2772 (cepa filante)

7. CONCLUSIONES

Con base en lo expuesto anteriormente se observó que a medida que se aumenta el contenido de proteína en el substrato la cepa filante produce más polímero, al establecer la relación proteína-carbohidrato de éste, se observó que la composición es significativamente diferente. Por lo que se puede concluir, que tanto el substrato como el tipo de cepa usada tienen influencia sobre la producción y composición del exopolisacárido producido.

De la caracterización reológica se observó que los productos fermentados elaborados a partir de suero se comportan predominantemente viscosos ($G'' > G'$), al correlacionar éstos resultados con las micrografías se observó la ausencia de una malla tridimensional, información que nos lleva a suponer que las micelas de caseína tienen efecto sobre el comportamiento reológico de los sistemas analizados. Se observó mediante estudios en microscopía electrónica que la cepa filante tiene la capacidad de producir exopolisacárido, sin embargo, no se puede apreciar interacciones de éste último con el resto de los componentes de sistema.

Para la leche y retenido de leche fermentados, el módulo de almacenamiento, que caracteriza el comportamiento elástico del material, fue superior al módulo de pérdida en el rango analizado. Esto significa que el componente sólido ($G' > G''$) contribuye más a definir el comportamiento del sistema, debido a la formación de una red tridimensional (micelas de caseína), la cual pudo observarse mediante estudios de microscopía electrónica de barrido. Cabe mencionar que ésta red era más compacta al tener un mayor

contenido proteico presente en el sustrato. Estos resultados coinciden con los encontrados mediante estudios de análisis de perfil de textura (TPA), donde los parámetros dureza y adhesividad son mayores en retenido de leche fermentado.

Al evaluar el efecto de la cepa sobre las propiedades reológicas de los sistemas observamos que para ambos sustratos fermentados (leche y retenido de leche) el componente elástico, que nos establece la contribución sólida del sistema, fue mayor dentro del rango de medición ($G'_{\text{leche fermentada con una cepa no filante}} \cong 3 G'_{\text{leche fermentada con una cepa filante}}$ y $G'_{\text{retenido de leche fermentado con una cepa no filante}} \cong 0.3 G'_{\text{retenido de leche fermentado con una cepa filante}}$). Mediante estudios de microscopía electrónica de barrido se pudo observar que la cepa filante tiene la capacidad de unirse con la matriz proteica del sistema mediante la goma que produce, sin embargo, como se mencionó anteriormente el exopolisacárido producido tiene características químicas diferentes, esto también se puede sustentar mediante pruebas de análisis de textura donde de los geles fermentados por una cepa filante son más duros (rígidos), lo que se refleja en mayor número de interacciones presentes en el sistema. Otra propiedad interesante es que los geles obtenidos a partir de una cepa filante son mucho más adhesivos que aquellos elaborados a partir de una cepa no filante, por lo que ésta puede ser una característica que nos ayude a definir el carácter filante de las bacterias

Al realizar las pruebas de ciclo (textura) se observó que las cepas filantes fermentadas en retenido de leche tienen la capacidad de conservar

mucho mejor su estructura que la cepa no filante. Ya que al cuantificar el porcentaje de pérdida de estructura se observó que la cepa filante pierde el 38.22% de ésta mientras que la cepa no filante pierde el 76.57%.

Con este trabajo se demostró que el carácter filante de una cepa no está únicamente determinado por la producción de un exopolímero, sino que la interacción entre el exopolisacárido con la micela de caseína y la bacteria misma tiene un papel primordial en la estabilidad del gel, que se puede cuantificar al establecer las propiedades reológicas, texturales y microestructurales del mismo.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Amiot, J. (1991) **Ciencia y Tecnología de la Leche: Principios y Aplicaciones**, Editorial Acribia, España. 364-366.
2. Arshad, M., Paulsson, M. y Dejmek, P. (1993) **Rheology of build up, breakdown, and rebodding of acid casein gels**, Journal of Dairy Science, 76, 3310-3316.
3. Badui-Dergal, S.(1990) **Química de los Alimentos** (2nda. de.) Editorial Alhambra Mexicana S.A. de C.V., México, 561-611.
4. Basak, S. y Ramaswamy, H.S. (1994) **Simultaneous evaluation of shear rate and time dependency of stirred yogurt rheology as influenced by added pectin and strawberry concentrate**, Journal of Food Engineering, 21, 385-393.
5. Benezech, T. y Maingonnat, J.F. (1993) **Flow properties of stirred yoghurt: structural parameter approach in describing time-dependency**, Journal of Texture Studies, 24, 455-473.
6. Benezech, T. y Maingonnat, J.F. (1994) **Characterization of the rheological properties of yoghurt. A Review**, Journal of Food Engineering 21, 447-472.
7. Bourne, M.C. (1982) **Food texture and viscosity**, Food Science and Technology. Academic Press, New York, USA, 118-167.
8. Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M.J. y Landon, M. (1986) **Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus***, Biotechnology Letters, 8 (9), 625-628
9. Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M. y Desmazeaud, M.J. (1990) **Comparison of exocellular polysaccharide production by thermophilic lactic acid bacteria**, Sciences des Aliments 10, 443-451.
10. Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M. y Desmazeaud, M. (1992). **Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria**, Journal of Dairy Science, 75, 692-699
11. Cerning, J., Renard, C.M.G.C., Thibault, J.F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., y Topisirovic, L. (1994) **Carbon source requirement for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer**, Applied and Environmental Microbiology, 60 (11), 3914-3919.
12. Cerning, J. (1995) **Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria**, Lait, 75, 463-472.

13. Doco, T., Carcano, D., Ramos, P., Loones, A. y Fournet, B. (1991) **Rapid Isolation and estimation of polysaccharide from fermented skim milk with *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by coupled anion exchange and gel-permeation high-performance liquid chromatography**, Journal of Dairy Research, 58, 147-150.
14. Ferry, J. (1980) **Viscoelastic Properties of Polymers** (3era. de.) John Wiley and Sons Inc., U.S.A., 33-48.
15. Gancel, F. y Novel, G. (1994 a) **Exopolysaccharide Production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. 1. Conditions of Production**, Journal of Dairy Science, 77, 685-688.
16. Gancel, F. y Novel, G. (1994 b) **Exopolysaccharide Production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. 2. Distinct Modes of Polymer production and degradation among clonal variants**. Journal of Dairy Science, 77, 689-695.
17. García-Garibay, M. y Marshall, V.M.E. (1991) **Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus***, Journal of Applied Bacteriology, 70, 325-328.
18. García-Garibay, M., Revah, S., Gómez Ruíz, L. (1993) **Productos lácteos**. En **Biotecnología Alimentaria** ed. por García-Garibay, M., Quintero Ramírez, R., López- Munguía Canales, A., Editorial Limusa, México, 166-174.
19. Gassem, M.A., Schmidt, K.A. y Frank, J.F. (1995) **Exopolysaccharide Production in different Media by Lactic Acid Bacteria**, Cultured Dairy Products Journal, 30, 18-21.
20. Gassem, M.A., Schmidt, K.A. y Frank, J.F. (1997) **Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus***, Journal of Food Science, 62 (1), 171- 173 y 207.
21. Grobber, G.J., Sikkema, J., Smith, M.R. y Bont, J.A.M. (1995). **Production of extracellular polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in a chemically defined medium**, Journal of Applied Bacteriology, 79, 103-107
22. Gruter, M., Leeflang Bas, R., Kuiper, J., Kamerling, J. y Vliegthart, J.F.G. (1993) **Structural characterisation of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* rr grown in skimmed milk**, Carbohydrate Research, 239, 209-226.
23. Hassan, A.N., Frank, J.F., Farmer, M.A., Schmidt, K.A. y Shalabi, S.I. (1995) **Formation of Yogurt Microstructure and Three-Dimensional**

- Visualization as Determined by Confocal Scanning Laser Microscopy**, Journal of Dairy Science, 78, 2629-2636.
24. Hess S.J., Roberts R.F. y Ziegler G.R. (1997) **Rheological Properties of nonfat yogurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* producing exopolysaccharide or using commercial stabilizer systems.** Journal of Dairy Science, 80, 252-263.
25. Jost, R. (1993) **Functional characteristics of dairy proteins**, Trends in Food Science and Technology, 4, 283-288.
26. Kalab, M. y Harwalkar, V.R. (1974) **Milk gel structure. II. Relation between firmness and ultrastructure of heat-induced skim-milk gels containing 40-60% total solids**, Journal of Dairy Research, 131-135.
27. Kaláb, M. (1979) **Microstructure of Dairy Foods. 1. Milk Products Based on Protein**, Journal of Dairy Science, 62 (8), 1352-1364.
28. Kaláb, M. (1993) **Practical Aspects of Electron Microscopy in Dairy Research**, Food Structure, 12, 95-114.
29. Kojic, M. Vujcic, M. Banina, A., Cocconcelli, P., Cerning, J. y Topisirovic L. (1992) **Analysis of exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* isolated from cheese**, Applied and Environmental Microbiology, 58 (12) 4086-4088.
30. Labropoulos, A.E., Palmer, J.K., y López, A. (1981) **Whey protein denaturation of UHT processed milk and its effect on rheology of yogurt**, Journal of Texture Studies, 12, 365-374.
31. Lewis, M.J. (1993) **Propiedades físicas de los alimentos y de los sistemas de procesado**, Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España, 101-167
32. Manca de Nadra, M.C., Strasser de Saad, A.M., Pesce de Ruiz Holgado, A.A. y Oliver, G. (1985). **Extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus bulgaricus* CRL 420**, Milchwissenschaft, 40 (7) 409-412.
33. Marshall, V.M., Cowie, E.N., y Moreton, R.S. (1995) **Analysis and production of two exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LC 330**, Journal of Dairy Research, 62, 621-628.
34. Mistry V.V. y Hassan H. N. (1992) **Manufacture of Nonfat Yogurt from a High Milk Protein Powder**, Journal of Dairy Science, 75, 947-957.
35. Mottar, J. y Bassier, A. (1989) **Effect of Heat Induced Association of Whey Proteins and Casein Micelles on Yogurt Texture**, Journal of Dairy Science, 72, 2247-2256.
36. Mozzi, F., Savoy de Giori, G., Oliver, G. Font de Valdez, G. (1995) **Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei*. II. Influence of the carbon source**, Milchwissenschaft, 50 (6) 307-309.

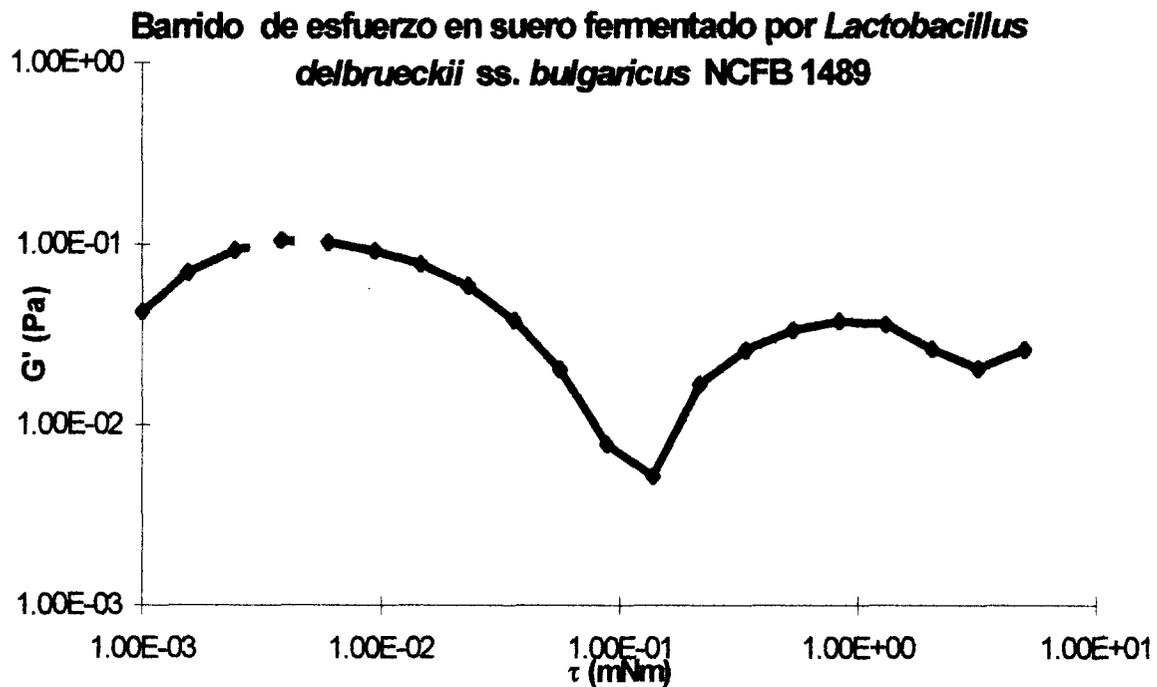
37. Muller, H.G. (1973) **Introducción a la reología de los alimentos**, Editorial Acribia, España, 13-17.
38. Nakajima, H. Toyoda, S., Takahiro, T. Itoh, T., Mukai, T., Kitazawa, H. y Adachi S. (1990) **A novel phosphopolysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris***, Journal of Dairy Science, 73, 1472, 1477.
39. Parnell-Clunies, E., Kakuda, V. Irvine, D. y Mullen, K. (1988) **Heat-induced protein changes in milk processed by vat and Continuous Heating Systems**, Journal of Dairy Science, 71 (6), 1472-1483.
40. Prentice, J.H. (1992) **Dairy Rheology: A concise Guide** Food Science and Technology Series, VCH Publishers, Inc., New York, U.S.A., 123-135.
41. Ramaswamy, H.S. y Basak, S. (1991) **Rheology of stirred yoghurts**. Journal of Texture Studies, 22, 231-241.
42. Ramaswamy, H.S. y Basak, S. (1992) **Time dependant stress decay rheology of stirred yogurt**, International Dairy Journal, 2, 17-31.
43. Rao, M.A. (1977) **Measurement of flow properties of fluid foods developments, limitations, and interpretation of phenomena**, Journal of Texture Studies, 8, 257-282.
44. Rohm, H. (1989) **Viskosität und Thixotropie von Joghurt**, Milchwissenschaft 44 (6), 340-342.
45. Rohm H. (1992) **Viscosity determination of stirred yoghurt**, Lebensmittel Wissenschaft und Technology, 25, 297-301.
46. Rohm, H. y Kneifel, W. (1993) **Physikalische Eigenschaften von Stichfestem Joghurt angereichert mit unterschiedlichen substraten**, Lebensmittel Industrie und Milchwiertschaft, 114 (11) 272-274.
47. Rohm, H. y Schmid, W. (1993) **Influence of dry matter fortification on flow properties of yogurt 1. Evaluation of flow curves**, Michwissenschaft, 48 (10) 556-560.
48. Rohm, H. y Kovac, A. (1994) **Effects of starter cultures on linear viscoelastic and physical properties of yoghurt gels**, Journal of Texture Studies, 25 (3) 311-329.
49. Rohm, H. y Kovac, A. (1995) **Effects of Starter cultures on small deformation rheology of stirred yoghurt**, Lebensmittel Wissenschaft und Technolgy, 28, 319-322.
50. Schellhaass, S.M. y Morris, H.A. (1985) **Rheological and scanning electron microscopic examination of skim milk gels obtained by fermenting with ropy and non-ropy strains of lactic acid bacteria**, Food Microstructure, 4 (2) 279-287.

51. Skriver, A., Roemer, H. y Quist, K.B. (1993) **Rheological characterization of stirred yoghurt: viscometry**, *Journal of Texture Studies*, 24, 185-198.
52. Steventon, A.J., Parkinson, C.J., Fryer, P.J. y Boottomley, R.C. (1990) **The rheology of yoghurt**. En **Rheology of food, pharmaceutical and biological materials with general rheology**. Ed. por Carter, R.E. British Society of Rheology, University of Warwick, Elsevier Applied Science, 196-210.
53. Szczesniak, A.S., Brandt, M.A. y Riedman, H.H. (1963) **Development of standard rating scales for mechanical parameters of texture and correlation between the objective and sensory methods of texture evaluation**. *Journal of Food Science*, 28, 397-403.
54. Tamime, A.Y., Kalab, M. y Davies, G. (1989) **Rheology and Microstructure of strained yoghurt (Labneh) made from cow's milk by three different methods**, *Food Microstructure*, 8, 125-135.
55. Tamime, A.Y. y Robinson, R.K. (1985) **Yoghurt Science and Technology**. Pergamon Press, Oxford.
56. Tegatz, J.A. y Morris, H.A. (1990) **Changes in the rheology and microstructure of ropy yogurt during shearing**, *Food Structure*, 9 (2) 133-138.
57. Toba T., Nakajima, H., Tobitani, A. y Adachi, S. (1990) **Scanning electron microscopic and texture studies on characteristic consistency of Nordic ropy sour milk**, *International Journal of Food Microbiology*, 11, 313-320.
58. Van Kleef, F.S.M., Boskamp, J.R. y Van den Tempel, M. (1978) *Biopolymers*, 17, 225-235
59. Van Marle, M.E. y Zoon, P. (1995) **Permeability and rheological properties of microbially and chemically acidified skim-milk gels**, *Netherlands Milk and Dairy Journal* 49, 47-65.
60. Wachter-Rodarte, C., Galván, M.V., Farrés, A., Gallardo, F., Marshall, V.M.E. y García-Garibay, M. (1993) **Yoghurt production from reconstituted skim milk powders using different polymer and non-polymer forming starter cultures**, *Journal of Dairy Research*, 60, 247-254.
61. Xiong, Y.L. y Kinsella, J.E. (1991a) **Influence of fat globule membrane composition and fat type on the rheological properties of milk based composite gels. I. Methodology**, *Milchwissenschaft*, 46 (3) 150-152.
62. Xiong, Y.L. y Kinsella, J.E. (1991b) **Influence of fat globule membrane composition and fat type on the rheological properties of milk based composite gels. II. Results**, *Milchwissenschaft*, 46 (4) 207-212.
63. Zourari, A., Accolas, J.P. y Desmazeaud, M.J. (1992) **Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review**, *Lait*, 72, 1-034.

9. ANEXOS

APENDICE I

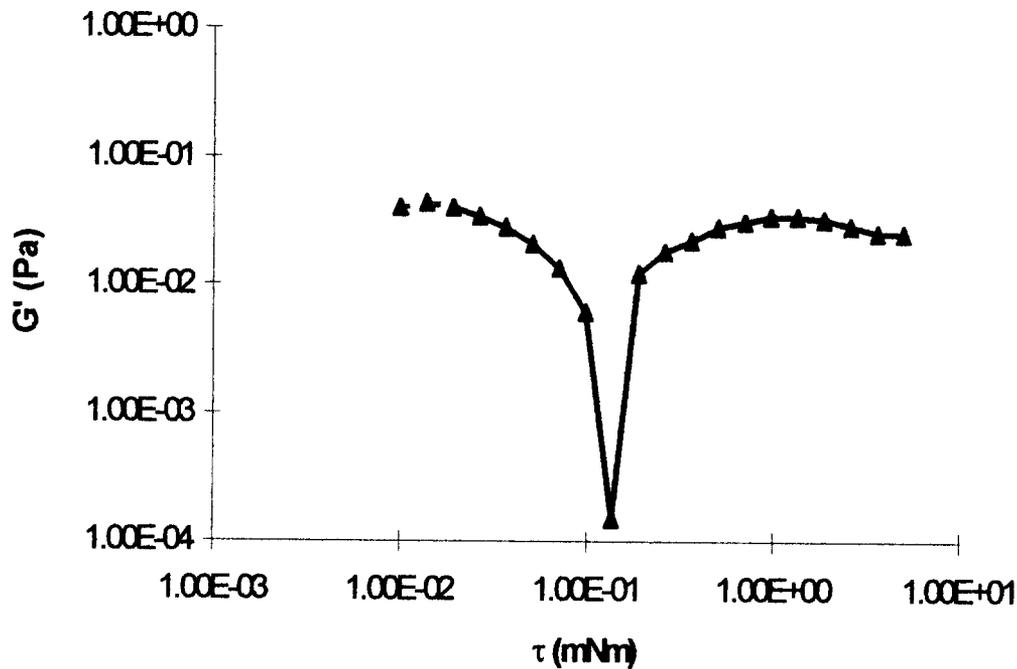
Para poder establecer la zona de viscoelasticidad lineal se realizaron barridos de esfuerzo en los diferentes substratos fermentados. A continuación se muestran las gráficas de torque-módulo de almacenamiento. Esta zona se marcó marcada con líneas punteadas.



Los parametros de medición para suero fermentado por una cepa no filante (*Lb. bulgaricus* ss. *delbrueckii* NCFB 1489) son:

Parametros de Medición		
Frecuencia	Inicial	0.050 Hz
	Final	1.00 Hz
Amplitud del Torque		4.50 e-03 mNm
Esfuerzo		2.75e-03 Pa
Programa		Esfuerzo constante

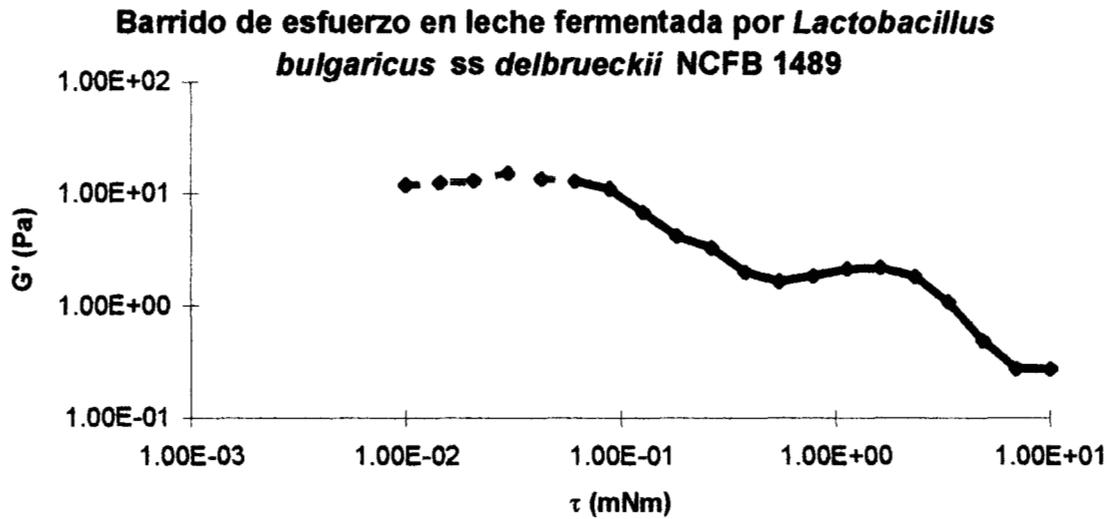
Barrido de esfuerzo en suero fermentado por *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* NCFB 2772



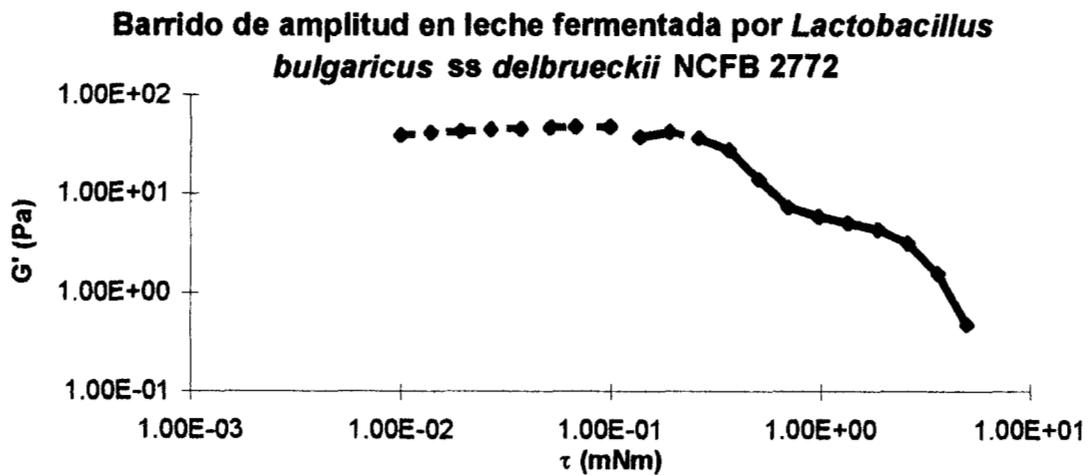
Y para suero fermentado por una cepa filante (*Lb. bulgaricus* ss. *delbrueckii* NCFB 2772):

Parametros de Medición		
Frecuencia	Inicial	0.050 Hz
	Final	1.00 Hz
Amplitud del Torque		1.50 e-02 mNm
Esfuerzo		9.18e-02 Pa
Programa		Esfuerzo constante

Se procedió a realizar la misma operación para en leche fermentada por ambas cepas.

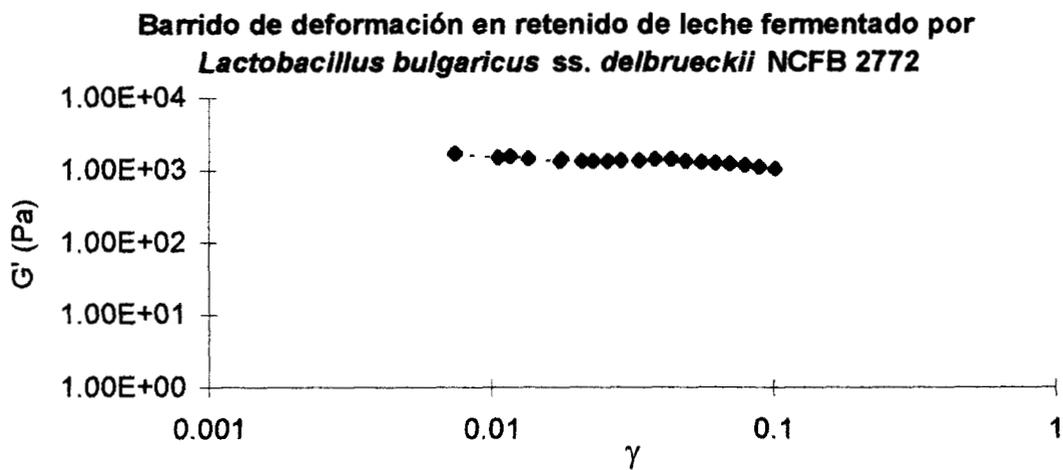


Parametros de Medición		
Frecuencia	Inicial	0.050 Hz
	Final	5.00 Hz
Amplitud del Torque		5.00 e-02 mNm
Esfuerzo		3.06 e-01 Pa
Programa		Esfuerzo constante



Parametros de Medición		
Frecuencia	Inicial	0.050 Hz
	Final	5.00 Hz
Amplitud del Torque		1.00 e-01 mNm
Esfuerzo		6.12e-01 Pa
Programa		Esfuerzo constante

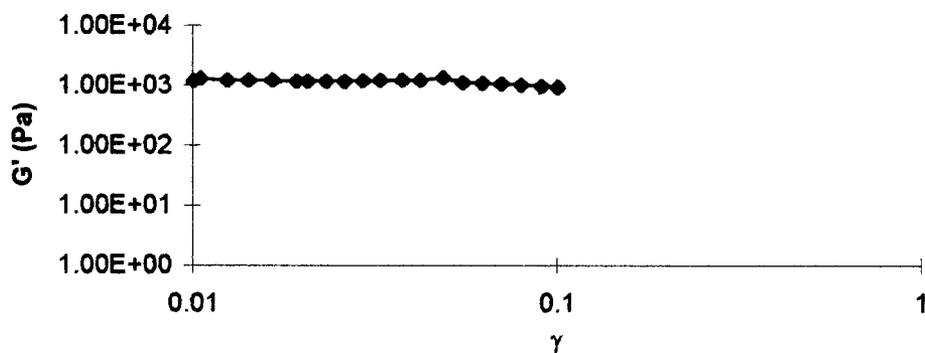
Por último se llevó a cabo el mismo procedimiento en retenido de leche.



Siendo las condiciones de medición las siguientes:

Parametros de medición		
Frecuencia	Inicio	0.05 Hz
	Final	5 Hz
Omega	Inicio	0.314159 (1/s)
	Final	31.4159 (1/s)
Programa:	Deformación constante	0.035

**Barrido de deformación en retenido de leche fermentado por
Lactobacillus bulgaricus ss. *delbrueckii* NCFB 1489**



Parametros de medición		
Frecuencia	Inicio	0.05 Hz
	Final	5 Hz
Omega	Inicio	0.314159 (1/s)
	Final	31.4159 (1/s)
Programa:	Deformación constante	0.035