

**centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A. C.**

**POLIMORFISMO GENÉTICO DE LA β -
LACTOGLOBULINA Y SU RELACIÓN CON LAS
PROPIEDADES REOLÓGICAS DE YOGUR CON
MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS**

POR:

CITLALLI MARÍA VELÁZQUEZ NAVARRO

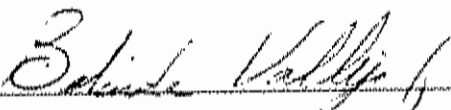
TESIS APROBADA POR LA

**COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
DE ORIGEN ANIMAL**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
HERMOSILLO, SONORA. DICIEMBRE DEL 2003
MAESTRÍA EN CIENCIAS**

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la Ingeniero en Alimentos Marinos Citlalli María Velázquez Navarro, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dra. Belinda Vallejo Córdoba

Directora de Tesis



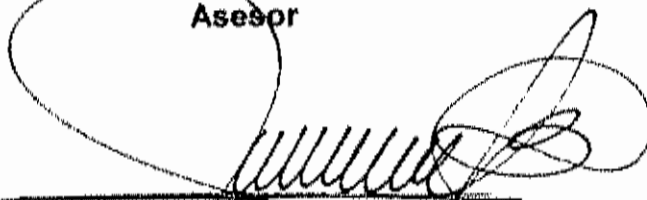
Dr. Francisco Goycoolea Valencia

Asesor



Dra. Alma Rosa Islas Rubio

Asesor



M. C. Aarón González Córdoba

Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la producción parcial o total de la tesis con fines académicos se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos a CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis.



Dr. Alfonso A. Gardea Béjar

Director General

"No necesitas dejar tu cuarto. Mantente sentado a tu mesa y escucha. No necesitas siquiera escuchar, simplemente espera. No necesitas siquiera esperar, simplemente aprende a ser silencioso, quieto y solitario. El mundo se te ofrecerá gratuitamente para que lo desenmascares; no tiene opción; rodará en éxtasis a tus pies"

Franz Kafka

"Empieza alguna vez a ser quien eres, en vez de calcular lo que serás"

Franz Kafka

"Sólo el que se ha reconciliado con sus miedos, viviendo en armonía con ellos, es un Verdadero Guerrero"

Pilar Ocampo

"Eres lo que tu más profundo y vigoroso deseo es. Como es tu deseo es tu voluntad, como es tu voluntad son tus actos y como son tus actos es tu destino"

Brihadaranyaka Upanishad IV.4.5

A LA MEMORIA DE

Mi Papayiyi, como solía llamar a mi Padre en la niñez...

Porque aún cuando ya no estas aquí para verme concluir una etapa más,
estoy segura que dirías...

"Hoy hay fiesta en mi corazón, Chicalita"

El Chompiritas, como amorosamente llamaba a mi Abuelo...

Por hacer de mi niñez risas y cosquillas...algo que disfruté tanto.

DEDICATORIA

A mi querida Madre...

Por hacer de mí la persona que soy. Por ser una gran mujer, una gran madre, una gran amiga, una gran profesionista y un excelente ser humano. Por ser un ejemplo de honradez, tenacidad y lucha constante. Por enseñarme a ser una guerrera incansable y un ser inquebrantable. Por cultivar en mí la fe que me ha dado fuerzas para no claudicar. Por tu infinito amor y tu invaluable apoyo...

A mi Esposo con todo mi amor...

Por aparecer un día en mi destino, por impulsarme a seguir día a día, por tu fe en mi tenacidad para concluir una etapa más en mi vida profesional. Por darme la oportunidad de abrir mis horizontes. Por tus cuidados y tu templanza. Por darme la alegría de unir nuestras vidas y esperar por mí con paciencia. Por tu amor y por enseñarme que soy fuerte, única y capaz...Has sido uno de mis mejores maestros, muchas gracias por eso.

A mi querida hermana Mónica, por enseñarme a pescar...algo que me ha servido a lo largo de mi formación profesional.

A mis adoradas sobrinas Valeria y Samantha, por traer risas y alegría a mi vida.

A mi querida Neyda, porque siempre tienes las palabras que necesito y por quererme tanto. Tu ayuda ha sido invaluable, te quiero mucho!

A mi adorada prima Starenka, por ser como mi hermana y compartir nuestra niñez. Por re-encontrarnos y compartir otra vez nuestros secretos. Te quiero mucho!

A mi querida prima Hilda, con mucho cariño, por su inmenso amor y su paciencia con mi carácter.

A Lupita, mi querida amiga la Negra, porque nuestra amistad y cariño ha perdurado a pesar del tiempo, la distancia...y Ulises!. Te quiero mucho y que Dios te bendiga aún más. Eres un gran ejemplo de amor, valentía y perseverancia.

A mi querida Sra. Edna, por ser una persona maravillosa y hacerme sentir siempre muy especial.

Al Lic. Carlos Minvielle, con mucho cariño. Por contribuir a mi formación profesional y por hacerme sentir que cuento con su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo recibido para realizar mis estudios de postgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), por contribuir al desarrollo de la ciencia y albergarme todo este tiempo.

A la Dra. Belinda Vallejo, por permitirme desarrollar este trabajo bajo su tutela y por sus intervenciones siempre asertivas.

Al M. en C. Aarón González, por su amistad y su apoyo.

A mi Comité de Tesis, por sus sugerencias para mejorar este trabajo.

Al M. en C. Miguel Angel Mazorra, por su invaluable apoyo a lo largo de mi formación.

Al Dr. Juan Pedro Camou, por ser un buen amigo, un sabio consejero y un excelente ser humano.

Al Dr. Ramón Pacheco, por los conocimientos compartidos y sus oportunos y sabios consejos.

A la Dra. Ana María Calderón, por tenderme una mano amiga cada vez que lo necesité y por sus valiosas enseñanzas en Comunicación Científica.

A Adriana Bolaños, por su paciencia para revisar mis presentaciones y por sus sugerencias.

A Ana Isabel, por ser tan amable y ayudarme siempre en todo.

A Pame (Ma. del Carmen), por ser tan accesible y prestarme el liofilizador de charolas tanto tiempo y también el Texturómetro. Además de que eso nos permitió empezar una bonita amistad, lo cual te agradezco.

A todo el personal de Biblioteca, por su disposición y ayuda. En especial al Sr. Gerardo, por su amistad.

A Armando Olguín, por su valiosa ayuda a lo largo de esta etapa y también por su disposición para compartir conmigo sus conocimientos.

A todos mis compañeros de Lácteos, por la ayuda brindada en algún momento.

A Eugenia y Marie, con mucho cariño. Por compartir conmigo un pedacito de su vida y por su valiosa amistad que ojalá siempre se mantenga a pesar de la distancia.

A Javier Magaña, mi compañero y amigo de generación, porque en efecto "Dios transforma personas"...Eres excepcional!

A Edmundo, mi querido amigo y confidente. Gracias por todas las risas y sonrisas compartidas, por tu confianza y tu ayuda en todo momento. Eres un

gran ser humano. Gracias por enseñarme lo sencilla que es la vida y lo complicada que la hacemos nosotros mismos...

A Saúl, mi amigo y maestro de baile, pues llegaste cuando necesitaba a alguien como tú. Gracias por todas las horas de diversión que compartimos, las cuales me hicieron borrar penas y atesorar felicidad.

A Faby y Abel... chicos, no encuentro palabras para agradecerles tanta ayuda. Espero la vida me dé la oportunidad de ayudarlos también.

A Deysi, con todo mi cariño, por ser tan original y por escucharme cada vez que lo necesité. **Por animarme a no temer y a decidir...**

A Ana Luque, por tu hospitalidad y por hacer tan agradable estos últimos meses en CIAD.

A todos mis compañeros de generación, pues aportaron grandes cosas a mi vida y me ayudaron a crecer. Especialmente a Eréndira y a Jorge.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xv
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	7
Importancia del Yogur	7
Tendencias de Mercado	7
Propiedades Nutricias y Terapéuticas	8
Características Sensoriales	11
Perfil de Sabor	11
Propiedades Reológicas	12
Composición de la leche	16
Proteínas de la Leche	17
Formación y Estabilidad de las Micelas de Caseína	23
Sales y Minerales	26
Aspectos Tecnológicos del Yogur	28
Cultivos Lácticos Iniciadores y Probióticos Adjuntos	28
Tecnología del Yogur y Calidad del Producto Terminado	31
Defectos Principales y Uso de Estabilizantes	33
Polimorfismo Genético de las Proteínas Lácteas	35

Variantes Genéticas Presentes en la Leche de Bovino	36
Variantes Genéticas de la β -Lactoglobulina.....	36
Polimorfismo Genético y su Relación con la Composición de la Leche.....	38
Polimorfismo Genético y su Relación con las Propiedades de Coagulación	41
Principios de Estadística Multivariada.....	43
Análisis de Correlación Canónica	43
MATERIALES Y MÉTODOS	44
Selección del Cultivo para la Preparación del Yogur	44
Cultivos	44
Preparación de los Sólidos de Leche.....	44
Preparación del Yogur	45
Composición de la Leche.....	46
Análisis de Textura	46
Susceptibilidad a la Sinéresis	47
Evaluación Sensorial	47
pH	52
Análisis Estadístico	52
Polimorfismo Genético y Propiedades Reológicas del Yogur	53
Muestreo.....	53
Identificación y Cuantificación de los Fenotipos de la β -Lg.....	54
Determinación de la Composición de la Leche.....	55
Preparación del Yogur	56

Medición de las Propiedades Reológicas	56
pH	57
Análisis Estadístico de los Datos	57
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
Selección del Cultivo para la Preparación del Yogur	58
Mediciones Instrumentales	60
Evaluación Sensorial	70
Criterios para la Selección del Cultivo	80
Polimorfismo Genético y Propiedades Reológicas del Yogur	81
Composición de la Leche.....	81
Identificación del Fenotipo de las Muestras Analizadas.....	83
Cuantificación de las Muestras Analizadas por Medio de ECZL.....	86
Relación entre los Fenotipos de la β -Lg y las Propiedades Reológicas del Yogur con Microorganismos Probióticos.....	90
CONCLUSIONES	95
BIBLIOGRAFÍA	97

LISTA DE TABLAS

	Página
1. Composición aproximada de la leche	18
2. Variantes genéticas para los seis grupos principales de proteínas	37
3. Diferencias en los aminoácidos de las variantes A, B y C de la β -lactoglobulina	39
4. Atributos, referencias y técnicas de evaluación utilizadas para el entrenamiento del panel	51
5. Mediciones instrumentales para la selección del cultivo	69
6. Análisis de varianza que muestra la habilidad de los panelistas	71
7. Resultados del análisis descriptivo	79
8. Composición de las muestras de leche	82
9. Frecuencia de los fenotipos de la β -lactoglobulina	85
10. Relaciones lineales del estándar analítico para cada proteína sérica	87
11. Concentraciones de los fenotipos de la β -lactoglobulina en las muestras analizadas, determinadas por ECZL	89
12. Variables dependientes (Y's) e Independientes (X's), utilizadas en el análisis de correlación canónica	93
13. Ecuación del primer par de variables. $p=8, q=5, r=5$	94

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Curva típica de una prueba de medición de la fuerza en compresión extrusión en reversa, utilizando el Analizador de Textura TA-XT2	15
2. Micela de caseína	24
3. Formato utilizado para evaluar el nivel de agrado	48
4. Formato utilizado para el análisis descriptivo	50
5. Diagrama de flujo del experimento	59
6. Efecto de la concentración de sólidos (0, 1.5 y 3%), en la actividad de acidificación de un cultivo tradicional (CT) y dos cultivos probióticos (CP1/CP2)	61
7. Susceptibilidad a la sinéresis de yogur preparado a partir de un cultivo tradicional (CT) y dos cultivos probióticos (CP1/CP2), con diferentes niveles de sólidos añadidos 0, 1.5 y 3%	63
8. Curvas de fuerza en compresión de yogur preparado a partir de un cultivo tradicional (CT) y dos cultivos probióticos (CP1/CP2)	65
9. Firmeza y consistencia de yogur preparado a partir de un cultivo tradicional (CT) y dos cultivos probióticos (CP1/CP2),	

	con diferentes niveles de sólidos añadidos 0, 1.5 y 3%	67
10.	Cohesividad y adhesividad de yogur preparado a partir de un cultivo tradicional (CT) y dos cultivos probióticos (CP 1/CP 2), con diferentes niveles de sólidos añadidos 0, 1.5 y 3%	68
11.	Análisis descriptivo de la sinéresis y la firmeza de yogur preparado a partir de un cultivo tradicional (CT) y dos cultivos probióticos (CP 1/CP 2), con diferentes niveles de sólidos añadidos 0, 1.5 y 3%	73
12.	Análisis descriptivo de la viscosidad de yogur preparado a partir de un cultivo tradicional (CT) y dos cultivos probióticos (CP 1/CP 2), con diferentes niveles de sólidos añadidos 0, 1.5 y 3%	75
13.	Análisis descriptivo del aroma y el sabor de yogur preparado a partir de un cultivo tradicional (CT) y dos cultivos probióticos (CP 1/CP 2), con diferentes niveles de sólidos añadidos 0, 1.5 y 3%	77
14.	Análisis descriptivo de la acidez de yogur preparado a partir de un cultivo tradicional (CT) y dos cultivos probióticos (CP 1/CP 2), con diferentes niveles de sólidos añadidos 0, 1.5 y 3%	78
15.	Electroferograma típico de las proteínas del suero de leche	84

16. Curvas de calibración para los fenotipos A y B de
la β -lactoglobulina

88

RESUMEN

La coagulación de las proteínas de la leche es un factor fundamental durante la elaboración de yogur. La composición de la leche y el proceso, influyen en la estabilidad (sinéresis) y las propiedades reológicas (firmeza, consistencia, cohesividad y adhesividad), de este alimento. Con objeto de mejorar la textura y prevenir la sinéresis, se ha recurrido al uso de estabilizantes y cultivos productores de exopolisacáridos. Algunos estudios, utilizando geles inducidos químicamente como sistemas modelo, han relacionado sus propiedades reológicas con los fenotipos de la β -lactoglobulina. Sin embargo, es necesario estudiar el efecto del polimorfismo genético de la β -lactoglobulina en la sinéresis y las propiedades reológicas del yogur. El objetivo de este trabajo fue establecer la relación entre los fenotipos de la β -lactoglobulina y las propiedades reológicas y sinéresis del yogur, usando análisis de correlación canónica. Se tomaron muestras individuales de leche provenientes de vacas Holstein. Estas muestras se pasteurizaron y se fermentaron utilizando un cultivo iniciador (*S. thermophilus* and *L. delbrueckii* sbs. *bulgaricus*) conteniendo bacterias probióticas (*Bifidobacterium* and *Lactobacillus acidophilus*). El cultivo iniciador fue seleccionado entre tres cultivos comerciales mediante un análisis sensorial descriptivo. El sabor, aroma, textura y expulsión de suero fueron evaluados por un panel entrenado. Las propiedades reológicas fueron determinadas usando una prueba instrumental de compresión y la sinéresis se evaluó determinando el suero expulsado. La β -lactoglobulina A y/o B fueron identificadas y cuantificadas por electroforesis capilar en zona libre. La proporción caseína-proteína sérica fue calculada por diferencia con respecto a la proteína total. La composición de la leche en términos

de grasa, proteína y lactosa fue determinada por espectrometría de infrarrojo medio. Los datos se analizaron aplicando un análisis de correlación canónica. Las variables canónicas relacionando firmeza, consistencia, cohesividad, adhesividad y sinéresis como variables dependientes con β -lactoglobulina A y/o B, proporción caseínas/séricas, grasa, lactosa, pH inicial y proteína total como variables independientes, presentaron una fuerte correlación. La β -lactoglobulina fenotipo B mostró una fuerte influencia en la estabilidad y propiedades reológicas del yogur, respecto al fenotipo A. Estos resultados pueden ser útiles para aquellos industriales que deseen usar una selección genética basada en el polimorfismo de las proteínas de la leche para mejorar la calidad del yogur.

INTRODUCCIÓN

El yogur es un alimento que en los últimos años ha desarrollado una gran importancia económica. Su imagen de producto sano y natural ha hecho que sus ventas se incrementen de manera sustancial y sea considerado un alimento funcional (Katz, 2001). A esto se suma el hecho de que la industria, con objeto de mejorar sus propiedades benéficas, adicione probióticos, prebióticos o ambos. Este valor agregado, lo hace aun más atractivo a los consumidores y se estima que en un futuro este tipo de yogur desplace por completo al yogur tradicional (Hollingsworth, 2001)

Pese a su desarrollo económico acelerado, en la legislación mexicana no existe una Norma Oficial para este alimento, sin embargo, se cuenta con la Norma Mexicana NMX-F-444-1983, la cual define yogur natural como "producto lácteo preparado a partir de leche entera, parcial o totalmente descremada, enriquecida con extractos secos por medio de la concentración de ésta o agregando leche en polvo, tratada térmicamente y coagulada biológicamente por la fermentación obtenida de la siembra en simbiosis de los fermentos lácteos *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*". Es interesante resaltar que en la sección 5.8 de esta norma, se especifica que no se permite el uso de aditivos (incluyendo estabilizantes) en la elaboración de yogur natural.

Las propiedades reológicas del yogur son un factor determinante en su aceptación por el consumidor. Estas características están determinadas por las condiciones de proceso y composición de la materia prima, principalmente las proteínas de la leche. Si no se consideran estos dos aspectos, las características finales del producto resultan en dos defectos principales: variaciones en la consistencia (viscosidad y firmeza), y la expulsión de suero (sinéresis). Esta situación lleva a la industria al empleo de estabilizantes y sólidos de leche, que es la manera más fácil de mejorar las características sensoriales del producto, enmascarando muchas veces, las deficiencias del proceso o la calidad de la materia prima. Sin embargo, esta medida resulta en un incremento de sus costos de operación y situándose en un contexto internacional donde si existen regulaciones para este alimento, existiría un desapego a la legislación pues se prohíbe el uso de estabilizantes en el yogur natural.

Se sabe que las proteínas de la leche juegan un papel preponderante en la formación del coágulo del yogur, por consiguiente, la consistencia y viscosidad del producto, guardan una relación directa con la calidad y la concentración de dichas proteínas. Asimismo, también se ha observado que cualquier factor que afecte la naturaleza de las proteínas, estará afectando también sus propiedades funcionales.

De 1955 a la fecha, se ha identificado la presencia de 30 variantes genéticas para las 6 fracciones proteicas más importantes de la leche (Ng-Kwai-Hang, 1998; Zappacosta *et al.*, 1998), estas variantes alteran la funcionalidad de la leche y por tanto modifican las propiedades reológicas de sus derivados. De tal manera, que el polimorfismo genético (PG) se traduce en una modificación de la estructura primaria de las proteínas produciendo una alteración en las propiedades funcionales de las mismas (Ng-Kwai-Hang y Grosclaude, 1992). Estos conocimientos han marcado la pauta para realizar múltiples investigaciones sobre las propiedades de coagulación de las proteínas, pero la mayoría se ha realizado en queso. Sin embargo, estos resultados no pueden extrapolarse al yogur pues las condiciones de coagulación y las propiedades reológicas en ambos productos son muy diferentes (Lucey, 2002).

Existen pocos estudios sobre PG en yogur, y sólo se han evaluado aspectos de reología en geles acidificados químicamente o inducidos por calor. Aunque la acidificación química reduce la variación natural causada por las bacterias, los procesos químicos y de fermentación son diferentes, por lo tanto, las propiedades finales del gel también podrían ser diferentes (Puvanenthiran *et al.*, 2002). Es por esto, que el conocimiento en este sentido es muy limitado, haciéndose necesario realizar más investigación utilizando yogur como unidad

experimental. Aunado a esto y considerando las tendencias en el consumo de este alimento, se hace necesario incorporar el factor "probiótico" también como base de estudio.

Debido a lo anterior, se puede decir que el uso de leche con una variante específica que proporcione mejores propiedades reológicas al yogur, podría disminuir la necesidad de añadir sólidos de leche y reducir el uso de estabilizantes. Esta estrategia traería beneficios a la industria en términos económicos y en caso de dictarse una Norma Oficial Mexicana, también legales. Además, le permitiría volver a un concepto más natural, acorde con las tendencias actuales de consumo. Por otro lado, y dado que la β -lactoglobulina (β -Lg) contribuye de manera importante en la estabilidad térmica de los productos lácteos y en especial en las características sensoriales del yogur (Montilla *et al.*, 1995; Lucey *et al.*, 1998), se podría considerar que el PG de ésta proteína influye en las propiedades reológicas del yogur.

Por lo anterior y dada la importancia económica de este alimento, el objetivo de este trabajo fue establecer la relación entre los fenotipos de la β -lg y las propiedades reológicas y sinéresis del yogur con microorganismos probióticos.

ANTECEDENTES

Importancia del Yogur

Tendencias de Mercado

La industria de alimentos está enfocando sus esfuerzos en la investigación de los llamados alimentos funcionales. Un alimento se puede considerar funcional si tiene un componente (el cual puede ser o no un nutrimento) que afecta positivamente alguna función del cuerpo, promoviendo la buena salud. En el caso de que dicho componente sea un nutrimento, éste debe tener un efecto fisiológico o psicológico más allá de su efecto tradicional (Klaenhammer, 2000; Roberfroid, 2000). Este nuevo nicho de los alimentos funcionales ha demostrado ser muy rentable, pues las ventas de la industria norteamericana están creciendo en un 10-20% por año (Hollinsworth, 1997; Shah, 2001).

Esta tendencia nueva y acelerada hacia el consumo de alimentos naturales que promueven la salud es de esperarse, pues el consumidor cada vez está más interesado en su salud. Así, en una encuesta realizada en Estados Unidos, el 66% de los encuestados dijo que trataba de evitar alimentos con aditivos y/o conservadores. Por otro lado, también se encontró que uno de los principales motivos de decisión de compra en alimentos, está relacionado con la buena salud (Sloan, 2001; Bruhn *et al.*, 2002).

En los últimos años el consumo de yogur se ha incrementado notablemente gracias a su imagen de alimento saludable y natural. En Estados Unidos, el consumo ha pasado de 0.5 kg/persona/año en los 80's a 2 kg/persona/año en 1995 (Chandan, 1999). Sin embargo, el yogur adicionado con cultivos probióticos está desplazando al tradicional y actualmente representa el 20% del mercado de yogur en Europa y se espera que en un futuro lo desplace por completo (Hollingsworth, 2001)

Propiedades Nutricias y Terapéuticas

La leche al igual que el yogur, es una fuente rica de proteína, riboflavina, ácido fólico y calcio. Durante su conversión a yogur, ocurren cambios favorables en la composición de los nutrimentos. Por esto, el yogur es considerado como un promotor de la buena salud, pues también se le han asociado diversas propiedades terapéuticas. Ello se debe a su contenido de más de 10^7 UFC/mL de bacterias acidolácticas (LAB) vivas. Especialmente *Lactobacillus bulgaricus*, que en conjunto con *Streptococcus thermophilus*, son también las responsables de las características típicas de sabor y textura (Chen *et al.*, 1999)

Los cambios ocurridos durante la fermentación de la leche, hacen que las proteínas y los carbohidratos sean más fáciles de digerir y asimilar, especialmente por aquellas personas que tienen problemas de intolerancia a la

lactosa. Estos cambios incluyen un decremento en la lactosa, y un incremento en el contenido de péptidos, aminoácidos libres, ácidos grasos libres, ácido fólico y ácido linoleico conjugado. También se ha encontrado que la biodisponibilidad del calcio y del fósforo es mayor en el yogur que en la leche. Además, se ha visto que los nutrimentos producidos ayudan a mantener una respuesta inmune óptima (Meydani y Ha, 2000; Tamime y Robinson, 1999)

Un aspecto de gran importancia en la elaboración de yogur, es que el contenido de ácido linoleico conjugado (CLA por sus siglas en inglés) presente en la leche se mantiene e inclusive se incrementa con algunas cepas de bacterias acidolácticas que tienen la habilidad de producir este ácido graso. El CLA es considerado un factor que promueve la buena salud. Los beneficios nutricionales asociados con el CLA son: actividad anticarcinogénica, agente antiateroesclerótico, modulador del sistema inmune, agente antidiabético y agente reductor de la grasa corporal. Este ácido graso sólo se encuentra en los productos lácteos ya que es producido por bacterias en el rumen de la vaca y como su concentración es relativamente baja, muchas investigaciones se han desarrollado en torno a la suplementación del ganado con ciertos aceites vegetales como el de soya para incrementar su contenido de manera natural en la leche (Boylston y Beitz 2002; Kim y Liu, 2002)

Actualmente, se incorporan microorganismos probióticos al yogur, principalmente *L. acidophilus* y bifidobacterias, y con ello se refuerzan sus propiedades terapéuticas. Entre estas propiedades se encuentran: mayor resistencia a infecciones intestinales y vaginales, disminución de incidencia de enfermedades diarreicas y prevención de hipercolesterolemia y cáncer de colon. También se encuentra el mejoramiento en la utilización de la lactosa, prevención de enfermedades gastrointestinales superiores y estabilización de la mucosa intestinal. Para que los probióticos tengan efecto benéfico se requiere una ingestión diaria de 10^7 UFC/g de alimento (Kailasapathy y Ribka, 1997; Adhikari *et al.*, 2000, Shah, 2000)

Otro de los beneficios nutricios y terapéuticos del yogur son los oligosacáridos. Estos carbohidratos han sido asociados con beneficios a la salud pues mejoran el funcionamiento del tracto gastrointestinal y son precursores de compuestos anticarcinogénicos. Se ha visto que durante la manufactura de yogur utilizando una mezcla de cultivos de bifidobacterias aparte del cultivo tradicional, se puede producir galacto-oligosacáridos, lo cual refuerza aún más las propiedades terapéuticas del yogur probiótico (Lamoureux *et al.*, 2002)

Características Sensoriales

Las características sensoriales de un producto son de gran importancia en su aceptación, lo cual, determina su éxito o fracaso en el mercado. En el caso del yogur, estas características deben ser el resultado "natural" de una coagulación biológica de las proteínas de la leche por acción de *L. bulgaricus*, que en conjunto con *S. thermophilus*, son los responsables de las características sensoriales típicas del yogur (Adhikari *et. al*, 2000). Por lo tanto, es de gran importancia que el proceso y la materia prima, resulten en un producto con excelentes propiedades reológicas y de sabor.

Perfil de Sabor

El sabor en el yogur es impartido por los productos que se generan del metabolismo de los cultivos utilizados para la fermentación. El acetaldehído, ácido acético, etanol, acetona, diacetil y 2-butanona están presentes en cantidades suficientes, pero el primero de ellos es considerado como el componente típico del sabor del yogur. La calidad del sabor también depende de un buen balance entre el acetaldehído y otros compuestos como la acetona, cuya relación óptima ha resultado ser 2:8 (Alonso y Fraga, 2001; Frengova *et al.* 2000)

La formación de acetaldehído empieza a un pH de 5, alcanza su máximo a pH 4.2 y se estabiliza a pH 4. Este compuesto se forma a partir de la glucosa por acción de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* y es catalizada por la acción de la enzima acetaldehído deshidrogenasa. El acetaldehído también se produce a partir del metabolismo del aminoácido treonina, que es degradado por la enzima treonin-aldolasa que la presentan ambas bacterias acidolácticas (Alonso y Fraga, 2001)

El aroma típico del yogur se debe principalmente a la formación de compuestos derivados de reacciones proteolíticas y lipolíticas. Los péptidos y aminoácidos generados por proteólisis, actúan como precursores de reacciones químicas y enzimáticas en las que se producen compuestos aromáticos. Asimismo, los productos finales de la degradación de grasa, contribuyen significativamente al aroma del yogur (Alonso y Fraga, 2001)

Propiedades Reológicas

La reología es una rama de la mecánica que estudia las propiedades de deformación y esfuerzo de los materiales. Las técnicas reológicas se utilizan en el análisis de las características viscoelásticas de biopolímeros alimentarios en estado hidratado. La caracterización reológica de un material se lleva a cabo mediante dos tipos principales de deformación. En el primer tipo la muestra es

sometida a una deformación longitudinal aplicando una fuerza de extensión o de compresión. En el segundo tipo, la muestra es deformada lateralmente (o tangencialmente) por una fuerza cortante o de cizalla. Casi todos los sistemas de biopolímeros y de alimentos en general, exhiben un comportamiento intermedio entre sólido y líquido caracterizado por una respuesta intermedia entre elástica y viscosa, respectivamente. Por tanto, se les considera como materiales viscoelásticos (Carson *et al.*, 2002; Goycoolea, 2002).

Las propiedades reológicas de materiales viscoelásticos como el yogur, han sido estudiadas ampliamente y se ha demostrado que a deformaciones grandes el yogur exhibe un comportamiento pseudoplástico y a deformaciones pequeñas (medidas dinámicas) muestra propiedades de un gel débil. Existen varias técnicas para medir la firmeza del coágulo, como pruebas de penetración-compresión y reología dinámica oscilatoria (Suwonsichon y Peleg, 1999; Puvanenthiran *et al.*, 2002). Aunque la reología dinámica es una técnica poderosa, la desventaja es que sólo puede medirse una muestra a la vez y el tiempo del experimento (5-7 hrs/muestra) para obtener suficientes datos, es bastante largo. (Keogh y O'Kennedy, 1998; Skriver *et al.*, 1999)

Otra desventaja que presenta el comportamiento del yogur es que siendo un fluido no-Newtoniano, no da lecturas estables de viscosidad con el

viscosímetro Brookfield (Dave y Shah, 1998). Una alternativa muy práctica para la evaluación de la textura es el uso del Analizador de Textura utilizando una prueba de medición de la fuerza en compresión con celda de extrusión en reversa. Esta técnica permite obtener curvas (Fig 1) que proporcionan datos sobre los siguientes parámetros:

1. Firmeza o Fuerza de Gel. Es la fuerza necesaria para alcanzar cierta deformación (Giese, 1995). En la Figura 1 es la fuerza requerida para penetrar cierta distancia.
2. Consistencia. Esta característica se relaciona con todas las sensaciones resultantes de la estimulación de los receptores mecánicos y táctiles de la boca (Bourne, 2002). El área bajo la curva, en la zona positiva, se toma como la consistencia (Fig. 1)
3. Cohesividad. Es la fuerza de las uniones internas que dan cuerpo al producto (Giese, 1995). El máximo valor negativo representado en la curva (Fig. 1)
4. Adhesividad. Se define como el trabajo necesario para vencer la fuerza de atracción entre la superficie del alimento y la de otro material. Está representada por el área bajo la curva en la región negativa (Fig. 1)

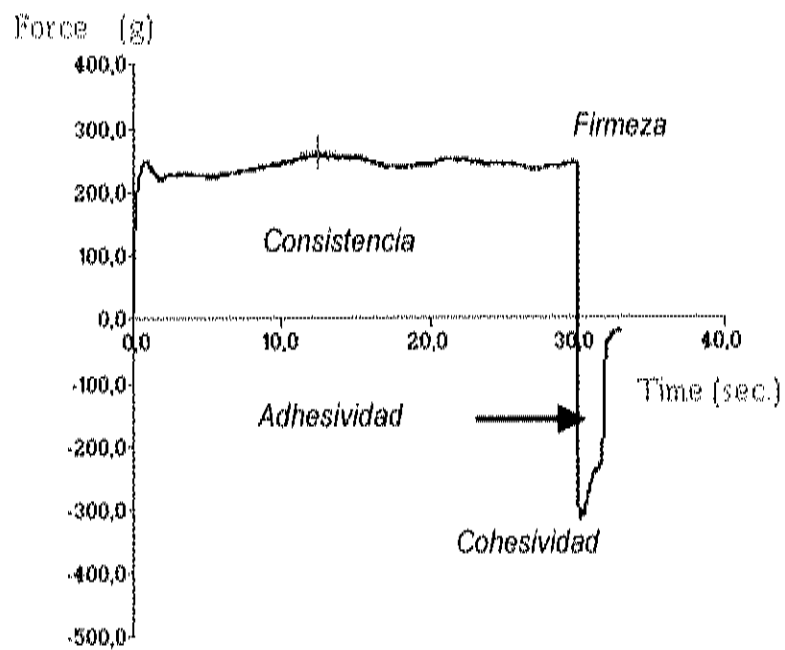


Fig 1. Curva típica de una prueba de medición de la fuerza en compresión con extrusión en reversa, utilizando el analizador de textura TA-XT2

Composición de la leche

En general la leche está compuesta por agua, grasa, proteínas, azúcares, vitaminas, y minerales, además de otras sustancias que están presentes en menor concentración y que en conjunto forman un sistema físico-químico relativamente estable. Este sistema debe su estabilidad a que todos los constituyentes se encuentran en equilibrio, estableciendo tres estados de dispersión (Badui, 1999):

- a) Solución verdadera (lactosa, sales, cationes, aniones y vitaminas hidrosolubles)
- b) Dispersión coloidal (proteínas caseicas y séricas)
- c) Emulsión (sustancias liposolubles)

La composición de grasa y proteína de la leche, está sujeta a un alto grado de variación debido a diversos factores tanto nutricionales: valor energético y composición de la ración; como no nutricionales: evolución durante el ciclo de la lactancia, estación del año, raza (Oldham y Sutton, 1983) y polimorfismo genético de las proteínas lácteas (Lundén *et al.*, 1997; Ng-Kwai-Hang, 1998); por tanto, no se puede establecer una composición exacta. Sin embargo, en general la composición aproximada es de: 87% de agua, 4% de grasa, 8.9% de sólidos no grasos, de los cuales 3.25% son proteínas (80% caseicas y 20% séricas), 4.6% de lactosa, 0.70% de minerales (calcio, fósforo, citrato, magnesio, potasio,

sodio, zinc, cloro, fierro, cobre, sulfatos, bicarbonatos y otros), además de ácidos orgánicos y otros compuestos misceláneos (Tabla 1).

La mayoría de los constituyentes de la leche no están presentes como moléculas individuales en solución, sino como asociaciones complejas. Las caseínas, se presentan como grandes micelas esféricas con un diámetro que varía de 40 a 300 nm; y los lípidos, como glóbulos esféricos con un diámetro de 0.1 a 15 μm (Fennema, 1996; Michalski *et al.*, 2002).

Proteínas de la Leche

Las proteínas de la leche juegan un papel preponderante en la formación del coágulo, y por consiguiente la consistencia y viscosidad del producto, guardan una relación directa con la calidad y la concentración de las mismas en el seno de la leche. Por otro lado, el contenido de grasa también es importante pues ésta es la responsable del sabor de un alimento, además de contribuir con la textura del producto terminado. En la leche se encuentran dos grupos de proteínas: las caseínas y las proteínas del suero.

Tabla 1. Composición aproximada de la leche

Componente	Promedio (%)	Rango (%)
Agua	87.10	85.3-88.7
Grasa	4.00	3.8-5.3
Sólidos no grasos	8.90	7.9-10.0
<i>Lactosa</i>	4.60	2.5-5.5
<i>Proteínas</i>	3.25	2.3-4.44
<i>Caseínas</i>	2.60	1.84-3.55
<i>Séricas</i>	0.65	0.46-0.89
Sustancias minerales	0.73	0.57-0.83
Ácidos orgánicos	0.17	0.12-0.21
Misceláneos	0.15	

Fuente: Modificado de Walstra *et al.*, 1999

Caseínas. Las caseínas son un conjunto de polipéptidos que precipitan a un pH de 4.6, por lo que se deduce que su estabilidad en el seno de la leche se debe a una carga eléctrica negativa fuerte. Esta carga se debe a que sus carboxilos se encuentran ionizados a pH 6.7, que es el correspondiente al pH de la leche. (Badui, 1999; Tamime y Robinson, 1999). El iminoácido prolina (muy abundante y distribuido homogéneamente a lo largo de la estructura primaria de las caseínas) provoca, por impedimento estérico, que no se formen hélices como estructura secundaria (Badui, 1999)

Existen 4 fracciones principales de caseínas (Cn): α_{S1} -Cn, α_{S2} -Cn, β -Cn y κ -Cn, en una proporción de 40:10:35:12 respectivamente (Fox y McSweeney, 1999). Las α_{S1} -caseínas tienen la carga eléctrica negativa más fuerte y el contenido más alto de fosfatos. Las α_{S2} -caseínas difieren de las α_{S1} -caseínas en el número de grupos fosfatos, la α_{S2} -caseínas contiene dos residuos de cisteína formando un puente disulfuro (Walstra *et al.*, 1999). El punto isoeléctrico de las α -caseínas es el más bajo, pH 4. (Amiot, 1991).

Las caseínas α y β son sensibles al ión calcio, es decir, precipitan en presencia de calcio; mientras que las caseínas κ tienen un papel estabilizante de las micelas de caseína frente al ión calcio (Amiot, 1991). Las β -caseínas son solubles a baja temperatura (2° C). Contienen menos fósforo pero son más ricas

en azufre que las α -caseínas. Tienen su punto isoeléctrico a pH 4.9 (Amiot, 1991). Contienen un gran número de residuos de prolina (Walstra *et al.*, 1999), lo que las hace tener una estructura al azar, resistente a la desnaturalización térmica (Badui, 1999).

La fracción κ , tiene una fracción muy hidrófoba y otra muy hidrófila, por lo que su mecanismo de acción es semejante al de los agentes emulsionantes que interaccionan en dos fases inmiscibles (Badui, 1999). Permanecen solubles en presencia de una alta concentración de iones calcio, precipitan junto con las otras caseínas a un pH de 4.6, son pobres en fósforo y ricas en segmentos glúcidos (Amiot, 1991).

Diversas investigaciones consideran que la calidad y concentración de las proteínas caseicas son de gran importancia en la manufactura de queso y yogur, ya que son las responsables de la formación del cuajo y el rendimiento en el queso, y de la firmeza del gel en el yogur (Caron *et al.*, 1997; Ozer *et al.*, 1999).

Todas las caseínas tienen regiones con alta hidrofobicidad por su contenido de aminoácidos aromáticos o alifáticos (triptofano, fenilalanina y tirosina). Además de una carga neta negativa fuerte de los ácidos aspártico y glutámico, estos factores son los que determinan su estabilidad y al mismo tiempo su

solubilidad (Badui, 1999). La fracción de caseína en unión con iones calcio, fosfato y citratos, se encuentra en la leche formando grandes complejos coloidales llamados micelas. Estas micelas han sido reconocidas como el componente de la leche más importante en la manufactura de yogur, ya que son las responsables de la firmeza del coágulo (Ainsworth, 1996; Caron *et al.*, 1997; Fennema, 1996; Ozer *et al.*, 1999).

Séricas. Las proteínas del suero son compactas, globulares, solubles en un amplio rango de pH. Estas proteínas constan de ocho fracciones, donde en orden de importancia, destacan la β -lactoglobulina (β -lg), la α -lactalbúmina (α -la), las inmunoglobulinas, la seroalbúmina y las proteosa-peptonas.

La β -lg es la proteína más abundante, es insoluble en agua destilada, soluble en soluciones salinas diluidas y precipita con altas temperaturas y por la acción de soluciones de sulfato de magnesio o amonio al 50%. Tiene carga neta negativa al pH de la leche, sin embargo su mecanismo de estabilidad es por hidratación y no por carga eléctrica. Sus propiedades funcionales mejoran tras el tratamiento térmico, pues al desnaturalizarse, reacciona con las caseínas formando micelas más estables (Fennema, 1996; Tamime y Robinson, 1999).

La β -lg representa aproximadamente el 45% del total de las proteínas del suero de la leche y contribuye de manera importante en la estabilidad térmica de los productos lácteos. En el pH de la leche, existe como dímero unido no covalentemente, los cambios de pH hacen que se convierta en dos monómeros mediante una reacción reversible (Badui, 1999). Los aminoácidos hidrófilos, los hidrófobos y los ionizables están homogéneamente distribuidos a lo largo de la molécula de β -lg, provocando que los aminoácidos no polares, tiendan a unirse dentro de la molécula estableciendo una hidrofobicidad elevada en el centro; esto ocasiona una fuerte hidratación en el exterior impidiendo que se unan entre ellas de manera hidrófoba (Badui, 1999).

La segunda proteína en orden de importancia es la α -la, tiene actividad biológica ya que es parte constitutiva del sistema enzimático requerido para la síntesis de lactosa, por lo que también se conoce como proteína B de dicho sistema. No contiene sulfhidrilos libres, pero si cuatro disulfuros provenientes de cistinas, lo que la hace tener 2.5 veces más azufre que las caseínas. Entre sus características se cuentan su bajo peso molecular y su alto contenido de triptófano (Badui, 1999)

Por otro lado, las inmunoglobulinas suman aproximadamente el 10% del total de las proteínas del suero; provienen de la sangre del animal, constan de

moléculas de glucoproteínas con un alto contenido de grupos azufrados y con actividad biológica de anticuerpo. Su importancia tecnológica radica en que son componentes importantes de las membranas del glóbulo de grasa, promotoras del fenómeno de cremado de la leche y contribuyen a las propiedades antibacterianas naturales de la leche que no ha sido sometida a tratamiento térmico (Badui, 1999)

La fracción albúmina bovina contiene un alto número de cistinas y un grupo sulfhidrilo libre, es fácilmente desnaturizable aún a bajas temperaturas. Por su parte las proteosas-peptonas están compuestas por un grupo heterogéneo de fosfoglicoproteínas de pesos moleculares que varían de 4 000 a 200 000 daltones (Badui, 1999)

Formación y Estabilidad de las Micelas de Caseína

Las caseínas no están presentes en solución, sino formando estructuras llamadas micelas (Fig. 2). Las micelas son grandes agregados de las cuatro fracciones de caseínas, fosfato de calcio y pequeñas cantidades de magnesio,

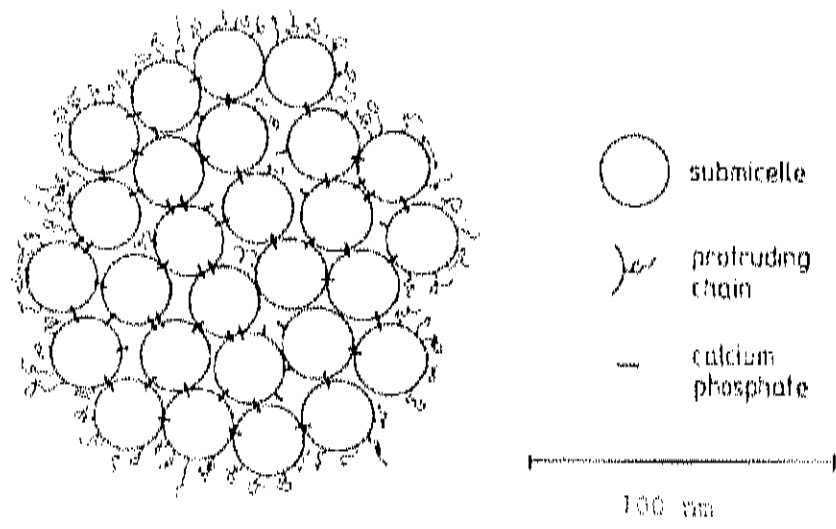


Fig 2. Micela de caseína. Fuente: Walstra , 1990

sodio, potasio y citrato (Fox, 1992). Aunque la estructura de las micelas no está bien establecida todavía, se piensa que están formadas de partículas más pequeñas llamadas submicelas, unidas entre sí por puentes salinos (formados por el fosfato de calcio coloidal), interacciones hidrófobas y puentes de hidrógeno (Fox y McSweeney, 1999). No todas las submicelas son iguales, esencialmente hay dos tipos: con y sin κ -caseína. Las submicelas con κ -caseína se encuentran en el exterior de la micela, mientras que las otras se encuentran en el interior de ésta. La parte hidrofílica de la κ -caseína se orienta hacia afuera de la micela en forma de cabellos flexibles, estos cabellos proveen estabilidad a la micela impidiendo, por repulsión estérica, su agregación (Walstra, 1990)

El modelo micelar para explicar la distribución de las caseínas en la leche ha evolucionado a través de muchos años y varios autores han contribuido a él, especialmente Schmidt y Payens (Walstra *et al.*, 1999). Existen diversos factores que pueden desestabilizar a las micelas:

pH. A pH bajo (5.3), el fosfato de calcio se disuelve, causando la disociación de las moléculas de caseína. (Singh *et al.*, 1996). Por otro lado, un decremento del pH reduce las fuerzas de repulsión y permite interacciones hidrofóbicas provocando la coagulación de las micelas (Tamime y Robinson, 1999).

Temperatura. La β -caseína se disocia de la micela a bajas temperaturas, por lo que se asume que las fuerzas que la mantienen en la micela son interacciones hidrófobas (Badui, 1999).

Tratamiento térmico. Las temperaturas de pasteurización causan desnaturalización irreversible de la β -lactoglobulina, con una subsecuente interacción con κ -caseína, lo que altera la estabilidad de la micela (Fennema, 1996)

Contenido de sales Las proteínas coloidales de la leche están cargadas negativamente, cualquier incremento de iones negativos tiene como efecto aumentar su estabilidad, mientras que el efecto de aumentar los iones de calcio divalentes, neutraliza las cargas negativas y en consecuencia, tiene un efecto desestabilizante sobre las proteínas (Amiot, 1991).

Sales y Minerales

Los componentes minerales de la leche se encuentran en su mayoría en forma de sales solubles. Los principales elementos básicos, como el calcio, potasio, magnesio y sodio forman sales con los elementos ácidos: proteínas, ácido cítrico, fosfatos y cloro. Una parte de los minerales se encuentra en forma

coloidal asociada con las caseínas; este es el caso de los fosfatos y citratos de calcio y magnesio (Amiot, 1991)

El contenido de calcio (117.7 gr/100 gr) es superior a la concentración de saturación de una solución acuosa, esto se debe a que un 69% se encuentra en forma coloidal, unidos a las caseínas y el resto (31%) se localiza soluble en el suero (Badui, 1999). La leche también contiene fosfato orgánico, el cual está unido covalentemente a las cadenas peptídicas como residuos de fosfoserina (Lucey y Fox, 1993)

La estabilidad de las proteínas de la leche depende en gran parte del equilibrio iónico en la leche. Los componentes salinos que tienen mayor interés tecnológico son los fosfatos y citratos de calcio, debido a su importancia relativa y a la inestabilidad de sus equilibrios (Amiot, 1991)

El equilibrio entre el calcio soluble y el coloidal depende del pH, la temperatura y la fuerza iónica (Wolfschoon-Pombo, 1997); en condiciones ácidas hay un desplazamiento del calcio coloidal al soluble que incrementa la inestabilidad de las proteínas (Badui, 1999)

La función del fosfato de calcio coloidal es mantener la integridad de las micelas de caseína, sin embargo, la naturaleza de la interacción entre este compuesto y las moléculas de caseínas está todavía en debate (Singh *et al.*, 1996).

Aspectos Tecnológicos del Yogur

Cultivos Lácticos Iniciadores y Probióticos Adjuntos

Las leches fermentadas son producidas por el crecimiento de bacterias ácido lácticas (LAB) en cantidad suficiente para producir un coágulo, dando a la leche un sabor ácido característico. Tradicionalmente el yogur es elaborado utilizando una mezcla de dos microorganismos denominados "cultivo iniciador". Estos microorganismos son *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* y se adicionan en una proporción 2:3 (Spreer, 1995).

Estas bacterias poseen una enzima denominada lactato deshidrogenasa, con la cual metabolizan la lactosa para obtener energía y poder mantener su ciclo de vida. Asimismo, requieren de nitrógeno que obtienen de las proteínas lácteas mediante una actividad proteolítica, donde muestran un efecto sinergista.

L. bulgaricus tiene mayor actividad proteolítica y puede hidrolizar la caseína, mientras que *S. thermophilus* puede hidrolizar los péptidos intermedios liberados por la hidrólisis de la caseína (Abu-Tarboush, 1996; Sha, 2001).

L. bulgaricus estimula el crecimiento de *S. thermophilus* al liberar algunos aminoácidos como valina, histidina, metionina, ácido glutámico y leucina. Por otro lado, *S. thermophilus* produce otros compuestos como péptidos, purina, pirimidina, CO₂, ácido fórmico, oxalacético y fumárico que estimula el crecimiento de *L. bulgaricus*. Se sabe que *L. bulgaricus* tiene preferencia por la β -caseína como fuente de nitrógeno, por lo que el tipo de proteína es un factor importante en el crecimiento del cultivo (Abu-Tarboush, 1996).

Paralelamente al cultivo iniciador, se adicionan cultivos probióticos para darle valor agregado al producto a la vez que se mejoran sus propiedades terapéuticas y sensoriales (Gomes y Malcata, 1999; Saxelin *et al.*, 1999). Las bacterias denominadas probióticas y sus beneficios a la salud han sido ampliamente estudiadas (Elmer, 2001; Hirayama y Rafter, 2000; Hollingsworth, 2001; Kailasapathy y Chin, 2000; Klaenhammer, 2000; Robertfroid, 2000; Sanders, 1999; Shah, 2001; Wollowski *et al.*, 2001). Sin embargo, se han realizado pocos trabajos en relación con su importancia en la tecnología de las leches fermentadas, que son tradicionalmente el vehículo para la ingestión de

estos microorganismos (Gomes y Malcata, 1999; Saxelin *et al.*, 1999). Estos trabajos han estudiado el efecto de los cultivos probióticos en las características de textura de los productos fermentados, reportando que disminuye la firmeza y se mejora la susceptibilidad a la sinéresis de manera natural (Gomes y Malcata, 1999; Saxelin *et al.*, 1999). Por otro lado, también se ha visto que los cultivos probióticos crecen muy lentamente en la leche y que cuando se utilizan como cultivos iniciadores, producen compuestos que modifican el sabor, dando como consecuencia una limitada aceptabilidad por parte del consumidor. Asimismo, se ha visto que la sobrevivencia que presentan es muy pobre (Gardini *et al.*, 1999; Davidson *et al.*, 2000; Sodini *et al.*, 2002)

Los probióticos se utilizan combinados, y se ha visto que una combinación muy eficiente es *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium longum*. Estos microorganismos presentan efecto sinergista entre sí, al igual que lo hacen los utilizados en el cultivo iniciador. Se ha observado que entre el cultivo iniciador y el probiótico se da un efecto antagonista que impacta en su viabilidad, lo cual es un aspecto importante a cuidar pues de ello dependen los beneficios terapéuticos atribuidos (Kailasapathy y Ribka, 1997; Gardini *et al.*, 1999; Adhikari *et al.*, 2000; Davidson *et al.*, 2000; Kailasapathy y Chin, 2000; Suita-Cruce y Goulet, 2001)

Tecnología del Yogur y Calidad del Producto Terminado

La tecnología en la elaboración del yogur no ha cambiado a través del tiempo, y se puede resumir de la siguiente manera: 1) concentración o aumento del contenido de extracto seco hasta valores de 14-16%, 2) pasteurización de la leche, 3) siembra de la leche con un cultivo iniciador, 4) incubación, 5) refrigeración y 6) envasado (Tamime y Robinson, 1999).

En el proceso del yogur, se produce una disminución del pH debido a la fermentación de la lactosa, la cual es convertida por el cultivo iniciador, en ácido láctico (Gastaldi et al., 1997). Esta disminución del pH trae como consecuencia la formación de un coágulo ligero y uniforme. El coágulo formado en el yogur consiste de una matriz proteica de cadena micelar corta o media y agregados de complejos micelas-proteínas del suero, que atrapa todos los demás constituyentes incluyendo la fase acuosa (Montilla *et al.*, 1995; Tamime y Robinson, 1999). La evolución del coágulo varía según va decreciendo el pH y cuando éste baja a 5.35, la leche alcanza una viscosidad suficiente para detener por completo el movimiento de los microorganismos y la caseína se observa como grandes agregados de micelas (Hassan *et al.*, 1996). Las características finales del producto se obtienen a un pH de 4.2-4.7 (Adhikari *et al.*, 2000)

La velocidad de acidificación del producto es muy importante, pues se ha visto que existe una relación entre la velocidad de acidificación y la textura. Un producto final con una viscosidad elevada, está relacionado con tiempo largo de acidificación, lo cual indica un efecto positivo en la textura desarrollada, independientemente del pH final y la temperatura (Beal *et al.*, 1999). Sin embargo, también se ha encontrado que una acidificación lenta puede hacer el gel más susceptible a la sinéresis (Tamime y Robinson, 1999). La velocidad de acidificación está en función de la temperatura de incubación, la cual puede ser de 44°C durante 6 h ó 30°C durante 24 h (Moreira *et al.*, 2000)

Durante el tratamiento térmico (85 °C por 30 min ó 90 a 95 °C por 5 min), se desnaturaliza el 60-90% de las proteínas del suero exponiendo sus radicales -SH y por tanto existe una tendencia de unirse a las caseínas mediante puentes disulfuro (Waungana *et al.*, 1996). Esta interacción hace que el coágulo sea más firme, uniforme y estable; dando mejor consistencia al producto terminado (Montilla *et al.*, 1995; Dave y Shah, 1998; Keogh y O'Kennedy, 1998, Lucey *et al.*, 1998; Harte *et al.*, 2002). Por otro lado, al adicionar sólidos se incrementa la concentración de sólidos totales en la leche y hay más material disponible para la formación de la red tridimensional, provocando un incremento en la densidad de la matriz que forma el coágulo. Si se observa el coágulo con un microscopio electrónico de barrido, se aprecia que la red es más uniforme y con poros más

pequeños, lo cual también contribuye a la firmeza y reduce la expulsión de suero (Gastaldi *et al.*, 1997; Lucey, 2002).

Por otro lado, el cultivo iniciador además de ser el responsable del sabor y aroma característicos del yogur, también influye en la viscosidad del producto terminado. Esto es debido a que ciertas cepas de LAB tienen la habilidad de formar polímeros conocidos como exopolisacáridos (EPS). Los EPS tienen forma de filamento y conectan la superficie de la bacteria con la red de caseína. Este efecto resulta en un producto más viscoso, dependiendo de la cantidad de polímero producida (Beal *et al.*, 1999; Frengova *et al.*, 2000; Hess *et al.*, 1997; Moreira *et al.*, 2000)

Defectos Principales y Uso de Estabilizantes

Uno de los defectos más difíciles de controlar en el yogur, es la alteración de sus propiedades reológicas, debido a un fenómeno denominado sinéresis. Este fenómeno es consecuencia de un re-arreglo molecular en la estructura gelificada, que provoca la expulsión de suero, mermando también con esto el rendimiento. Es por esto, que durante la elaboración del yogur también se

adicionan sólidos de leche para incrementar el contenido de sólidos totales y con esto mejorar la reología del gel (Tamime y Robinson, 1999).

Aunque la legislación no permite el uso de estabilizantes en el yogur natural, la mayoría de las industrias dedicadas a la elaboración de este producto recurren a ellos. Esto, muchas veces sirve para enmascarar algunas deficiencias en el proceso o en la calidad de la materia prima utilizada, lo cual afectarían negativamente la textura final. Esta sinergia sólidos-estabilizantes, resulta en un producto más estable y de mejor consistencia, pero con un costo más elevado (Lucey, 2002)

Los estabilizantes empleados para mejorar las propiedades reológicas del yogur se conocen como gomas o hidrocoloides, y son moléculas con alta capacidad de retención de agua. Esto las hace de gran utilidad en la elaboración de algunos productos lácteos como el yogur, donde su función es estabilizar la consistencia e impedir la sinéresis del coágulo. Algunos de los hidrocoloides comúnmente utilizados en la industria láctea son alginatos, agar-agar, carragenatos, gomas naturales y sintéticas, almidones modificados y pectinas (Chavarría, 1999)

Polimorfismo Genético de las Proteínas Lácteas

Desde 1955, se ha encontrado que las proteínas de la leche presentan polimorfismo genético (PG). El PG se debe a una serie de mutaciones que causan cambios en la secuencia de nucleótidos de un gen particular y que por lo tanto, resulta en una variación de la secuencia de aminoácidos. Esta variación puede ser de dos tipos, por eliminación de una secuencia de aminoácidos (α_{s1} -Cn A y la α_{s2} -Cn D) o por sustitución de aminoácidos (variantes genéticas restantes) a lo largo de la cadena proteica.

El PG de las proteínas de la leche, implica una alteración de sus propiedades funcionales; tales propiedades dependen del arreglo lineal de los aminoácidos, lo cual les confiere una estructura primaria única. Esta variación en la secuencia de aminoácidos de las diferentes variantes, provoca modificaciones en la carga neta, hidrofobicidad y grado de fosforilación y glicosilación de la proteína, por lo que esto podría explicar parcialmente los cambios en las propiedades funcionales de las variantes genéticas (VG) de una misma proteína (Ng-Kwai-Hang y Grosclaude, 1992).

Las VG se designan por las letras: A, B ó C. Existen individuos homocigotos (AA, BB ó CC), que producen una sola variante, sin embargo, también hay individuos heterocigotos que contienen una mezcla de dos

variantes, por ejemplo AB, AC, BC, etc. (Ng-Kwai-Hang y Grosclaude, 1992; Trujillo *et al.*, 1998)

Variantes Genéticas Presentes en la Leche de Bovino

Se ha encontrado que tanto las proteínas del suero como las caseínas presentan PG. Desde 1955 a la fecha, se conocen treinta VG para las seis proteínas de la leche, pero no todas se presentan con la misma frecuencia (Tabla 2). Las VG más comunes para la β -Lg y la α -La, son la A y la B; mientras que para las caseínas son α_{s1} -Cn B y C; β -Cn A₁, A₂, A₃ y B y κ -Cn A y B. (Ng-Kwai-Hang 1998, Zappacosta *et al.*, 1998).

Variantes Genéticas de la β -Lactoglobulina

Desde el descubrimiento de las variantes A y B de la β -Lg por Aschaffenburg y Drewry en 1955, se han identificado hasta hoy 7 VG's para la β -lg (A, B, C, D, E, F, G). De las VG's más comunes para la β -Lg (A y B), la variante A presenta una frecuencia del 30% para ganado Jersey y 28% para ganado Holstein-Friesian, mientras que la B se observa con una frecuencia del 62% y 72% respectivamente. También se ha encontrado la variante C, y ésta se

Tabla 2. Variantes genéticas para los seis grupos principales de proteínas de la leche.

α_{s1} -Cn (199)	α_{s2} -Cn (207)	β -Cn (209)	κ -Cn (169)	β -Lg (162)	α -La (123)
A	A	A ¹	A	A	A
B	B	A ²	B	B	B
C	C	A ³	C	C	C
D	D	B	E	D	
E		C		E	
		D		F	
		E		G	

^a Los números entre paréntesis indican el número total de residuos en la proteína. **Fuente:** Modificado de Fox, 1992

presenta con una frecuencia del 8% en el ganado Jersey. A pesar de ser mínimas las diferencias en la estructura primaria de las variantes, éstas influyen en su susceptibilidad a la desnaturalización y a la proteólisis. Como puede observarse en la Tabla 3, los cambios en las variantes A, B y C se presentan en los residuos 59, 64 y 118 (Bewley *et al.*, 1997).

Polimorfismo Genético y su Relación con la Composición de la Leche

Los principales constituyentes de la leche que se ven modificados por la presencia de las VG son el contenido de proteína y grasa. Estos dos constituyentes son muy importantes para impartir características físicas idóneas a productos como queso y yogur. Estas características son esencialmente firmeza de coágulo, retención de agua y menor susceptibilidad a la sinéresis.

La α_{s1} -Cn BC y la κ -CnB se han relacionado con un alto contenido de grasa, mientras que no se ha encontrado asociación alguna entre las variantes de la β -Cn y este constituyente. En cuanto a la β -Lg, se ha encontrado que la variante B está asociada a un mayor contenido de grasa respecto a la variante A (Aleandri *et al.*, 1990; Ng-Kwai-Hang, 1998; Walsh *et al.*, 1998). Ng-Kwai-Hang *et al.*, (1986) y Bovenhuis *et al.* (1992), encontraron que el contenido más alto

Tabla 3. Diferencias en los aminoácidos de las variantes A, B y C de la β -lg.

Variante	Sitio		
	59	64	118
A	Gln	Asp	Val
B	Gln	Gly	Ala
C	His	Gly	Ala

Fuente: Bewley *et al.*, 1997

de grasa se relacionó con los fenotipos α_{s1} -Cn BC, β -Cn A₁B, κ -Cn BB y β -Lg BB. En 1997, Mayer *et al.* hicieron un estudio con distintas combinaciones de fenotipos y encontraron que para las leches que presentaban una combinación de los fenotipos α_{s1} -Cn BB/ β -Cn A₂B/ κ -Cn AA/ β -Lg AA se registró el contenido más alto de grasa.

En cuanto al contenido de proteína, se ha relacionado a la β -Lg BB, κ -Cn BB y AB, con un alto contenido de caseínas (Hill, 1993; Lundén *et al.*, 1997; Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1987; Walsh *et al.*, 1998), pero con un menor contenido de proteína total (Ng-Kwai-Hang, 1998). Otros fenotipos relacionados con un alto nivel de proteína son α_{s1} -Cn BC, β -Cn A₁B y κ -Cn BB (Aleandri *et al.*, 1990; Bovenhuis *et al.*, 1992; Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986). Por otro lado, las combinaciones α_{s1} -Cn BB/ β -CN A₂A₂/ κ -Cn AA/ β -Lg BB y α_{s1} -Cn BB/ β -Cn A₂B/ κ -Cn BB/ β -Lg AA se relacionan con un alto contenido de proteínas totales, mientras que la combinación α_{s1} -Cn BB/ β -Cn A₂B/ κ -Cn AA/ β -Lg AA resulta en un mayor contenido de proteínas del suero (Mayer *et al.*, 1997; Olguín, 2001)

También se han relacionado las VG con la distribución del tamaño de las micelas. Los estudios respecto a este punto han concluido que las micelas de las leches que contienen la variante α_{s1} -Cn A tienen una distribución de tamaño más amplio que las que contienen α_{s1} -Cn B. Esto da lugar a que en el seno de la

leche exista un mayor número de micelas, lo que sería indicativo de una mejor capacidad de hidratación (Anema y Creamer, 1993).

Polimorfismo Genético y su Relación con las Propiedades de Coagulación

La capacidad que presentan las proteínas para coagularse se ve afectada por la proporción y cantidad en que se encuentren sus constituyentes. Al evaluar las propiedades de coagulación, se toman en cuenta dos factores: velocidad y grado de coagulación de la leche y las características del cuajo formado. En el caso del queso, estos factores influyen en la firmeza y en el rendimiento de la cuajada resultante. Se estima que una cuajada formada en menor tiempo es de mayor firmeza que una cuajada de formación lenta, pues ésta última resulta de consistencia más suave.

Las propiedades de coagulación en la elaboración de queso están más relacionadas con el contenido de caseína que con la estructura de la proteína en sí. Por ello, sería de esperarse que la variante β -Lg B proporcionara mejores propiedades de coagulación pues está asociada a un mayor contenido de caseína y a un alto contenido de grasa. Sin embargo, los estudios respecto a este punto son contradictorios, pues mientras que algunos han encontrado que

es la variante A la que se relaciona con mejores propiedades de coagulación (Marziali y Ng-Kwai-Hang, 1986a; Ng-Kwai-Hang, 1998), Castellanos (2002) encontró que las leches con la variante B presentaban las mejores propiedades de coagulación y rendimiento quesero.

De casi todos los estudios se desprende que las VG que se relacionan con mejores propiedades de coagulación en queso son κ -Cn BB y β -Cn A₁A₁ y β -Lg AA. Mientras que las que se asocian a un mayor rendimiento son β -Lg B y κ -Cn B (Aleandri *et al.*, 1990; Marziali y Ng-Kwai-Hang, 1986b; Mayer *et al.*, 1997; Ng-Kwai-Hang, 1998; Walsh *et al.*, 1998)

Se estudió el efecto de las VG de la κ -Cn en geles inducidos por calentamiento y se encontró que la sinéresis fue mayor en el que contenía la variante κ -Cn BB respecto a la κ -Cn AA. Por otro lado se ha visto que un yogur preparado con κ -Cn BB presenta un menor nivel de separación de suero. La viscosidad y la capacidad de retención de agua en leches fermentadas, se mejora con las variantes κ -Cn AB y α_{s1} -Cn BB. En cuanto a la β -Lg, la sinéresis es menor con β -Lg BB y también se ha observado que la consistencia y viscosidad de las leches fermentadas es superior con la presencia de esta variante (FitzGerald y Hill, 1997).

En 1998, se realizó un estudio donde se evaluaron las propiedades reológicas de geles inducidos por acidificación con glucono- δ -lactona. Estos geles fueron preparados a partir de las variantes más comunes para la β -Lg (fenotipos A y B) y la κ -Cn (fenotipos A y B). El estudio confirma hallazgos anteriores, donde la β -Lg BB proporciona un gel más estable y de mejor consistencia. Por otro lado, en este estudio se encontró que las VG de la κ -Cn no tuvieron efecto sobre la firmeza del gel (Allimere *et al.*, 1998)

Principios de Estadística Multivariada

Análisis de Correlación Canónica

Parte de la Estadística Multivariada que investiga la relación entre dos grupos de variables y se utiliza cuando se analiza un gran número de variables independientes y dependientes simultáneamente, es particularmente apropiado cuando las variables dependientes se relacionan entre ellas mismas. En el Análisis de Correlación Canónica un grupo de variables Y son simultáneamente relacionadas a un grupo de variables X (Dillon y Goldstein, 1984).

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección del Cultivo para la Preparación del Yogur

Cultivos

Se utilizaron tres cultivos comerciales (Chr. Hansen, México): CT (YC-X11) que contiene cultivo iniciador tradicional (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), CP 1 (ABY 1) que, al igual que el CP 2 (ABY 2), contienen cultivo iniciador más microorganismos probióticos, *Bifidobacterium* BB-12 y *Lactobacillus acidophilus* LA-5. Los cultivos se adquirieron en la presentación de cultivos liofilizados y la inoculación fue directa.

Preparación de los Sólidos de Leche

Se utilizó leche pasteurizada comercial, al 2% de grasa. Los sólidos se obtuvieron por liofilización en un liofilizador de charolas marca Virtis con descongelación rápida y cámara para 600 L.

Preparación del Yogur

Se utilizó leche fresca de la ordeña matutina de un establo situado en Hermosillo, Sonora, México. La leche se calentó a 65 °C y se homogeneizó con un Braun Multipractic durante 2 min, posteriormente se sometió a un proceso de pasteurización a 85°C durante 30 min. La leche se dividió en dos lotes de 5 L con objeto de realizar dos repeticiones del experimento. Una vez terminado el tratamiento térmico se enfrió en un congelador a -20 °C y cuando la temperatura bajó a 5 °C se refrigeró por un día a 1.5 °C.

Al día siguiente se tomó un lote y se dividió en tres partes iguales, cada parte se calentó a 55 °C y se le añadieron los sólidos liofilizados, en una proporción de 0, 1.5 y 3%, respectivamente; se homogeneizó nuevamente con un Braun Multipractic durante 20 s. Cada porción con diferente concentración de sólidos, se dividió en tres partes y una vez que la temperatura bajó a 43 °C, se procedió a inocular con los tres cultivos diferentes. Posteriormente, la leche se depositó en vasos de 125 mL y se incubó a 43 °C. La incubación se detuvo cuando el yogur alcanzó un pH de 4.4 ± 0.06 . Una vez alcanzado este pH, los vasos se transfirieron a un refrigerador manteniendo una temperatura de 7 °C hasta su análisis al siguiente día.

Composición de la Leche

Tanto la determinación de proteína como la de grasa, lactosa y sólidos totales, se realizaron utilizando los métodos oficiales de la AOAC (2000)

Análisis de Textura

Fuerza de gel. La firmeza o fuerza de gel se midió con un Analizador de Textura (TA-XT2; Stable Micro Systems, Surrey, England), utilizando una celda de extrusión en reversa (A/BE) con un disco de 35 mm y una barra de extensión. La celda de calibración fue de 5 kg. El experimento se realizó en vasos de 125 mL que contenían 100 mL de yogur. La medición fue uno a uno y se realizó inmediatamente después de retirarlos del refrigerador. El experimento consistió en medir la fuerza en compresión y se condujo a una velocidad de 1 mm/s, y a una distancia de 30 mm. La fuerza requerida para penetrar el coágulo a la distancia indicada se tomó como la fuerza de gel.

Consistencia, Adhesividad y Cohesividad. La medición de la fuerza en compresión proporcionó también otros datos como consistencia, adhesividad y cohesividad.

Susceptibilidad a la Sinéresis

La susceptibilidad a la sinéresis se determinó por diferencia de peso al eliminar el suero expulsado utilizando una pipeta Pasteur de plástico. La medición se realizó al siguiente día de almacenamiento.

Evaluación Sensorial

Nivel de Agrado. Los panelistas se seleccionaron en base a interés, tiempo y agrado por el yogur natural (n=20). Los panelistas fueron estudiantes e investigadores del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), 9 hombres y 11 mujeres, cuyas edades fluctuaban entre 21 y 35 años. Los panelistas evaluaron 9 muestras e indicaron en una escala hedónica no estructurada, el nivel de aceptación (Fig. 3).

Análisis Descriptivo. Los panelistas se seleccionaron de los participantes en la prueba de Nivel de Agrado. El criterio de selección para conformar el panel entrenado, fue aquellos que acertaron el 85% (min.), en 15 pruebas de triángulo. Una vez seleccionado el panel (2 hombres y 6 mujeres, entre 25 y 35 años), recibió un entrenamiento de 5 sesiones de 2 horas cada una, en aspectos como:

Susceptibilidad a la Sinéresis

La susceptibilidad a la sinéresis se determinó por diferencia de peso al eliminar el suero expulsado utilizando una pipeta Pasteur de plástico. La medición se realizó al siguiente día de almacenamiento.

Evaluación Sensorial

Nivel de Agrado. Los panelistas se seleccionaron en base a interés, tiempo y agrado por el yogur natural (n=20). Los panelistas fueron estudiantes e investigadores del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), 9 hombres y 11 mujeres, cuyas edades fluctuaban entre 21 y 35 años. Los panelistas evaluaron 9 muestras e indicaron en una escala hedónica no estructurada, el nivel de aceptación (Fig. 3).

Análisis Descriptivo. Los panelistas se seleccionaron de los participantes en la prueba de Nivel de Agrado. El criterio de selección para conformar el panel entrenado, fue aquellos que acertaron el 85% (min.), en 15 pruebas de triángulo. Una vez seleccionado el panel (2 hombres y 6 mujeres, entre 25 y 35 años), recibió un entrenamiento de 5 sesiones de 2 horas cada una, en aspectos como:

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO A.C.

NOMBRE: _____ FECHA: _____

INSTRUCCIONES: Pruebe la muestra e indique con una "x" su nivel de agrado, de acuerdo con la escala que se presenta a continuación. Observe que la escala va de **disgusta extremadamente** a **gusta extremadamente**

Muestra:

Disgusta
extremadamenteGusta
extremadamente

Muestra:

Disgusta
extremadamenteGusta
extremadamente

Muestra:

Disgusta
extremadamenteGusta
extremadamente

Comentarios:

Fig 3. Formato utilizado en la evaluación del nivel de agrado

acidez, sabor y aroma a yogur, firmeza, viscosidad y expulsión de suero.

Para cada atributo se utilizó un yogur comercial de referencia en algún extremo de la escala de intensidad empleada (Fig 4). La referencia usada para acidez ideal correspondió a la mitad de la escala, mientras que el parámetro ideal para firmeza, sinéresis, sabor y aroma se fijó en el límite máximo de intensidad. Durante el entrenamiento los panelistas aprendieron a evaluar cada atributo utilizando una técnica diferente, tal como se describe en la Tabla 4. Una vez entrenado el panel, se llevó a cabo un experimento donde evaluaron las muestras objeto de estudio.

El número de muestras a evaluar por sesión fue dado por un diseño experimental de bloques incompletos balanceados. Con este diseño, se evitó la fatiga del panelista pues solo evaluaron máximo 6 muestras por sesión en vez de 9 que fue el total de tratamientos en este experimento.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO A.C.

NOMBRE: _____ FECHA: _____

INSTRUCCIONES: Indique con una "x" su nivel de agrado y de percepción del estímulo para cada muestra.

Muestra:**Expulsión de suero**

Sin	Mucha
-----	-------

Firmeza

Sin	Mucha
-----	-------

Viscosidad

Sin	Mucha
-----	-------

Aroma a yogur

Sin	Mucho
-----	-------

Sabor a yogur

Sin	Mucho
-----	-------

Acidez

Sin	Mucha
-----	-------

Comentarios: _____

Fig 4. Formato utilizado en el análisis descriptivo

Tabla 4. Atributos, referencias y técnicas de evaluación utilizadas para el entrenamiento

Atributo	Referencia/Técnica
Acidez	Yogur comercial con un pH de 4.6 para acidez ideal. La percepción de acidez al paladear el alimento en la boca
Sabor a yogur	Yogur comercial como sabor ideal. La percepción del sabor a yogur al paladear el alimento en la boca
Aroma a yogur	Yogur comercial como aroma ideal. La percepción de los compuestos aromáticos al oler el alimento.
Viscosidad	Yogures comerciales para la viscosidad más baja y para la viscosidad más alta. La resistencia a fluir al cucharear el alimento.
Firmeza	Yogur comercial como firmeza ideal. El grado de esfuerzo requerido para mover una cuchara de un lado a otro de manera vertical.
Expulsión de Suero	Yogur comercial como parámetro ideal (mínima expulsión). Apreciación visual del grado de suero depositado en la superficie del alimento.

Fuente: Modificado de Drake *et al.*, 2000

pH

El pH se monitoreó utilizando un Potenciómetro Orion modelo 710^a. El monitoreo empezó después de 4 horas de incubación.

Análisis Estadístico

Se utilizaron tres diferentes concentraciones de SL añadidos (0, 1.5 y 3) y tres cultivos diferentes (tradicional, probiótico 1 y probiótico 2) en un arreglo factorial 3 x 3. El análisis estadístico de los datos se realizó aplicando un GLM ANOVA para determinar diferencias significativas ($p < 0.05$). Las diferencias se analizaron aplicando Diferencias Mínimas Significativas o LSD. El programa utilizado fue el NCSS versión 6.0

Para el análisis descriptivo (evaluación sensorial) se realizó un diseño experimental de bloques incompletos balanceados, donde los bloques fueron los panelistas. Los datos se analizaron con GLM ANOVA de dos factores para detectar diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$). Las diferencias se analizaron aplicando Diferencias Mínimas Significativas o LSD. El programa utilizado fue el NCSS versión 6.0

Polimorfismo Genético y Propiedades Reológicas del Yogur

Muestreo

Se seleccionaron 71 vacas al azar de un mismo hato de la localidad. Se tomó una muestra de leche de cada vaca (600 mL) y el manejo posterior fue individual para cada muestra. El muestreo se realizó dos veces por semana en bloques de 20 vacas cada vez. Las muestras se colocaron en recipientes limpios y fueron transportadas al laboratorio en condiciones que permitieron su conservación a 4°C.

Una vez en el laboratorio, de cada muestra se tomó un volumen de 100 ml para determinar el contenido de proteína, lactosa, sólidos totales y grasa; y otros 20 ml para identificar el fenotipo y cuantificar la VG presente. El resto de la leche se sometió a pasteurización y se destinó a la elaboración de yogur con microorganismos probióticos. Se prepararon 4 vasos por muestra de leche con el fin de realizar las mediciones reológicas y la separación de suero por duplicado.

Identificación y Cuantificación de los Fenotipos de la β -Lg

Los diferentes fenotipos de la β -lg se identificaron usando Electroforesis Capilar en Zona Libre (ECZL). Esta determinación se realizó según el método propuesto por Olguín- Arredondo y Vallejo-Córdoba (1999). Este método, a la vez que permite una separación eficiente de las proteínas del suero y los diferentes fenotipos, también permite su cuantificación.

Reactivos. Los estándares de proteína de suero de leche: β -lg A (100% pura), β -lg B (100% pura); α -La (85% pura), albúmina sérica de bovino (96% pura) y el detergente tween 20 fueron de Sigma Chemical, Co. (St. Louis, MO). El buffer de boratos (0.3 M Borate buffer, pH 8.5) con polímero modificado fue de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)

Obtención del suero. Se toman 20 mL de leche y se le adicionan gotas de HCl 4N hasta obtener un pH de 4.6 para precipitar caseínas. Se centrifuga por 15 min a 3000 x g. Se toma la muestra de suero del sobrenadante y se filtra (millipore 0.22 μ m), hasta obtener por lo menos 1 mL de muestra.

Preparación de la muestra. Diluir 1 mL de suero de leche en 4 mL de buffer de boratos a pH 8. Tomar una alícuota y vaciar en un vial de plástico.

Condiciones de corrida. Los análisis se realizaron por medio de un sistema de electroforesis capilar, HP^{3D} Capillary Electroforesis System (Hewlett-Packard, Wilmington, DE, U.S.A), equipado con un capilar no recubierto de 72 cm x 50 µm D.I. montado en un cartucho desarmable con control de temperatura a 40°C. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente y se inyectaron a presión con nitrógeno (50 mbar/s). La separación se llevó a cabo con un voltaje de 25 KV en una solución amortiguadora de buffer de boratos 50 mM con polímero modificado (0.1% de tween 20) a pH 8. Las proteínas se detectaron a 214 nm con un detector de arreglo de diodos (DAD). Entre muestra y muestra el capilar se purgó dos veces por 360 seg con una secuencia de agua bidestilada y deionizada, solución capilar limpiadora (NaOH 0.1 M), agua bidestilada deionizada y nitrógeno. Todas las soluciones se filtraron (0.22 µm).

Determinación de la Composición de la Leche

La determinación de proteína, grasa, sólidos no grasos y lactosa se llevó a cabo con un instrumento de espectrometría de infrarrojo medio Bentley 2000 (Bentley Instruments, Chasca, MN, USA), disponible en el laboratorio de la Asociación Holstein de México, A. C.

La proporción de proteína caseica/sérica se determinó por diferencia entre la proteína total y el total de proteína sérica determinada por ECZL.

Preparación del Yogur

Se llevó a cabo con la metodología descrita en la página 45, para el experimento de selección del cultivo.

Medición de las Propiedades Reológicas

La susceptibilidad a la sinéresis se determinó pesando el suero expulsado de las muestras de yogur después de 1 día de almacenamiento a 7 °C. Para medir la firmeza, consistencia, cohesividad y adhesividad del gel, se utilizó una modificación del procedimiento reportado por Hess *et al.*, (1997). Las condiciones de prueba fueron las mismas que se describieron en la página 47, para el experimento de la selección del cultivo.

pH

El pH inicial de la leche se midió utilizando un Potenciómetro Orion modelo 710A.

Análisis Estadístico de los Datos

En este estudio se aplicó un diseño completamente al azar y el análisis estadístico de los datos se realizó mediante un análisis de correlación canónica.

$$Y_1, Y_2 \dots Y_n = X_1, X_2 \dots X_n$$

Donde las *variables dependientes (Y's)* fueron: fuerza de gel, consistencia, adhesividad, cohesividad y sinéresis; y las *variables independientes (X's)*: grasa, proteína total, relación caseicas/séricas, lactosa, sólidos no grasos, fenotipo A de la β -lg, fenotipo B de la β -lg y pH inicial.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El diagrama de flujo de la Figura 5, muestra de manera esquemática el procedimiento experimental seguido en este trabajo.

Selección del Cultivo para la preparación del Yogur

Se preparó yogur a partir de leche fresca con objeto de evaluar los efectos en la textura y la estabilidad al variar el contenido de sólidos totales (ST) y utilizando tres cultivos comerciales diferentes, un cultivo tradicional (CT) (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), y dos cultivos probióticos (CP) que contienen cultivo iniciador tradicional más microorganismos probióticos (*Bifidobacterium* BB-12 y *Lactobacillus acidophilus* LA-5). Así mismo, se estudió la actividad de los cultivos utilizados en los diferentes medios. La variación del contenido de ST se logró añadiendo diferentes concentraciones de leche en polvo (0%, 1.5% y 3%).

Cabe mencionar que aunque las bacterias probióticas son del mismo tipo, la diferencia puede ser la proporción en que se encuentran cada una o el tipo de cepa. Esta información no fue proporcionada por el proveedor por ser información confidencial.

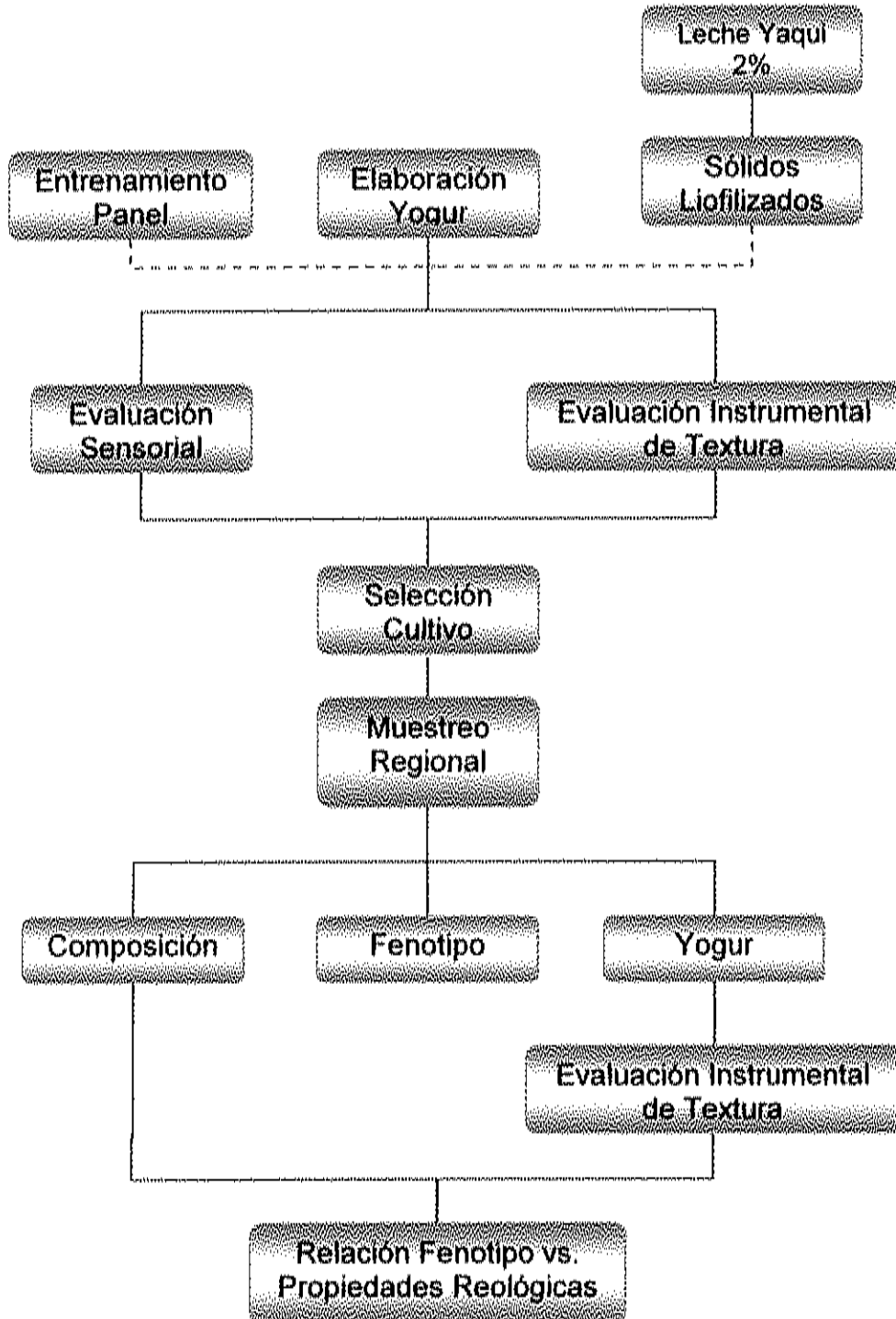


Figura 5. Diagrama de flujo del experimento.

Mediciones Instrumentales

Composición de la leche utilizada. La composición final de los sólidos añadidos, fue de 29.21% de proteína y 14.98% de grasa. Para la leche fresca fue de 12.5% de ST, 3.3% de proteína y 3.4% de grasa.

Actividad de los cultivos. Cuando se utilizó leche sin sólidos añadidos, los cultivos CT y CP 1 llegaron al pH de 4.4 en un tiempo de 8.5 h, siendo éste el menor tiempo. El cultivo CP 2 necesitó de 10.5 h para alcanzar este pH. Para la leche con 1.5 % de SL añadidos, el cultivo que presentó menor tiempo fue el CP 1, el cual requirió de 8.5 h para bajar el pH a 4.4, seguido del cultivo CT que requirió de 8.8 h y por último el CP 2 con 10 h. Cuando se añadieron 3% de SL, el tiempo requerido fue de 8 h para todos los cultivos.

La velocidad de acidificación del CT fue mayor durante las primeras 4 h de incubación, donde hubo un mayor descenso de pH (Fig. 6). Los cultivos probióticos presentaron esta actividad a partir de las 4 h de incubación y hasta las 6 h, donde el pH era casi el mismo para todos los cultivos. Sin embargo, después de este tiempo, la velocidad de acidificación fue casi igual entre todos los cultivos. Este efecto en la etapa inicial se puede explicar porque las bacterias probióticas han demostrado tener un crecimiento muy lento y una débil

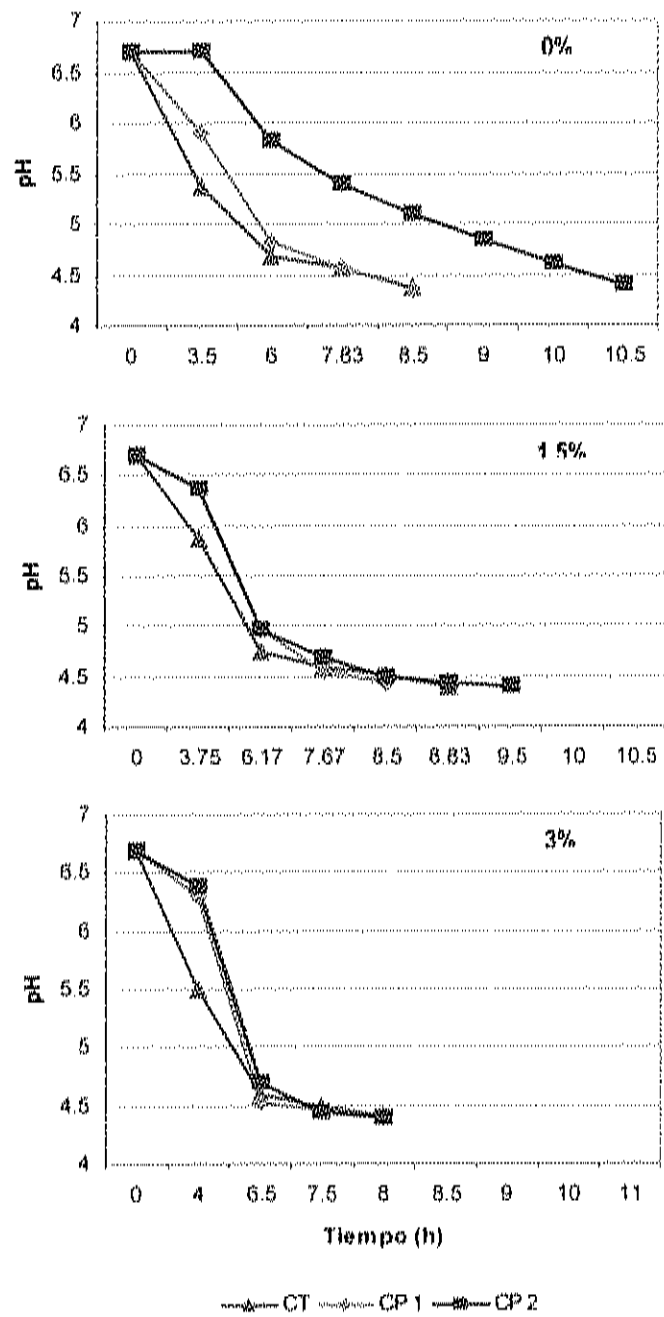


Fig 6. Efecto de la concentración de sólidos (0, 1.5 y 3%), en la actividad de un cultivo tradicional (CT) y dos cultivos probióticos (CP 1/CP 2)

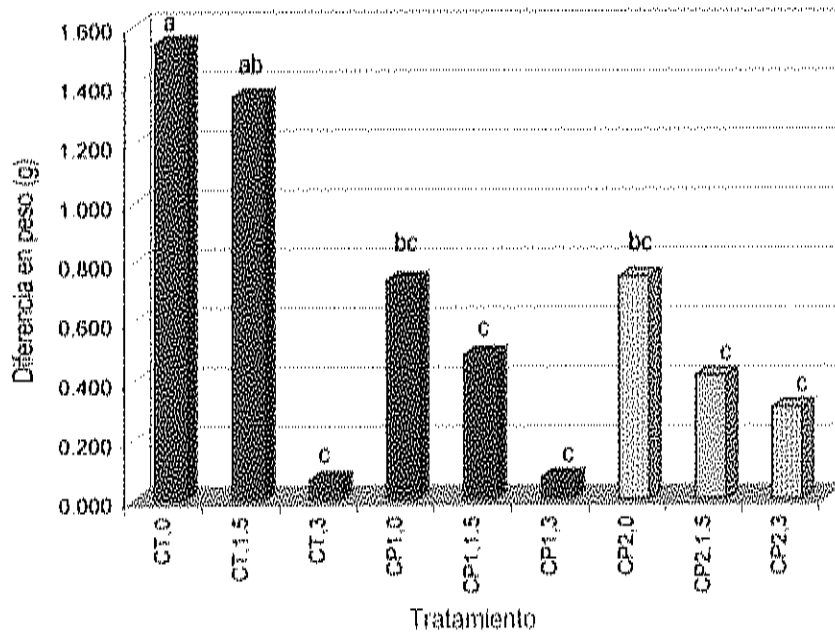
producción de ácido, así como un bajo potencial de oxido-reducción durante la primera fase de crecimiento (Gomes y Malcata, 1999).

Al añadir ST a la leche, se observa que hay un aumento en la velocidad de acidificación, lo cual puede ser resultado de una mayor disponibilidad de nutrientes para las bacterias, por lo que su proliferación se acelera y por tanto se incrementa la producción de ácido con la consecuente disminución de pH.

Sinéresis. La susceptibilidad a la sinéresis presentada por el CT fue mayor a la que presentaron los cultivos que contenían cepas probióticas (Fig 7). La expulsión de suero fue decreciendo a medida que se incrementó el contenido de sólidos en la leche, esto podría explicarse porque al adicionar proteína, se incrementa la capacidad de hidratación de la matriz que forma el coágulo (Gastaldi *et al.*, 1997), además de que se contribuye a una matriz más compacta que contiene menores cantidades de suero en sus espacios, lo que permite que exista una mejor interacción entre el suero y la superficie de las moléculas de caseína (Keogh *et al.*, 1998; Ozer *et al.*, 1999)

En el yogur con cepas probióticas, la susceptibilidad a la sinéresis fue aproximadamente de 0.75 g en la leche sin SL añadidos y no mayor de 0.31 g en la leche que contenía 3% de SL añadidos. Estos valores se encontraron por

Sinéresis



ceptibilidad a la sinéresis de yogur preparado a partir de un cultivo
 los cultivos probióticos (CP 1/CP 2), con diferentes niveles de

- día.

debajo de los valores que presentó el CT, donde la mayor expulsión de suero fue de 1.54 g para la leche sin SL y 1.36 g para la leche con 1.5% de SL añadidos.

No se encontraron diferencias significativas entre los cultivos CP1 y CP2 a cualquier concentración de sólidos (Tabla 5), pero sí con respecto a CT a niveles de 0 y 1.5% de SL añadidos.

Firmeza y Consistencia. Las curvas de fuerza en compresión (Fig 8) para el yogur con CT, presentaron un pico definido en el punto donde empezó el rompimiento del coágulo. Las curvas del yogur con CP1 ó CP2, presentaron este pico menos definido, lo cual es indicativo de una consistencia menos firme.

La Figura 8 muestra la diferencia en firmeza debido al cultivo y a la variación en el contenido de sólidos, el valor más alto corresponde al yogur elaborado a partir CT y al 3% de SL añadidos y el más bajo a CP1 al 0% de SL añadidos. Independientemente del cultivo, la firmeza se incrementó al incrementarse el contenido de ST, esto se explica porque al incrementarse el contenido de proteína, la distancia entre las micelas de caseína se acortan y las dimensiones de los espacios vacíos en el coágulo disminuyen, lo que proporciona firmeza al coágulo (Gastaldi *et al.*, 1997, Ozer *et al.*, 1999).

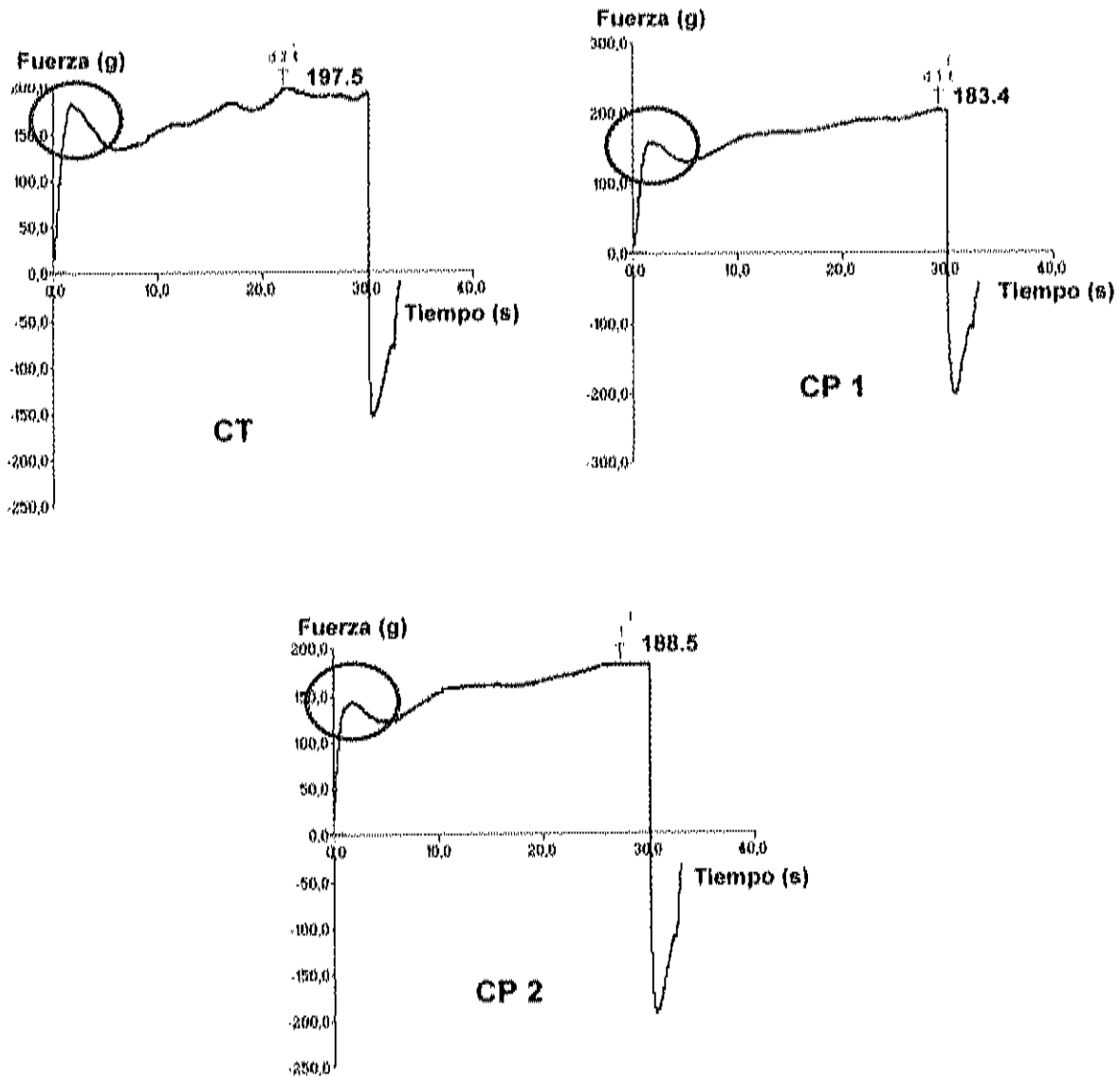


Fig 8. Curvas de fuerza en compresión de yogur preparado a partir de un cultivo tradicional (CT) y dos cultivos probióticos (CP 1/CP 2)

El yogur elaborado con CP1 no presentó diferencias significativas con respecto al elaborado con CP2 en cuanto a fuerza de gel a sus correspondientes niveles de sólidos. El adicionar mezclas que contenían cultivos probióticos redujo la firmeza del coágulo y esto podría atribuirse en parte a que su actividad es menor y por tanto necesitarían un mayor tiempo de incubación.

La tendencia de la gráfica que muestra la consistencia de los diferentes yogures (Fig 9) es similar a la de la firmeza. Por lo tanto, en este aspecto tampoco se encontraron diferencias significativas entre CP1 y CP2 a sus correspondientes niveles de sólidos (Tabla 5)

Cohesividad y Adhesividad. La cohesividad se define como la fuerza de las uniones internas que dan cuerpo al producto, mientras que la adhesividad se define como el trabajo necesario para vencer la fuerza de atracción entre la superficie del alimento y la de otro material (Giese, 1995).

La Figura 10 muestra la tendencia de los diferentes tratamientos en este experimento. La cohesividad y la adhesividad se vieron afectadas por la concentración de sólidos, a mayor concentración de éstos, mayor fue el valor obtenido. No se encontraron diferencias significativas entre CT, CP1 y CP2 (Tabla 5).

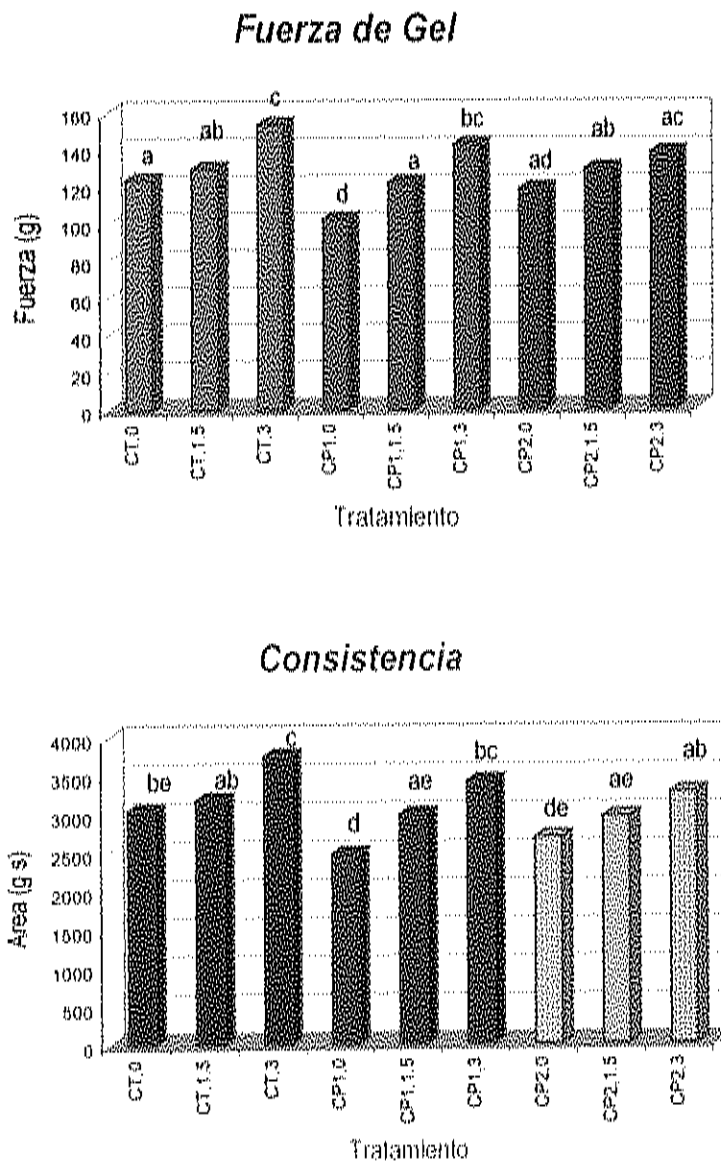


Fig 9. Firmeza y consistencia de yogur preparado a partir de un cultivo tradicional (CT) y dos cultivos probióticos (CP 1/CP 2), con diferentes niveles de sólidos añadidos 0, 1.5 y 3%.

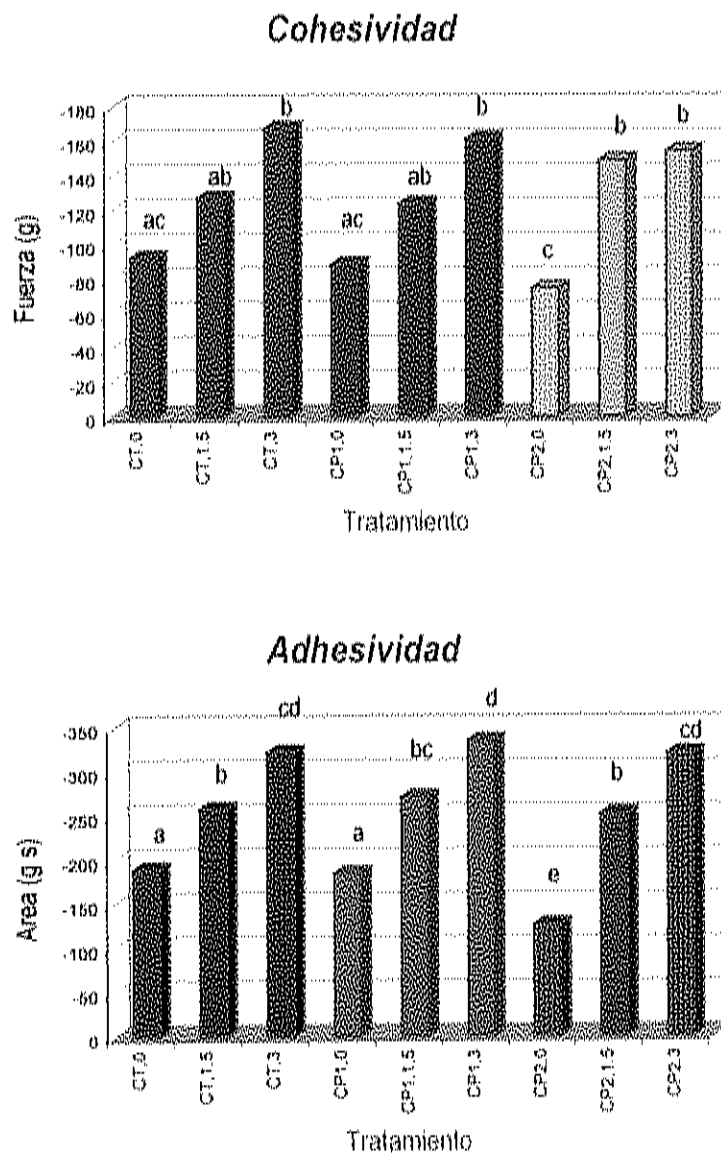


Fig 10. Cohesividad y adhesividad de yogur preparado a partir de un cultivo tradicional (CT) y dos cultivos probióticos (CP 1/CP 2), con diferentes niveles de sólidos añadidos 0, 1.5 y 3%.

Tabla 5. Mediciones instrumentales para la selección del cultivo (n=4)¹

Tratamiento	Sinéresis	Firmeza	Consistencia	Cohesividad	Adhesividad
	(g)	(g)	(g s)	(g)	(g s)
1 CT.0	1.540 ^a ± 0.616	123.97 ^a ± 2.63	3054.00 ^{ab} ± 57.07	-92.90 ^{ac} ± 6.014	-190.12 ^a ± 15.88
2 CT.1.5	1.361 ^{ab} ± 0.923	129.97 ^{ab} ± 12.40	3196.00 ^{ab} ± 339.31	-127.40 ^{ab} ± 10.17	-258.20 ^b ± 15.37
3 CT.3	0.068 ^c ± 7.210	153.77 ^c ± 7.26	3761.50 ^c ± 168.12	-167.87 ^b ± 21.65	-322.65 ^{cd} ± 51.40
4 CP1.0	0.740 ^{bc} ± 0.515	102.70 ^d ± 6.38	2483.00 ^d ± 201.35	-88.80 ^{cd} ± 23.90	-185.35 ^d ± 45.00
5 CP1.1.5	0.489 ^c ± 0.380	122.25 ^d ± 10.74	2996.00 ^{de} ± 267.11	-123.92 ^{cd} ± 8.597	-271.60 ^{bc} ± 39.07
6 CP1.3	0.075 ^c ± 8.080	142.65 ^{cd} ± 5.50	3428.00 ^{bc} ± 172.87	-161.45 ^b ± 30.33	-335.50 ^d ± 60.50
7 CP2.0	0.750 ^{bc} ± 0.370	118.70 ^{cd} ± 14.79	2695.75 ^{de} ± 289.33	-74.6 ^c ± 16.860	-126.65 ^e ± 36.87
8 CP2.1.5	0.416 ^c ± 0.555	129.47 ^{cd} ± 18.60	2960.75 ^{de} ± 339.20	-148.95 ^b ± 12.78	-252.10 ^b ± 27.08
9 CP2.3	0.308 ^c ± 0.102	138.27 ^{cd} ± 14.54	3274.00 ^{de} ± 463.24	-154.17 ^b ± 66.18	-320.92 ^{cd} ± 46.82

¹Valores seguidos por la misma literal, no indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05)

Evaluación Sensorial

Nivel de Agrado. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en el nivel de agrado. El yogur se presentó previamente batido y los panelistas, quienes eran consumidores regulares de este alimento, no tuvieron preferencias entre los diferentes tratamientos. Por lo tanto, esta prueba no aportó ningún criterio para la selección del cultivo a utilizarse en la siguiente fase del experimento.

Habilidad del Panel Entrenado. Una vez entrenado el panel, se llevó a cabo un experimento donde evaluaron las muestras objeto de estudio y el final del entrenamiento estuvo dado por un Análisis de Varianza, donde no se encontraron diferencias significativas entre panelistas para todos y cada uno de los atributos (Tabla 6). Se eliminó 1 panelista ya que sus respuestas se encontraban fuera de la media general, lo cual provocaba diferencias entre panelistas.

Tabla 6. Análisis de varianza que muestra la habilidad de los panelistas.

Sinéresis

Fuente Variable	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculada	Nivel de Prob.
A: Panelista	11	50.59958	4.599962	0.73	0.703393
B: Tratamiento	8	406.81133	50.85142	8.09	0.000001*
Error	52	326.9317	6.287148		
Total	72				

* Término significativo a $p < 0.05$

Firmeza

Fuente Variable	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculada	Nivel de Prob.
A: Panelista	11	63.13654	5.739685	1.78	0.081365
B: Tratamiento	8	745.8737	93.23421	28.95	0.000000*
Error	52	187.473	3.220634		
Total	72				

* Término significativo a $p < 0.05$

Viscosidad

Fuente Variable	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculada	Nivel de Prob.
A: Panelista	11	4.25212	0.386564	0.47	0.511581
B: Tratamiento	8	677.4417	84.68021	103.62	0.000000*
Error	52	42.49663	0.8172429		
Total	72				

* Término significativo a $p < 0.05$

Aroma

Fuente Variable	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculada	Nivel de Prob.
A: Panelista	11	6.187417	0.562197	0.8	0.637195
B: Tratamiento	8	122.1553	15.26942	22.06	0.000000*
Error	52	35.98833	0.6920449		
Total	72				

* Término significativo a $p < 0.05$

Sabor

Fuente Variable	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculada	Nivel de Prob.
A: Panelista	11	40.83376	3.71216	1.27	0.267025
B: Tratamiento	8	137.0613	17.13141	5.67	0.000024*
Error	52	151.8287	2.919784		
Total	72				

* Término significativo a $p < 0.05$

Acidez

Fuente Variable	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculada	Nivel de Prob.
A: Panelista	11	65.98379	5.998435	1.23	0.291828
B: Tratamiento	8	128.2084	16.02605	3.28	0.004170*
Error	52	253.71	4.879038		
Total	72				

* Término significativo a $p < 0.05$

Sinéresis. Independientemente del cultivo el tratamiento que presentó mayor expulsión de suero fue aquel al que no se le añadieron sólidos de leche. El comportamiento de este fenómeno en función del contenido de ST, confirma hallazgos anteriores que indican que la sinéresis disminuye al incrementarse el contenido de ST (Keogh *et al.*, 1998; Ozer *et al.*, 1999).

El tratamiento que presentó el menor grado de sinéresis fue donde se utilizó el CP1 con 3% de sólidos añadidos. Este tratamiento no presentó diferencias significativas con el CT al 3% de sólidos añadidos ni con CP2 al 3% de sólidos añadidos. Sin embargo CP1 y CP2 mostraron diferencias significativas a 0% de SL. Estos datos se muestran en la Tabla 7 y las tendencias de los diferentes tratamientos se pueden observar en la Fig 10.

Firmeza. La Fig 11 muestra que independientemente del cultivo, la firmeza se incrementó al incrementarse el contenido de ST, esto concuerda con los resultados obtenidos por Gastaldi *et al.* en 1997. El tratamiento que presenta la mayor calificación para la fuerza de gel es el CT al 3% de sólidos añadidos. Sin embargo, como se puede observar en la Tabla 7 no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos a sus correspondientes niveles de sólidos.

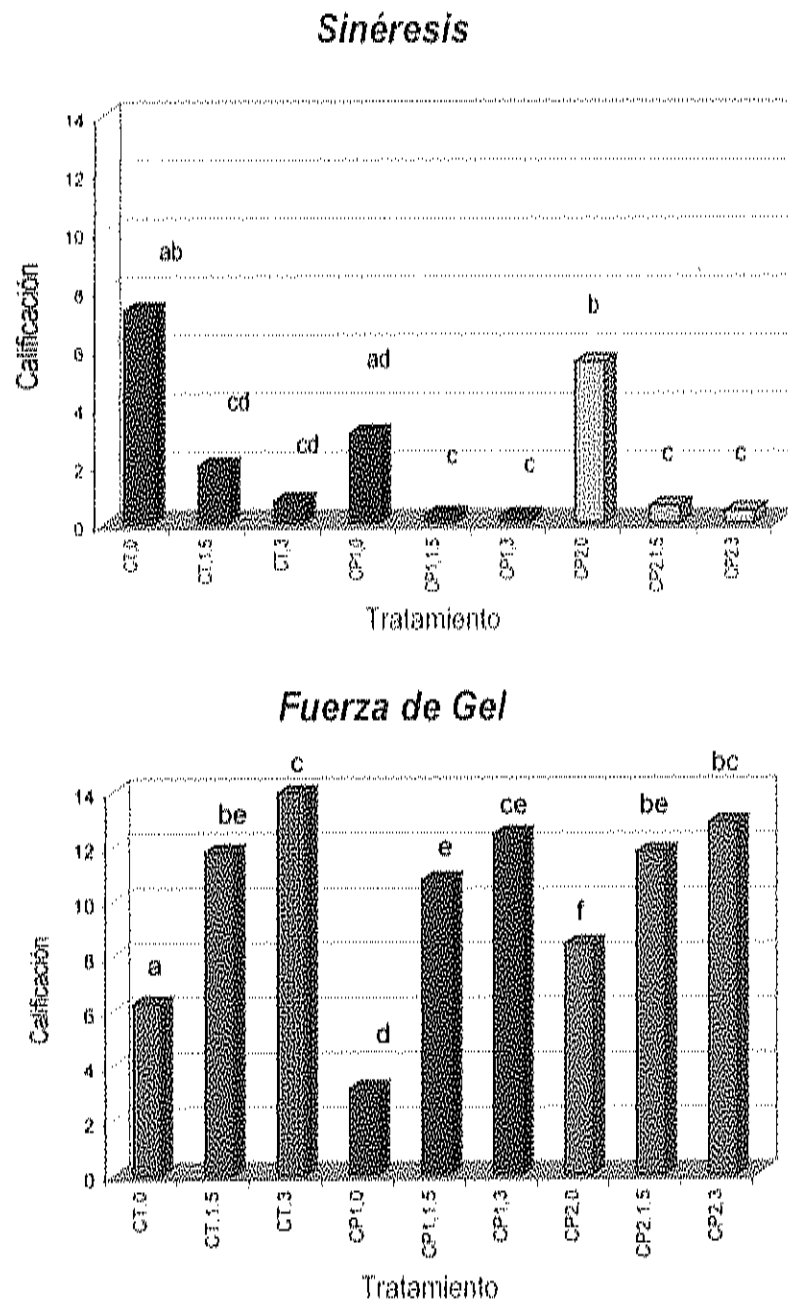


Fig 11. Análisis descriptivo por un panel entrenado de la sinéresis y la firmeza de yogur preparado a partir de un cultivo tradicional (CT) y dos cultivos probióticos (CP 1/CP 2), con diferentes niveles de sólidos añadidos 0, 1.5 y 3%.

Viscosidad. Al adicionar los cultivos con cepas probióticas se incrementó la viscosidad del alimento, esto se puede observar claramente en la Figura 12. Este comportamiento puede explicarse debido a que las cepas probióticas pudieran haber producido exopolisacáridos, los cuales refuerzan la red tridimensional que forma el coágulo pues actúan como filamentos que conectan las fracciones de caseína (Beal *et al.*, 1999; Frengova *et al.*, 2000; Hess *et al.*, 1997; Moreira *et al.*, 2000).

La Tabla 7 muestra que no se encontraron diferencias significativas para la viscosidad entre los dos cultivos probióticos (CP1 y CP2) al 3% de sólidos añadidos. En la Figura 12 se observa que la viscosidad se incrementa a medida que se incrementa el contenido de sólidos, y que se encontraron diferencias significativas entre los cultivos probióticos a diferentes niveles de sólidos añadidos. Esto se explica porque al incrementarse el contenido de proteína, la distancia entre las micelas de caseína se acorta y las dimensiones de los espacios vacíos en el coágulo disminuyen (Gastaldi *et al.*, 1997, Ozer *et al.*, 1999). Por otro lado, sí se encontraron diferencias significativas entre CT y CP1 y entre CT y CP2.

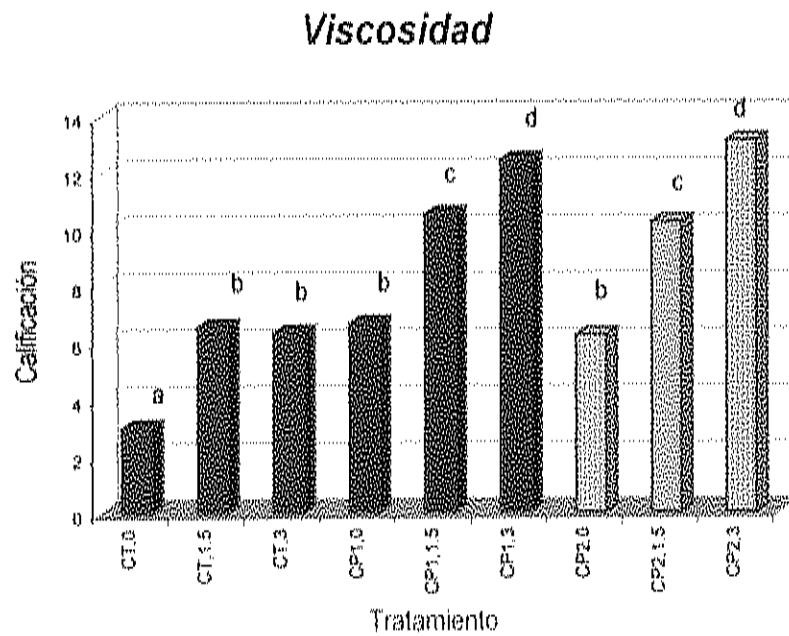


Fig 12. Análisis descriptivo de la viscosidad de yogur preparado a partir de un cultivo tradicional (CT) y dos cultivos probióticos (CP 1/CP 2), con diferentes niveles de sólidos añadidos 0, 1.5 y 3%.

Aroma y Sabor. En la Tabla 7 se puede apreciar que el aroma desarrollado por CT presenta, en la mayoría de los casos, diferencias significativas con respecto a CP1 y CP2. Esto pudiera deberse a que las bifidobacterias presentes en CP1 y CP2, producen ácido láctico y acético en una proporción de 2:3, lo cual repercute en la intensidad del aroma y sabor a yogur (Gomes *et al.* 1999). CT produce principalmente acetaldehído y acetona como precursores del aroma y sabor a yogur (Alonso y Fraga, 2001)

El cultivo que desarrolló un aroma más intenso a yogur fue el CP1 con 3% de sólidos añadidos y presentó diferencias significativas con respecto a CT y CP2 en todos los diferentes niveles de sólidos. Sin embargo, la Figura 13 muestra que la intensidad de sabor a yogur que presentó CP1 con 3% de sólidos añadidos, fue menor a la de CT con 3%, pero mayor a la de CP2. En este aspecto, se encontraron diferencias significativas entre CP1 y CP2.

Acidez. Considerando que la acidez ideal estaba representada por la mitad de la escala utilizada (15 cm), el tratamiento que presentó la calificación más próxima a la acidez ideal fue el CP1 a 3% de sólidos añadidos (Fig 14). Este tratamiento presenta diferencias significativas con respecto a CP2 en cualquiera de los niveles de sólidos añadidos, aspecto que se puede observar en la Tabla 7.

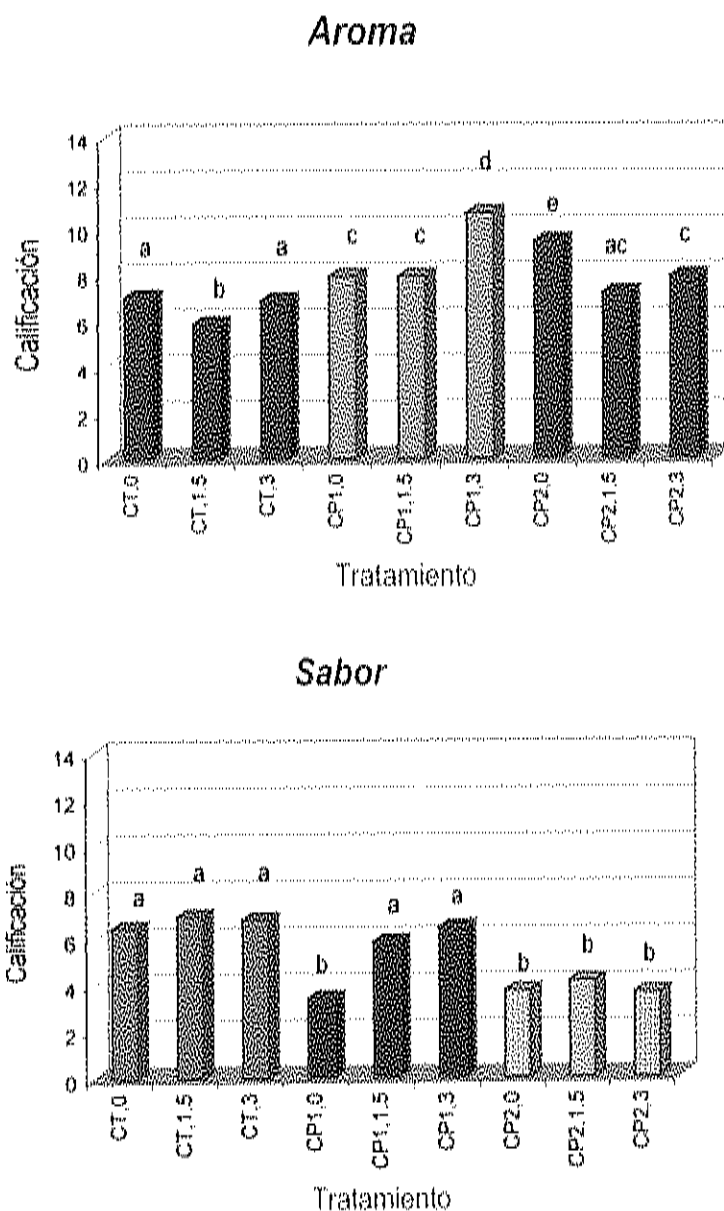


Fig 13. Análisis descriptivo del aroma y sabor de yogur preparado a partir de un cultivo tradicional (CT) y dos cultivos probióticos (CP 1/CP 2), con diferentes niveles de sólidos añadidos 0, 1.5 y 3%.

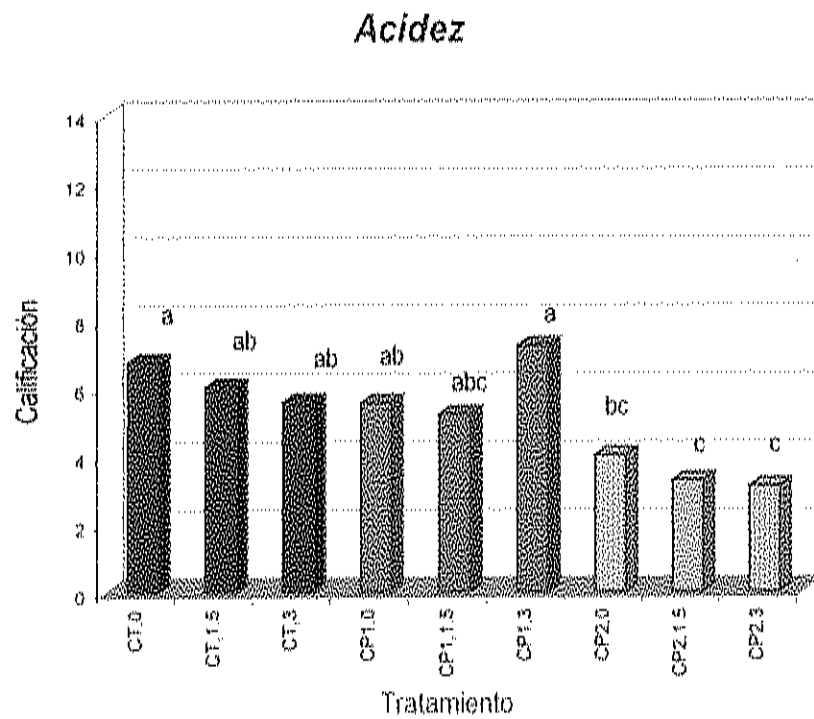


Fig 14. Análisis descriptivo de la acidez de yogur preparado a partir de un cultivo tradicional (CT) y dos cultivos probióticos (CP 1/CP 2), con diferentes niveles de sólidos añadidos 0, 1.5 y 3%.

Tabla 7. Resultados del análisis descriptivo ¹

Tratamiento	Suero	Firmeza	Viscosidad	Aroma	Sabor	Acidez
1 CT,0	5.527 ^{ab}	6.267 ^a	3.020 ^a	7.074 ^a	6.479 ^a	6.759 ^a
2 CT,1.5	1.987 ^{cd}	11.783 ^{bc}	6.575 ^b	5.890 ^b	6.999 ^b	6.025 ^{ab}
3 CT,3	0.783 ^{cd}	13.935 ^c	6.344 ^b	6.923 ^b	6.837 ^a	5.579 ^{ab}
4 CP1,0	3.098 ^{ad}	3.163 ^d	6.675 ^b	7.941 ^c	3.452 ^b	5.552 ^{ab}
5 CP1,1.5	0.300 ^e	10.763 ^c	10.526 ^c	7.932 ^c	5.872 ^a	5.214 ^{abc}
6 CP1,3	0.245 ^e	12.421 ^{ce}	12.431 ^d	10.674 ^d	6.490 ^a	7.223 ^a
7 CP2,0	7.325 ^b	8.419 ^f	6.251 ^b	9.459 ^e	3.735 ^b	3.996 ^{bc}
8 CP2,1.5	0.596 ^e	11.772 ^{bc}	10.231 ^c	7.205 ^{bc}	4.155 ^b	3.261 ^c
9 CP2,3	0.423 ^e	12.857 ^{bc}	13.104 ^d	7.910 ^c	3.652 ^b	3.099 ^c

¹Valores seguidos por la misma literal, no indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05)

Criterios para la Selección del Cultivo

Estos resultados indican que la adición de cultivos probióticos al yogur aunque reducen su firmeza, también disminuyen la sinéresis. Por lo que, el producto resultante puede ser de muy buena calidad si se utiliza una mezcla eficiente de cultivos iniciadores y probióticos, ya que la reducción en la sinéresis podría eliminar el uso de estabilizantes.

Debido a que sólo se detectaron diferencias entre CP1 y CP2 en cuanto a aroma, sabor y acidez; se tomaron estos parámetros para elegir a CP1 como el cultivo a utilizar en la siguiente etapa de este trabajo. Lo anterior debido a que fue el que presentó las mayores calificaciones en estos atributos, indicativo de un producto ideal en estos aspectos.

Relación del Fenotipo y las Propiedades Reológicas del Yogur

Composición de la leche

Las muestras de leche se obtuvieron de diferentes hatos de ganado Holstein Americano de la localidad. La composición de las muestras se observa en la Tabla 8. El contenido promedio de proteína total (3.07%) y grasa (1.7%) de las muestras, se encuentra por debajo del promedio reportado para el ganado Holstein Friesian, el cual es de 3.39% y 3.69% (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986).

La variación encontrada entre los resultados reportados y los que se obtuvieron en este estudio, puede atribuirse a diversos factores ambientales como las diferencias climáticas, la alimentación de los animales, la raza, la edad al parto, la etapa de lactancia, entre otros. Por otro lado, también se le puede atribuir a factores genéticos como el PG de las proteínas, ya que se ha reportado que los fenotipos afectan el contenido de grasa y proteína (Ng-Kwai-Hang *et al.* 1987)

El promedio de la proporción caseína/proteína sérica contenido en las leches objeto de estudio fue de 4.77, encontrándose dentro del rango reportado por Brunner en 1981 (3.5 - 5.6). La lactosa y los sólidos no grasos están dentro de los parámetros normales de la leche según Walstra *et al.*, 1999.

Tabla 8. Composición de las muestras de leche (n=71)

Componente	Promedio	Rango
Rel. caseica/sérica	4.77	2.18 – 6.16
Grasa total (%)	1.70	0.70 – 4.34
Proteína total (%)	3.07	2.31 – 3.87
Lactosa (%)	4.94	4.18 – 5.48
Sólidos no grasos (%)	8.65	6.77 – 9.53

Identificación del Fenotipo de las Muestras de Leche

La figura 15 muestra un electroferograma típico de una muestra de leche conteniendo fenotipos A y B. En este electroferograma se observa una excelente separación de las principales proteínas séricas, α -lactoalbúmina y las variantes A y B de la β -Lg obtenidas por ECZL. El orden de migración de las proteínas, fue confirmado por medio de la adición de estándares analíticos.

En la Tabla 9 se muestra la frecuencia de los fenotipos de la β -Lg para las muestras de leche analizadas, predominando la variante AB y encontrándose casi con la misma frecuencia las variantes AA y BB. La frecuencia mostrada para el fenotipo AB es similar al reportado en un estudio previo realizado con ganado Holstein, para el que la frecuencia fue de 0.5 (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1984). Olguín (2001) y Castellanos (2002) trabajaron con muestras de leche de ganado Holstein Americano, y sus resultados reportan una frecuencia para este fenotipo arriba de 0.75. Esta diferencia puede deberse al tamaño de la muestra o a la región donde se llevó a cabo el muestreo.

Sin embargo, la frecuencia para el fenotipo BB encontrada en este estudio, concuerda con lo reportado por Olguín (2001), que fue de 0.20. Para el fenotipo AA la frecuencia encontrada fue de 0.25, muy diferente a lo reportado por estos autores, quienes reportan una frecuencia entre 0.04 y 0.08.

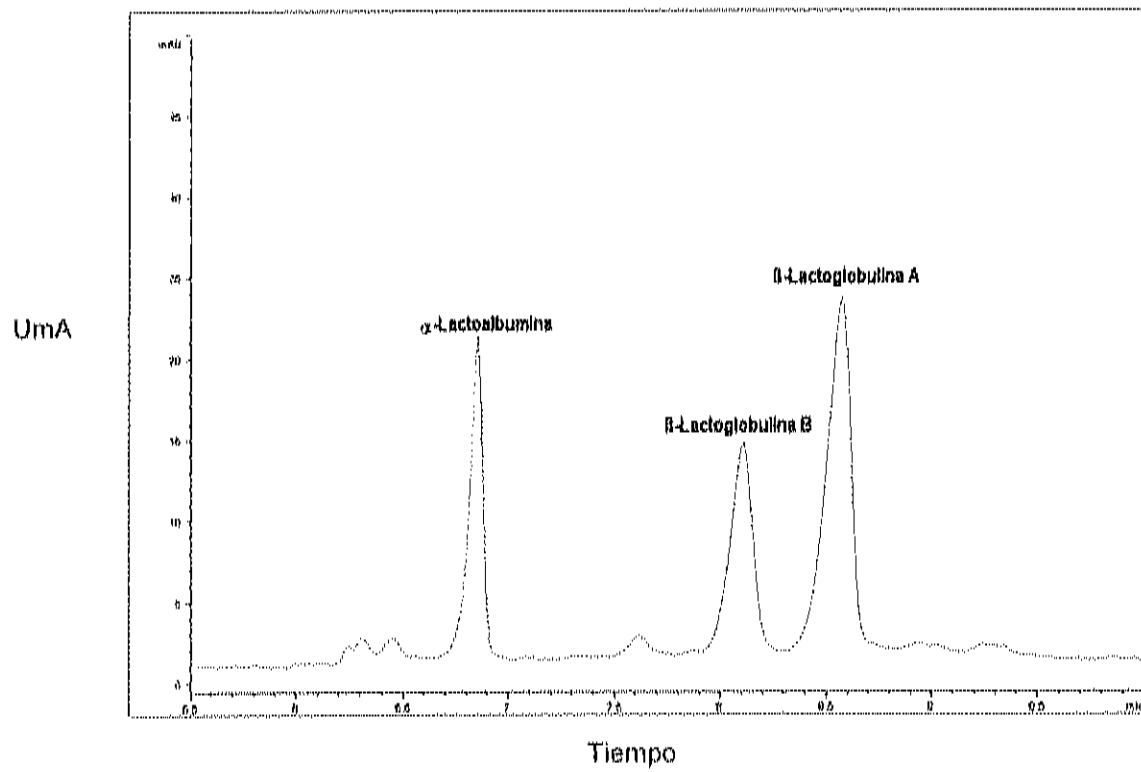


Fig 15. Electroferograma típico de las proteínas del suero de leche.

Tabla 9. Frecuencia de los fenotipos de la β -lactoglobulina (n=71)

Fenotipo	No. Muestras	Frecuencia
AA	18	0.253
AB	38	0.535
BB	15	0.212

Cuantificación de las muestras analizadas por medio de ECZL

Las curvas de calibración para cada proteína del suero elaboradas con estándares analíticos mostraron relaciones lineales con coeficientes de determinación (R^2) mayores de 0.99 (Tabla 10). Dichas relaciones lineales fueron utilizadas para la determinación cuantitativa de las proteínas del suero y las variantes identificadas en las muestras de leche (Fig 16).

Las concentraciones de las variantes genéticas β -Lg presentes en las muestras y determinadas por ECZL se muestran en la Tabla 11. Las muestras de leche analizadas presentaron mayores valores para la variante A de la β -Lg y menores para la variante B, estando estos resultados de acuerdo a lo reportado por Olguín-Arredondo y Vallejo-Córdoba (1999). En los fenotipos AB, las variantes A y B presentaron un amplio rango de variación, sin embargo, el promedio observado fue mayor al del fenotipo B y muy similar al del fenotipo A, situación que también sigue el comportamiento de los resultados reportados por Olguín-Arredondo y Vallejo-Córdoba (1999).

Tabla 10. Relaciones lineales del estándar analítico para cada proteína sérica

Proteína	Ecuación de regresión (y= ax + b)	Coef. de determinación (R²)
α -La	y = 347.16x – 0.9819	0.9995
β -Lg AA	y = 209.57x – 2.5757	0.9998
β -Lg BB	y = 262.94x – 1.6305	0.9968

Y = área del pico normalizada; x = concentración de la proteína (mg/mL).

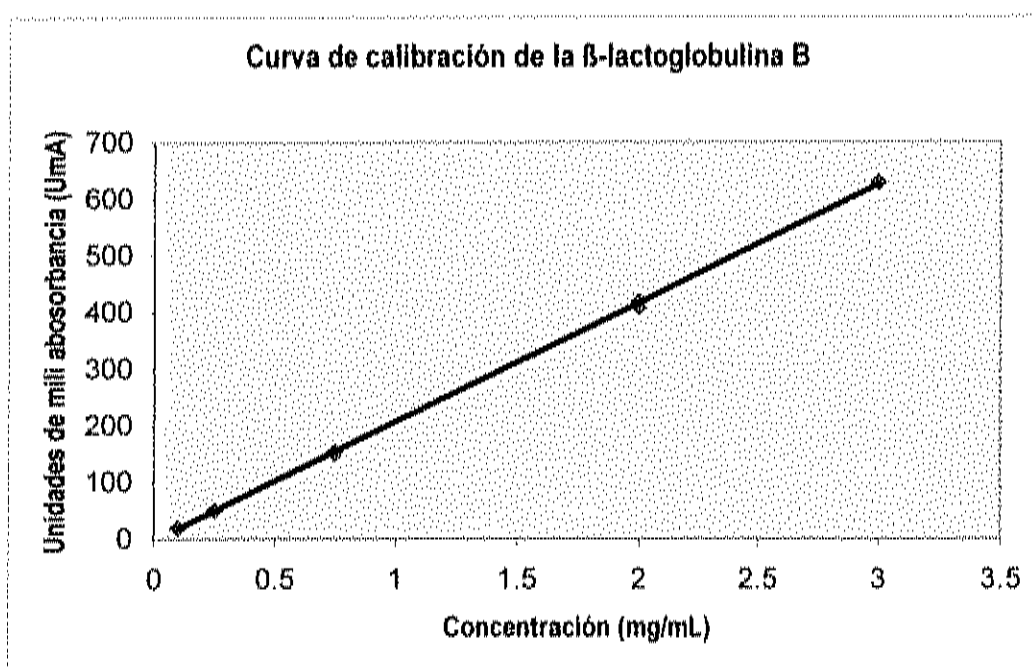
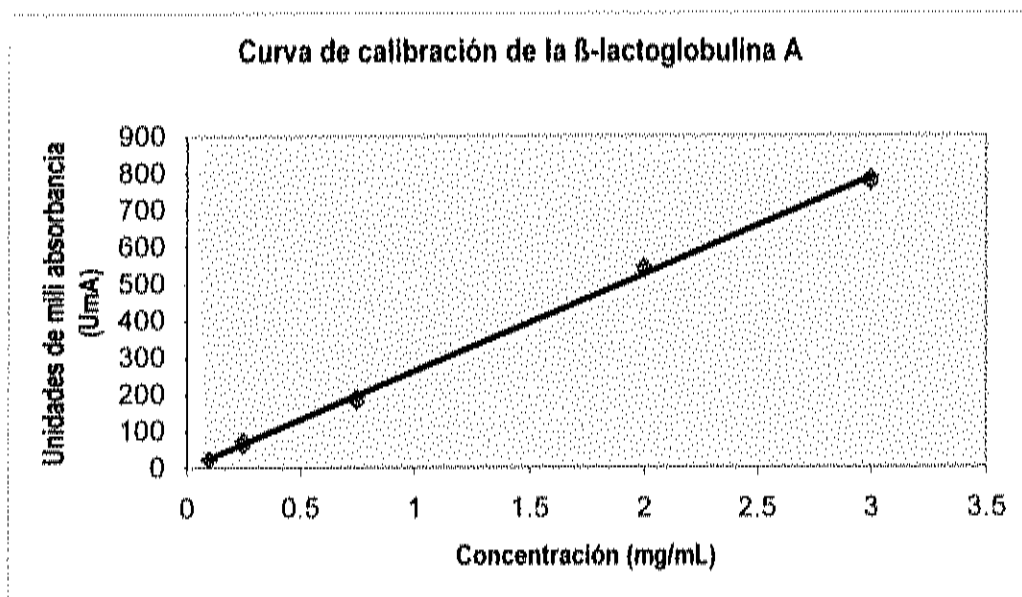


Fig 16. Curvas de calibración para los fenotipos A y B de la β -lactoglobulina

Tabla 11. Concentraciones de los fenotipos de la β -lactoglobulina en las muestras analizadas, determinadas por ECZL (n=71)

Fenotipo	n	Variantes de la β -Lg (mg/mL)		Promedio
		A	B	
AA	18	2.40 – 5.71	0.00	4.01
AB	38	1.33 – 3.34	1.01 – 4.03	4.34
BB	15	0.00	3.03 – 5.56	3.97

Relación entre los Fenotipos de la β -Lg y las Propiedades Reológicas del Yogur con Microorganismos Probióticos

En el yogur, como en cualquier otro alimento, cada uno de sus componentes interactúan entre sí. Por lo tanto, se puede decir que las propiedades reológicas de este alimento están en función de diversos factores en mayor o menor grado. Dado que en este trabajo se establece la relación entre el PG de la β -Lg y las propiedades reológicas del yogur, se realizó un análisis de correlación canónica (ACC), para poder explicar esta relación tomando en cuenta la interacción de otros factores importantes de manera simultánea. En la tabla 12 se describen cada una de las variables consideradas para establecer dicha relación.

El ACC arrojó las siguientes coeficientes de correlación para cada par de combinaciones lineales ($U_i V_i$): 0.722, 0.564, 0.442, 0.235 y 0.206. Ya que el coeficiente del primer par ($U_1 V_1$) es el mayor, es el que mejor explica el efecto de la composición de la leche y el PG de la β -Lg, en las propiedades reológicas del yogur con microorganismos probióticos. La ecuación para este par de variables se muestra en la tabla 13.

Las variables X_2 y X_3 presentaron los valores más altos (0.944 y 0.818), que corresponden a proteína total y sólidos no grasos. Esto indica que son los

factores que influyen en mayor grado en la reología del gel (variables Y). En el caso de la sinéresis (Y_5), el coeficiente resultó negativo, esto es, a mayor firmeza (Y_1), consistencia (Y_2), cohesividad (Y_3) y adhesividad (Y_4); se presenta una menor expulsión de suero. La explicación de este comportamiento y su relación con la literatura existente, se da de manera detallada en la discusión del apartado de mediciones instrumentales en el experimento de selección del cultivo.

Las variables X_1 (grasa) y X_4 (lactosa), también resultaron de importancia en la reología del gel, pues mostraron un coeficiente de 0.523 y 0.425 respectivamente. En el caso de la grasa, se sabe que imparte cuerpo a los alimentos (Fenema, 1996), lo que resulta en una mejor textura de los mismos. Por su parte la lactosa, interviene en el descenso del pH al ser convertida por las bacterias en ácido láctico, dando paso a la formación del gel (Tamime y Robinson, 1999)

Por otro lado, también se encontró que la presencia de los fenotipos A y B de la β -Lg, tienen efecto en las propiedades reológicas del yogur. Para la variable X_6 (β -Lg A) se obtuvo un valor de -0.067 y para variable X_7 (β -Lg B) de 0.281 , esto indica que la presencia de la variante B resulta en un gel con mayor firmeza, mayor consistencia, mayor cohesividad, mayor adhesividad y menor expulsión de suero. Este comportamiento se explica porque la variante B de la

β -Lg se ha relacionado con un mayor contenido de caseína (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1987) y además se ha visto que es más termolábil que la variante A (Fitzgerald y Hill, 1997), por lo que se facilita su desnaturalización y consecuente agregación a las micelas de caseína, incrementándose de este modo la densidad de la matriz proteica (Lucey *et al.*, 1998)

El coeficiente para la variable X_6 (relación caseínas/séricas), es muy pequeño (0.145). Dado que las caseínas juegan un papel muy importante en la formación del coágulo del yogur, se esperaba un mayor valor para este coeficiente. La justificación para esto, podría encontrarse en el procedimiento seguido para el cálculo de este parámetro, ya que la caseína se obtuvo por diferencia (proteína total – proteína sérica) y no por determinación directa. En el modelo se puede observar que la variable pH inicial de la leche (X_8), tiene un efecto muy pequeño sobre la reología del gel.

Tabla 12. Variables dependientes (Y's) e independientes (X's), utilizadas en el análisis de correlación canónica.

VARIABLE		DESCRIPCION
Dependientes	Y1	Fuerza de gel
	Y2	Consistencia
	Y3	Cohesividad
	Y4	Adhesividad
	Y5	Sinéresis
Independientes	X1	Grasa
	X2	Proteína total
	X3	Sólidos no grasos
	X4	Lactosa
	X5	Relación caseícas/Séricas
	X6	β -Lg A
	X7	β -Lg B
	X8	pH inicial de la leche

Tabla 13. Ecuación del primer par de variables, $p=8$, $q=5$, $r=5$

$$U_1 = 0.523 X_1 + 0.994 X_2 + 0.818 X_3 + 0.425 X_4 + 0.145 X_5 - 0.067 X_6 \\ + 0.281 X_7 + 0.028 X_8$$

$$V_1 = 0.841 Y_1 + 0.807 Y_2 + 0.958 Y_3 + 0.775 Y_4 - 0.426 Y_5$$

p= número de variables independientes, *q*= número de variables dependientes, *r*=valor mínimo *p* ó *q*

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los yogures preparados con cultivo iniciador conteniendo microorganismos probióticos, presentaron menor firmeza que los elaborados a partir de cultivo iniciador tradicional. Sin embargo, también tuvieron menor expulsión de suero, aspecto que resulta muy favorable en las características sensoriales de este producto. En este punto, sería interesante estudiar el mecanismo por el cual estos microorganismos mejoran la textura de este alimento.

Las variables canónicas relacionando firmeza, consistencia, cohesividad, adhesividad y sinéresis como variables dependientes con β -lactoglobulina A y/o B, proporción caseícas/séricas, grasa, lactosa, pH inicial y proteína total como variables independientes, presentaron una fuerte correlación. La β -lactoglobulina fenotipo B mostró una fuerte influencia en la estabilidad y propiedades reológicas del yogur, respecto al fenotipo A. Estos resultados pueden ser útiles para aquellos industriales que deseen usar una selección genética basada en el polimorfismo de las proteínas de la leche para mejorar la calidad del yogur.

Hasta donde se tiene conocimiento, este es el primer trabajo donde se relacionan los fenotipos de la β -lactoglobulina con las propiedades reológicas de un yogur con microorganismos probióticos. Los hallazgos de este trabajo coinciden con los realizados en sistemas modelo de geles inducidos por calor o

por acidificación química. Sin embargo, los resultados de esta investigación son de mayor relevancia ya que se utilizaron condiciones de proceso y de medición de parámetros equivalentes a los que se llevan a cabo durante la industrialización de este alimento.

Este trabajo demuestra que independientemente de la manera en que se induce a la formación de un coágulo a partir de las proteínas de la leche, el fenotipo B de la β -lactoglobulina, influye favorablemente en sus propiedades reológicas y su estabilidad. Asimismo, prueba que la inducción de geles por fermentación bacteriana es un factor que no altera los resultados obtenidos en sistemas modelo utilizando acidificación química.

BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Tarboush H. M. 1996. Comparison of associative growth and proteolytic activity of yogurt starters in whole milk from camels and cows. *J Dairy Sci* 79:366-371
- Adhikari K., Mustapha A., Grün I. U. y Fernando L. 2000. Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. *J Dairy Sci* 83:1946-1951
- Ainsworth P. 1996. Chemistry in the kitchen: milk and milk products I. *Nut & Food Sci* 2:27-30
- Aleandri R., Buttazzoni L. G. y Schneider J. C. 1990. The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability. *J Dairy Sci* 73:241-255
- Alonso L. y Fraga M. J. 2001. Simple and rapid analysis for quantitation of the most important volatile flavor compounds in yogurt by Headspace Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J Chrom Sci* 39:297-300
- Allmere T., Andrén A., Lindersson M. y Björck L. 1998. Studies on rheological properties of stirred milk gels made from milk with defined genetic variants of κ -casein and β -lactoglobulin. *Int Dairy J* 8:899-905
- Amiot J. 1991. En: *Ciencia y Tecnología de la Leche*. Editorial Acribia, España. 1:53
- Anema G. S. y Creamer L. K. 1993. Effect of the A and B variants of both α_{s1} and κ -casein on bovine α_{s1} and κ -casein micelle solvation and κ -casein content. *J Dairy Res* 60:505-516
- Badui D. 1999. En: *Química de los Alimentos*. Ed. Alambra Mexicana, México. 5:321 y 12:581-613

- Beal C., Skokanova J., Latrille E., Martin N. y Corrieu G. 1999. Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. *J Dairy Sci* 82:673-681
- Bewley M.C., Qin B. Y., Jameson G. B., Sawyer L. y Baker E. N. 1997. Bovine β -lactoglobulin and its variants: a three-dimensional structural perspective. Seminar on Milk Protein Polymorphism II. New Zealand, Feb. International Dairy Federation and New Zealand Dairy Research Institute
- Bovenhuis H., Van Arendonk J. A. M. y Korver S. 1992. Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits. *J Dairy Sci* 75:2549-2559
- Boylston T. D. y Beitz D. C. 2002. Conjugated linoleic acid and fatty acid composition of yogurt produced from milk of cows fed soy oil and conjugated linoleic acid. *J. Food Sci.* 67:1973-1978
- Bourne M. (2002). En: *Food Texture and Viscosity*. Academic Press. Second Edition. USA. 1:17
- Bruhn C. M., Bruhn J. C., Cotter A., Garret C., Klenk M., Powell C., Stanford G., Steinbring Y. y West E. 2002. Consumer attitudes toward use of probiotic cultures. *J. Food Sci.* 67:1969-1972
- Caron A., St-Gelais D. y Poullot Y. 1997. Coagulation of milk enriched with ultrafiltered or diafiltered microfiltered milk retentate powders. *Int Dairy J* 7:445-451
- Carson K. y Meullenet J. F. C. y Reische D. W. 2002. Spectral strain stress analysis and partial least squares regression to predict sensory texture of yogurt using compression penetration instrumental method. *J. Food Sci.* 67:1224-1228
- Castellanos-Villegas C. A. 2002. Tesis: Relación de las variantes genéticas de la β -lactoglobulina con las propiedades de coagulación de la leche y el

- rendimiento quesero. M. C. Tesis. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Sonora, México
- Chandan R. C. 1999. Enhancing market value of milk by adding cultures. *J Dairy Sci* 82:2245-2256
- Chavarria T. S. 1999. Aditivos que se emplean en la Industria Láctea. *Lácteos y Cárnicos Mexicanos*. Dic 98-Ene 99:10-12
- Chen R. M., Wu J. J., Lee S. C., Huang A. H. y Wu H. M. 1999. Increase of intestinal *Bifidobacterium* and suppression of Coliform Bacteria with short-term yogurt ingestion. *J Dairy Sci* 82:2308-2314
- Dave R. J. y Shah N. P. 1998. The influence of ingredient supplementation on the textural characteristics of yogurt. *Aust J. Dairy Tech.* 53:180-184
- Davidson R. H., Duncan S. E., Hackney C. R., Eigel W. N. y Boling J. W. 2000. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. *J Dairy Sci* 83:666-673
- Drake M. A., Chen X. Q., Tamarapu S. y Leenanon B. 2000. Soy Protein fortification affects sensory, chemical and microbiological properties of dairy yogurts. *J. Food Sci.* 65:1244-1247
- Dillon W. R. y Goldstein M. 1984. Discriminant analysis: the two group problem. En: *Multivariate analysis. Methods and applications*. New York. John Wiley & Sons
- Elmer G. W. 2001. Probiotics: "Living drugs". *Am J Health-Syst Pharm* 58:1101-1109
- Fennema, O. R. 1996. Milk. En: *Food Chemistry*. Editorial Marcel Dekker, Inc. USA.
- FitzGerald R. J. y Hill J. P. 1997. The relationship between milk protein polymorphism and the manufacture and functionality of dairy products. Seminar on Milk Protein Polymorphism II. New Zealand, Feb. International Dairy Federation and New Zealand Dairy Research Institute

- Fox P. F. 1992. En: Advanced Dairy Chemistry. Vol 1. Proteins. Elsevier Applied Science. London. 14:579-619
- Fox P. F. y McSweeney P. L. H. 1999. En: Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk. Ed. por Law A. B., Second Edition, Printed by Blackie A&P, USA. 1:1-49
- Frengova G. I., Simova E. D., Breshkova D. M. y Simov Z. I. 2000. Production and monomer composition of exopolysaccharides by yogurt starter cultures. Can J Microbiol 46:1123-1127
- Gastaldi E., Lagaude A., Marchesseau S. y Tarodo de la Fuente Y. 1997. Acid milk gel formation as affected by total solid content. J Food Sci 62:4
- Gardini F., Lanciotti R., Guerzoni M. E. y Torriani S. 1999. Evaluation of aroma production and survival of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks. Int Dairy Sci 9:125-134
- Giese J. 1995. Measuring Physical Properties of Foods. Food Tech. 49:53-63
- Gomes A. M. P. y Malcata F. X. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. Trends in Food Sci and Tech. 10:139-157
- Goycoolea F. 2002. Apuntes del curso "Polisacáridos Alimentarios". Centro de Investigación y Desarrollo, A. C.
- Harte F., Amonte M., Luedecke L., Swanson B. G. Y Barbosa-Cánovas G. V. 2002. Yield stress and microstructure of set yogurt made from high hydrostatic pressure-treated full fat milk. J. Food Sci. 67:2245-2250
- Hassan A. N., Frank J. F., Schmidt K. A. y Shalabi S. I. 1996. Textural properties of yogurt made with encapsulated nonropy lactic cultures. J Dairy Sci 79:2098-2103

- Hess S. J., Roberts R. F. y Ziegler G. R. 1997. Rheological properties of non fat yogurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* producing exopolisaccharide or using commercial stabilizer system. J Dairy Sci 80 252-263
- Hill J. P. 1993. The relationship between β -lactoglobulin phenotypes and milk composition in New Zealand dairy cattle. J Dairy Sci 76:281-286
- Hirayama K. y Rafter J. 2000. Review: The role of probiotic bacteria in cancer prevention. Microbes and Infection. 681-686
- Hollingsworth P. 1997. Marketing trends fueling health foods success. Food Technology 51:53-59
- Hollingsworth P. 2001. Yogurt reinvents itself. Food Tech 55:43-46
- Kailasapathy K. y Chin J. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* Immunology Cell Biol 78:80-88
- Kailasapathy K. y Ribka S. 1997. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* –their therapeutic potential and survival in yogurt. Review paper. Aust J Dairy Tech 52:28-35
- Katz F. 2001. Active cultures add function to yogurt and other foods. Food Tech 55:46-49
- Keogh M. K. y O’Kennedy B. T. 1998. Rheology of stirred yogurt as affected by added milk fat, protein and hydrocolloids. J Food Sci 63:108-112
- Kim Y. J. y Liu R. H. 2002. Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria. J. Food Sci. 67: 1731-1737
- Klaenhammer T. R. 2000. Probiotic Bacteria: Today and Tomorrow. J Nutr 130:415S-416S
- Lamoureux L., Roy D. y Gauthier S. F. 2002. Production of oligosaccharides in yogurt containing bifidobacteria and yogurt cultures. J. Dairy Sci. 85:1058-1069

- Lucey J. A. 2002. *ADSA Foundation Scholar Award*. Formation and physical properties of milk protein gels. *J. Dairy Sci* 85:281-294
- Lucey J. A., Tamehana M., Singh H. y Munro P., 1998. Effect of interactions between denatured whey proteins and casein micelles on the formation and rheological properties of acid skim milk gels. *J Dairy Res* 65:555-567
- Lucey J. A. y Fox P. F. 1993. Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: A Review. *J. Dairy Sci.* 76:1714-1724
- Lundén A., Nilsson M. y Janson L. 1997. Marked effect of β -lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein milk. *J Dairy Sci* 80:2996-3005
- Marziali, A. S. y K. F. Ng-Kwai-Hang 1986a. Effects of milk composition and genetic polymorphism on coagulation properties of milk. *J. Dairy Sci* 69:1793-1798
- Marziali, A. S. y K. F. Ng-Kwai-Hang 1986b. Relationship between milk protein polymorphism and cheese yield capacity. *J. Dairy Sci* 69:1193-1201
- Mayer H. K., Ortner M., Tschager E. y Ginzinger W. 1997. Composite milk protein phenotypes in relation to composition and cheese making properties of milk. *Milchwirtschaftliche Berichte* 305-310
- Meydani S. N. y Ha W. K. 2000. Immunologic effects of yogurt. *Am J Clin Nutr* 71:861-872
- Michalski M. C., Cariou R., Michel F. y Garnier C. 2002. Native vs. damage milk fat globules : Membrane properties affect the viscoelasticity of milk gels. *J. Dairy Sci.* 85:2451-2461.
- Montilla A., Balcones E., Olano A. y Calvo M. 1995. Influence of heat treatments on whey protein denaturation and rennet clotting properties of cow's and goat's milk. *J Agric Food Chem* 43:1908-1911

- Moreira M., Abraham A., y De Antoni G. 2000. Technological properties of milks fermented with thermophilic lactic acid bacteria at suboptimal temperature. *J Dairy Sci* 83:395-400
- Ng-Kwai-Hang K. F. 1998. Genetic polymorphism of milk proteins: Relationship with production traits, milk composition and technological properties. *Can. J. Anim. Sci.* 78(Supp.):131-147
- Ng-Kwai-Hang K. F. y F. Grosclaude. 1992. Genetic polymorphism of milk proteins. Pages 405-456. En: *Advanced Dairy Chemistry*. Vol. 1. P.F. Fox, Blackie & Son, Ltd. Great Britain
- Ng-Kwai-Hang K. F., Hayes J. F., Moxley J. E. y Monardes H. G. 1984. Association of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk, fat and protein production by dairy cattle. *J Dairy Sci* 67:835
- Ng-Kwai-Hang K. F., Hayes J. F., Moxley J. E. y Monardes H. G. 1986. Relationship between milk protein polymorphism and major milk constituents in Holstein-Friesian Cows. *J Dairy Sci* 69:22-26
- Ng-Kwai-Hang K. F., Hayes J. F., Moxley J. E. y Monardes H. G. 1987. Variation in milk protein concentrations associated with genetic polymorphism and environmental factors. *J Dairy Sci* 70:563-570
- Norma Mexicana NMX-F-444-1983. Alimentos-yoghurt o leche búlgara. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Dirección General de Normas
- Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 2000. 17thEd., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA. Official Methods 989.04, 990.19 y 991.20
- Oldham J. D. y Sutton J. D. 1983. Composición de la leche y la vaca de alta producción. En: *Estrategia de alimentación para vacas lecheras de alta producción*. Broster y Swan editores. Primera edición en español. México
- Olguin-Arredondo H. A. 2001. Tesis: Relación de las variantes genéticas de la β -lactoglobulina con la composición de la leche producida por ganado

- Holstein Americano. M. C. Tesis. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Sonora, México
- Olguín-Arredondo H. y Vallejo-Córdoba B. 1999. Separation and determination of β -lactoglobulin variants A and B in cow's milk by capillary free zone electrophoresis. *J Cap and Microchip Tech* 6:145-149
- Ozer B.H., R. Stenning, A. S. Grandison y R. K. Robinson. 1999. Effect of protein concentration on the properties and structure of concentrated yogurts. *Int J Dairy Tech* 52:135-138
- Puvanenthiran A., Williams R. P. W. y Augustin M. A. 2002. Structure and viscoelastic properties of set yogurt with altered casein to whey protein ratios. *Int. Dairy J.* 12:383-391
- Roberfroid M. B. 2000. Prebiotics y probióticos: are they functional foods?. *Am J Clin Nutr* 71(suppl):1682S-1687S
- Sanders M. E. 1999. Probiotics. *Food Technology* 11:67-77
- Saxelin M., Grenov B., Svensson U., Fondén R., Reniero R. y Mattila-Sandholm T. 1999. The technology of probióticos. *Trends Food Sci & Tech* 10:287-392
- Shah N. P. 2001. Functional foods from probióticos and prebiotics. *Food Tech* 55:46-53
- Shah N. P. 2000. Prebiotic bacteria: selective enumeration and Survival in Dairy Foods. *J Dairy Sci* 83:894-907
- Singh H., Roberts M. S., Munro P. A., Teo C. T. 1996. Acid-induced dissociation of casein micelles in milk: effects of heat treatment. *J Dairy Sci.* 79:1340-1346
- Skriver A., Holstborg J. y Qvist B. K. 1999. Relation between sensory texture análisis and rheological properties of stirred yogurt. *J. Dairy Res.* 66:609-618
- Sloan A. E. 2001. Clean Foods. *Food Tech* 55:18

- Sodini I., Lucas A., Oliveira M. N., Remeuf F. y Corrieu G. 2002. Effect of Milk Base and Starter Culture on acidification, texture and probiotic cell counts in fermented milk processing. *J. Dairy Sci.* 85:2479-2488
- Spreer E. 1995. En: *Milk and dairy product technology*. Ed. Board. USA. 8:342-358.
- Sulta-Cruce P. y Goulet J. 2001. Improving probiotic survival rate. *Food Tech* 55:36-42
- Suwonsichon T. y Peleg M. 1999. Rheological characterisation of almost intact and stirred yogurt by imperfect squeezing flow viscometry. *J. Sci Food Agric* 79:911-921
- Tamime A. Y. y Robinson R.K. 1999. En: *Yogurt Science and Technology*. Ed. CRC. Segunda edición. USA. 2:11-108
- Trujillo A. J., Jordana J., Guamis B., Serradilla J. M. y Amills M. 1998. Review: Polymorphism of the caprine α_{s1} -casein gene and its effect on the production, composition and technological properties of milk and on cheese making and ripening. *Food Sci and Tech Int* 4:217-235
- Walsh C. D., Guinee T. P., Harrington D., Mehra R., Murphy J. y Fitzgerald J. 1998. Cheesemaking, compositional and functional characteristics of low-moisture part skim Mozzarella cheese from bovine milks containing κ -casein AA, AB, or BB genetic variants. *J. Dairy Res* 65:307-315
- Walstra Pieter. 1990. On the Stability of Casein Micelles. *J. Dairy Sci.* 73:1965-1979
- Walstra P., Geurts T. J., Noomen A., Jellema A. y van Boekel M. A. J. S. 1999. En: *Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes*. Editorial Dekker, USA. 2:27-104; 3:107-147
- Waungana A., Singh H. y Bennett R. J. 1996. Influence of denaturation and aggregation of β -lactoglobulin on rennet coagulation properties of skim milk and ultrafiltered milk. *Food Res Int.* 1:8 pp. 715-721

- Wolfschoon-Pombo A. F. 1997. Influence of calcium chloride addition to milk on the cheese yield. *Int. Dairy J.* 7:249-254
- Wollowski I., Rechkemmer G. y Pool-Zobel B. L. 2001. Protective role of probióticos and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr* 73(supp):451S-455S
- Zappacosta F., Luccia A. D., Ledda L. y Addeo F. 1998. Identification of C-terminally truncated forms of β -lactoglobulin in whey from Romagnola cows' milk by two dimensional electrophoresis coupled to mass spectrometry. *J Dairy Res* 65:243-252

- Wolfschoon-Pombo A. F. 1997. Influence of calcium chloride addition to milk on the cheese yield. *Int. Dairy J.* 7:249-254
- Wollowski I., Rechkemmer G. y Pool-Zobel B. L. 2001. Protective role of probióticos and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr* 73(supp):451S-455S
- Zappacosta F., Luccia A. D., Ledda L. y Addeo F. 1998. Identification of C-terminally truncated forms of β -lactoglobulin in whey from Romagnola cows' milk by two dimensional electrophoresis coupled to mass spectrometry. *J Dairy Res* 65:243-252