

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

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON TRANSGLUTAMINASA
MICROBIANA SOBRE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS
Y SENSORIALES EN EL YOGURT ELABORADO CON
LECHE DE BOVINO.**

POR:

MAGALY GUADALUPE VERA VITE

TESIS APROBADA POR LA
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN
ANIMAL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRIA EN CIENCIAS

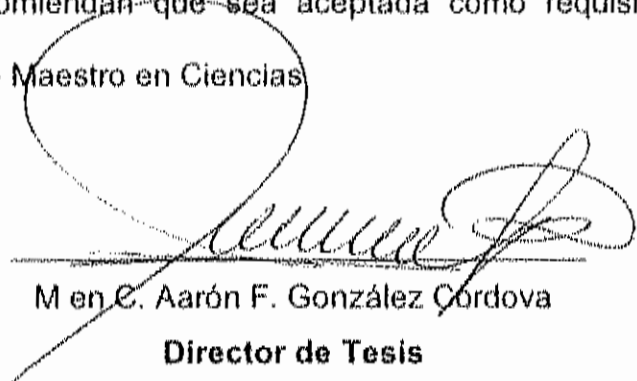
HERMOSILLO, SONORA,

OCTUBRE, DEL 2005,




APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la Químico Farmacéutico Biólogo Magaly Guadalupe Vera Vite, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias



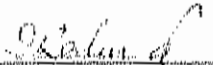
M en C. Aarón F. González Cordova

Director de Tesis



Dra. Belinda Vallejo Galland

Asesor



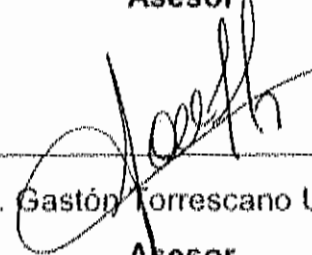
Dra. Alma Rosa Islas Rubio

Asesor



Dra. Armida Sánchez Escalante

Asesor



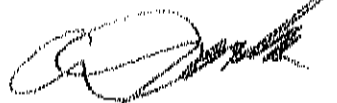
Dr. Gastón Torrescano Urrutía

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 de tesis.



Dr. Alfonso A. Gardea Béjar

Director General

DEDICATORIA

A Dios...

Por permitirme conquistar una meta más en mi vida, por darme fortaleza y valor para concluir esta etapa y por miles de bendiciones que has puesto en mi camino...

A mi Esposo...

Edgar, con tu amor, apoyo, paciencia y confianza has contribuido considerablemente a que haya alcanzado este logro; desde hace 12 años que Dios cruzó nuestros caminos me has brindado tu amistad con un amor sincero, completo y puro... Gracias por permitirme crecer día a día, no solo profesionalmente sino también como persona y esposa; por tus consejos, tus palabras de aliento para impulsarme a seguir, por todas y cada una de tus acciones que me demuestran tu amor. Tenerte y pensar en ti me inspira a seguir conquistando nuevos horizontes... Te Amo Preciosos!

A mis padres...

Por ayudarme a crecer en todos los aspectos de mi vida, por poner en mí un pensamiento de superación constante, por manifestarme su amor incondicional en todas y cada una de las decisiones que he tomado; por su confianza, su entrega y su enorme paciencia...

Ustedes son un gran ejemplo para mí como padres, amigos, esposos y por su espíritu de lucha constante para lograr obtener lo que hoy poseen. Gracias por sus oraciones, sus consejos, por enseñarme el camino correcto... Este logro es también de ustedes... Los Quiero Mucho!

A mi Familia...

A mis hermanas, Rosa Hilda (Flaquita), Laura Isela (Laureana), Sonia (Lala), Norma (Normis) y Aracely (Ara) gracias por su cariño, su paciencia cuando era pequeña y aun todavía. Cada una de ustedes me ha enseñado algo en la vida, son un ejemplo para mí. Gracias también a mis cuñados y por supuesto a mis hermosas sobrinas y guapos sobrinos, que con su alegría y travesuras han contribuido a colmar mi vida de mayor felicidad. Los Adoro Familiar!

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la vida y por estar conmigo siempre a pesar de todo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico recibido durante el desarrollo de la maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), por permitirme ser parte de este centro y conocer el avance de la ciencia.

A la Dirección de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (DTAOA), por las facilidades brindadas durante estos dos años.

Al M. en C. Aarón F. González Córdova, por su paciencia, su apoyo incondicional, sus consejos para el desarrollo de este trabajo y por conseguir el material del proyecto de una manera rápida y eficaz para terminar a tiempo.

A la Dra Belinda Vallejo Galland, por sus sugerencias para este trabajo.

Al Comité de Tesis integrado por la Dra. Alma Rosa Islas, la Dra. Amida Sánchez y el Dr. Gastón Torrescano. Por sus sugerencias y su tiempo invertido en las reuniones para enriquecer con sus consejos este trabajo de tesis.

A la Dra. Alma Rosa Islas, por su apoyo invaluable dentro del comité y por permitirme el uso del texturometro del laboratorio a su cargo.

A la Dra. Ana María Calderón, por sus consejos para tener un mejor desarrollo académico, por su apoyo y su amistad.

Al Laboratorio de Marinos, Cereales y Proximal, por permitirme el uso de los equipos, en especial a las Maestras: María Elena, Guille y Gisela. También a Pame, Francisco y Erika Xavier.

Al Departamento de Cómputo por el apoyo técnico en especial a Alejandrina Coronado, Aurora Vidal y Felipe Isac.

A Todos los Panelistas que participaron desde la selección hasta el entrenamiento. En especial a Faby, Armando, Pedro, Elsa, Maricela, Giovanni, Elsa, Gerson, Libertad y Tere, gracias por su tiempo invertido en cada una de las evaluaciones.

A mis Compañeros y Amigos del Laboratorio de Lácteos, Mary Chuy, Faby, Francisco, Martín, Roberto, Carmen, por su apoyo, consejos y amistad.

A Todos mis Compañeros y Amigos de Generación, por su amistad, por los momentos de estudio compartidos, por sus consejos y por compartir conmigo momentos muy importantes en mi vida, en especial a Elsa, Eneida, Faby y Sara.

A Erik Ramírez, por tu amistad, apoyo y confianza en momentos muy importantes en mi vida.

Al personal de la biblioteca, por su amistad y su ayuda en las búsquedas bibliográficas, en especial al Sr. Gerardo, por sus pláticas y sus saludos que me hacían más tolerable el estrés de la maestría.

A los pastores de la Iglesia y a todas las personas que me acompañaron con sus oraciones.

A cada una de las personas que en algún momento me brindaron una sonrisa, un consejo, un abrazo, gracias porque esas muestras tan sencillas de cariño, es un aliciente enorme para seguir adelante y no renunciar.

**“Cuando falta el consejo fracasan los
planes; cuando abunda el consejo
prosperan”...**

Proverbios 15:22

RESUMEN

El entrecruzamiento covalente que cataliza la transglutaminasa (TGasa), otorga la posibilidad de modificar las propiedades funcionales de las proteínas contenidas en el alimento, debido a esta característica, ésta enzima ha sido utilizada en diversas industrias, sin embargo, en leche y derivados los estudios se han realizado sólo en sistemas modelo. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fué determinar el efecto de la adición de transglutaminasa microbiana (MTGasa) (0.003, 0.009 y 0.015%) sobre la textura instrumental y sensorial en el yogurt elaborado a partir de leche de bovino y compararlo con aquel elaborado con leche sin tratar. Para llevar a cabo lo anterior se estudiaron dos procedimientos: 1) Adición de la enzima post-pasteurización y 2) Adición de la enzima pre-pasteurización. Se elaboró un yogurt testigo (leche más cultivo iniciador) y un yogurt con adición de 3% sólidos de leche (tratamiento utilizado en la industria) para compararlos con los yogures elaborados con los diferentes niveles de MTGasa. Para todos los casos se elaboró yogurt a partir de leche entera y leche descremada y se evaluó: composición proximal, propiedades reológicas y sinéresis. El yogurt elaborado con la adición de MTGasa mostró mayor adhesividad, cohesividad, fuerza de gel y viscosidad, así como menor sinéresis ($p < 0.015$) conforme se incrementó la concentración de enzima, especialmente en el procedimiento 1. Para llevar a cabo el análisis sensorial, se seleccionó el procedimiento de acuerdo a donde se hayan obtenido los valores más altos en las mediciones reológicas y en menor sinéresis. Se seleccionó el procedimiento 1 y sólo tres tratamientos (0.09%, 0.15% de MTGasa y 3% de sólidos de leche). El análisis estadístico para la evaluación sensorial mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos utilizados, no así entre los panelistas. Se observó menor susceptibilidad a sinéresis al utilizar MTGasa; en textura los valores más elevados se obtuvieron en el tratamiento con 0.15% MTGasa. El yogurt Elaborado con dicha enzima mostró mayor firmeza y menor sinéresis. Estos resultados pueden ser útiles en la búsqueda de opciones que permitan la sustitución de estabilizantes y/o sólidos de leche durante la elaboración del yogurt.

menor i, inón1si:, So selm::cionó el procedirnienlo ·1 y sólo lns lnnlnrnienlos (0.09% i, O.15% i dH MTGnsa y 3% de sólilos de loche). El ontalisis i, tar:llslico jwra la evaluación senso1ial moslrú diforenci signifk;1, liva ($p < 0.0:$) enl.re los 1.ralnlnienlos utilizados, no así enlre los 1mnelisl,,H,;. Se observó ln()nor sw, ceplibilidad a ::inóro::;is 1l ulilizar MTGasa; on tcixtun:i los wilor(:)s n1ém elevados se olluvieron en el 1rala1nienlo con 0.15% MTGasa. El yogur! dollormhJ con diclw enzima moslrú mayor finneza y monor ,,lnémsis. Estos resullaclo:, pueden ser útiles en la liúsqueda 1b opciones que ponnilan la strnlilución de estabilizantes y/o sólidos de leche duranlo la elallo1'é11,ión del yogurL

INTRODUCCIÓN

El entrecruzamiento que lleva a cabo la transglutaminasa (TGasa) con las proteínas contenidas en los alimentos, modifica: la solubilidad, hidratación, carga y movilidad molecular, así como también las propiedades reológicas y de emulsificación, produciendo con ello un cambio en las propiedades funcionales de los mismos. La mayoría de las proteínas alimentarias son buenos sustratos para la TGasa y entre las proteínas lácteas, las caseínas son un excelente sustrato, debido principalmente a su naturaleza flexible y a su bajo grado de estructura terciaria, lo que permite la exposición de los grupos reactivos a la enzima, en contraste con las proteínas globulares que primero deben ser desnaturalizadas para poder utilizarlas como sustrato (Motoki y Nio, 1983; Dickinson y Yamamoto, 1996; O'Sullivan et al., 2001; O'Connell y Kruif, 2003).

La enzima TGasa cataliza la formación de entrecruzamientos covalentes entre las proteínas de la leche mediante una reacción de transferencia entre un grupo acilo y un grupo γ -carboxiamida de la unión peptídica de residuos glutamina, lisina y aminas primarias. La habilidad que posee la TGasa para catalizar este entrecruzamiento intermolecular covalente en las proteínas lácteas, genera la formación de una red tridimensional sólida otorgando con ello una textura deseable en el alimento, lo que nos da la posibilidad de crear o mejorar propiedades de geles tradicionales (Motoki y Noriki, 1983; Dickinson y Yamamoto, 1996; Dickinson, 1997;

Motoki y Seguro, 1998; Matsumura et al., 2000; Gerrard, 2002). El yogurt es un gel tradicional, de acuerdo a la NOM-185-SSA1-2002 se define como: el gel obtenido por fermentación de la leche utilizando un cultivo iniciador (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) cuyo resultado es la reducción del pH, adicionado o no de aditivos para alimentos e ingredientes opcionales.

Durante la elaboración del yogurt es importante considerar dos aspectos: las variaciones en la consistencia (viscosidad y firmeza) y la sinéresis (expulsión de suero), ya que éstas son dos características sensoriales importantes para los consumidores. Tradicionalmente, la manera más fácil de mejorar los defectos en estas características es mediante el uso de estabilizantes (gomas, pectinas, almidón modificado, carrageninas, entre otros) y/o con sólidos de leche (Keogh y O'Kennedy). Estas adiciones son utilizadas por la industria, para mejorar o enmascarar deficiencias en el proceso de elaboración y en la calidad de la materia prima, situación que incrementa los costos de producción (Velázquez, 2003). Por lo anterior, es interesante estudiar un método alternativo para mejorar la textura deseada en el yogurt, buscando sustitutos adicionales a los ya utilizados.

Como método alternativo se estudia la modificación enzimática, que ha sido sugerida por su utilidad para mejorar la funcionalidad de las proteínas en sistemas alimentarios, debido a la alta especificidad de las enzimas y al bajo riesgo de formación de productos tóxicos (Faergemand et al., 1998; Faergemand y Qvist, 1999). La modificación enzimática mediante la adición de MTGasa en la producción de yogurt, puede ser una alternativa adicional al uso de estabilizantes y/o sólidos de

leche para obtener un producto firme y con poca sinéresis. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la adición de MTGasa (0.003, 0.009 y 0.015%) sobre la firmeza, consistencia, adhesividad, cohesividad, sinéresis así como evaluar los parámetros sensoriales de firmeza, viscosidad, aroma, sabor y acidez característico a yogurt, elaborado a partir de leche de bovino entera y descremada y compararlo con aquel elaborado con leche sin tratamiento enzimático.

ANTECEDENTES

Yogurt

Históricamente, la acidificación de la leche se aplicó como un método de conservación. Actualmente los productos acidificados, como el yogurt, son altamente apreciados por su textura, sabor, variedad, consistencia y su imagen de producto sano y natural; estas características han contribuido a su popularidad y por ende a su crecimiento en el mercado mundial (Vasbinder et al., 2003; Jaworska et al., 2005).

En cada país existen legislaciones para definir y regular este alimento. En México, se cuenta con una Norma Oficial Mexicana, NOM-185-SSA1-2002, donde define al yogurt como producto lácteo fermentado obtenido de la fermentación de la leche mediante la acción de microorganismos específicos, cuyo resultado sea la reducción del pH, adicionado o no de aditivos para alimentos e ingredientes opcionales.

Existe también una Norma Mexicana, la NMX-F-444-1983, la cual define al yogurt natural, como el producto lácteo preparado a partir de leche entera, parcial o totalmente descremada, enriquecida en 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 delbrueckii* subsp *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.

Lee y Lucey (2004) definen al yogurt como un gel formado por la fermentación de la leche con una mezcla de bacterias termofílicas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*.

Proceso de Elaboración del Yogurt

El proceso de elaboración del yogurt es un arte que data de hace miles de años probablemente originario de Medio Oriente. Se utiliza para su manufactura leche de distintas especies animales, siendo el yogurt elaborado con leche de bovino el más consumido.

La Leche como Materia Prima

La leche presenta una estructura muy compleja, siendo sus principales constituyentes: agua, carbohidratos, grasa, proteínas y minerales. Estos compuestos se encuentran dispersos en dos sistemas coloidales, una emulsión (glóbulos grasos y sus membranas) y una dispersión (proteínas caseícas y séricas).

La leche posee dos grupos de proteínas: las proteínas del suero y las caseínas. Las caseínas constituyen la fracción mayoritaria y se le ha reconocido,

como el componente más importante en la manufactura del yogurt, ya que son las responsables de la firmeza del coágulo (Tamime y Robinson, 1991; Badui, 1999).

Proteínas del suero. Las proteínas del suero son proteínas globulares que presentan una hidrofobicidad relativamente elevada y sus cadenas peptídicas están muy compactadas. La mayoría de estas proteínas contienen una gran proporción de hélices α y la distribución de sus cargas es homogénea. Son muy sensibles a temperaturas altas y en menor grado al pH ácido, debido a que su mecanismo de estabilidad es por hidratación y no por carga eléctrica. Son las primeras proteínas de la leche en desnaturalizarse; dicha desnaturalización no causa una floculación, sino que precipitan sobre las micelas de caseína y se mantienen dispersas (Olguin, 2001; Walstra et al., 2001). Las proteínas del suero constan de ocho fracciones, entre las cuales destacan la β -Lactoglobulina (β -lg), la α -Lactoalbúmina (α -la), las inmunoglobulinas, la seroalbúmina y las proteosa-peptonas (Velázquez, 2003).

La β -lg es la proteína más abundante en el suero de la leche, es una proteína muy hidrofóbica, no contiene ésteres fosfato y sólo una pequeña cantidad de prolina. Contiene dos grupos disulfuro y un residuo de cisteína libre. Su grupo disulfuro le imparte características de estructura terciaria, y el sulfhidrilo libre la hace muy reactiva; de hecho, es la fuente más importante de sulfhidrilos en la leche (Olguin, 2001). Su solubilidad es muy dependiente del pH y fuerza iónica, pero no precipita por acidificación de la leche.

La β -lg es insoluble en agua pura y en la leche se encuentra en forma de dímero, ambas moléculas están fuertemente unidas entre sí, sobre todo mediante interacciones hidrofóbicas. El dímero se disocia a alta temperatura y en condiciones de pH más bajo, se asocia para formar un octámero (Nieuwenhuizen et al., 2004).

La α -la, tiene como función biológica participar como coenzima en la síntesis de la lactosa, ya que es parte constitutiva del sistema enzimático. Esta proteína es una molécula plegada de forma muy compacta y más o menos esférica, ligeramente dependiente del pH y la sal. No se asocia, excepto cuando la fuerza iónica del medio es muy baja (Walstra et al., 2001).

Las inmunoglobulinas suman aproximadamente 10% del total de las proteínas del suero; son glucoproteínas con alto grado de aminoácidos 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 de la leche que no ha sido sometida a tratamiento térmico (Badui, 1999).

Caseínas. La caseína se define como la proteína que precipita en la leche a un pH de 4.6 (correspondiente a su pH isoeléctrico), por lo tanto, no es soluble a dicho pH (Walstra et al., 2001).

Las caseínas son propensas a la asociación debido a su alta hidrofobicidad y a su peculiar distribución de cargas. Las principales interacciones involucradas en estos procesos son de naturaleza electrostática e hidrofóbica. El grado y tipo de asociación depende de las condiciones experimentales a las que se sometan, como el pH, temperatura y fuerza iónica (Fox, 1992).

La caseína no es una proteína globular; se asocia extensamente y se encuentra en la leche en forma de grandes agregados, las micelas de caseína, que también contienen fosfato cálcico coloidal (PCC) (Lucey, 2002).

Las caseínas poseen 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. El iminoácido prolina (muy abundante y distribuido homogéneamente a lo largo de la estructura primaria de las caseínas) por impedimento estérico provoca, que no se formen hélices como estructura secundaria, sólo forman α hélices cortas (Badui, 1999; Velázquez, 2003).

La caseína está constituida por 4 fracciones principales: α_{s1} , α_{s2} , β y κ -caseína. La mayor parte de las κ -caseínas están glicosiladas. Las α_s y β -caseínas son fosfoproteínas que tienen su grupo esterificando a la serina; estas caseínas precipitan en presencia de iones Ca^{+2} , pero la κ -caseína las "protege" frente a la precipitación; es decir, su presencia estabiliza las micelas. Además, las β -caseínas contienen un gran número de residuos de prolina (Walstra et al., 2001), lo que las

hace tener una estructura al azar, resistente a la desnaturalización térmica (Badui, 1999).

Las caseínas tienen una carga elevada, muchos residuos de prolina y pocos de cistina. Esto no significa que las moléculas estén enrolladas aleatoriamente, pero en soluciones diluidas las cadenas están parcialmente desplegadas. Debido a la exposición de grupos hidrofóbicos, se establecen fácilmente enlaces hidrofóbicos entre las moléculas. Por lo anterior, las caseínas muestran amplias asociaciones, tanto en el interior de una misma molécula como entre ellas (Walstra et al, 2001).

Todas las caseínas tienen regiones con alta hidrofobicidad por su contenido de aminoácidos aromáticos o alifáticos (triptófano, 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 (Velázquez, 2003).

Modelo y descripción de las micelas de caseína. El hecho de que la caseína no se encuentre en la leche en disolución, sino en forma de micelas, tiene importantes consecuencias sobre las propiedades de la leche. Las micelas de caseína (Figura 1) son las principales responsables de la estabilidad física de los productos lácteos durante el tratamiento térmico, su concentración y el almacenamiento, así como de las propiedades reológicas de los productos fermentados (Walstra et al., 2001).

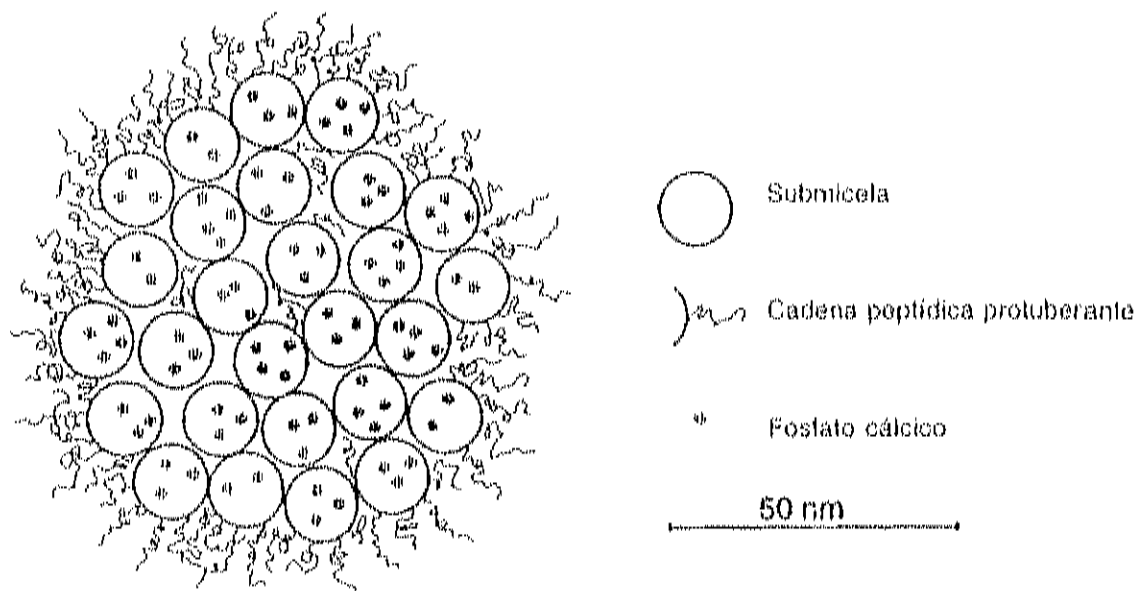


Figura 1. Modelo esquemático de una micela de caseína.

Fuente: Walstra et al, 2001.

Las micelas de caseína en leche recién ordeñada y sin refrigerar se presentan de forma esférica con un diámetro que varía entre 40 y 300 nm de diámetro y cada micela está constituida por 10^4 moléculas de caseína (Fox y McSweeney, 1999).

Las micelas de caseína son grandes agregados de los cuatro componentes principales de esta proteína (α_{s1} , α_{s2} , β y κ), además de fosfato cálcico y pequeñas cantidades de magnesio, sodio, potasio y citrato (Fox, 1992). Son voluminosas y contienen más agua que extracto seco (Badui, 1999).

Se han propuesto numerosos y diferentes modelos para conocer la estructura de la micela caseica; esta varía debido a la complejidad y al gran tamaño de las micelas que forma, lo cual limita una determinación inequívoca y directa de dicha estructura (Fox, 1992). Algunos de los modelos describen que la micela está formada de partículas más pequeñas llamadas submicelas, unidas entre sí por enlaces hidrofóbicos y puentes salinos (formados por el fosfato cálcico coloidal) (Walstra et al., 2001).

No todas las submicelas presentan la misma composición. Esencialmente, hay dos tipos principales: con o sin (o con muy poca) 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 (Lucey, 2002; Walstra et al., 2001).

Las micelas de caseína se modifican como consecuencia de cambios en las condiciones externas, como la temperatura y el pH. Algunas de estas alteraciones son reversibles, pero otras no lo son, o son sólo parcialmente reversibles (Walstra et al., 2001).

A baja temperatura se produce la solubilización de una gran parte de la β -caseína. Esta se encuentra incluida en las submicelas sueltas. La causa principal de la disolución es que las fuerzas hidrofóbicas que la mantienen unida en las submicelas, son mucho más débiles a baja temperatura. Todos los cambios que se producen en las micelas, modifican las propiedades de la leche; por ejemplo, la viscosidad aumenta significativamente (Walstra et al., 2001; Amiot, 1991).

A alta temperatura las micelas se encogen y aumenta la cantidad de fosfato coloidal. A temperaturas superiores a 70° C las moléculas de caseína se vuelven flexibles, como si parte de la estructura de las submicela se fundiera. A temperaturas más altas (100° C) se disuelve parte de la κ -caseína. Se produce otro cambio a alta temperatura, las proteínas del suero se asocian con las micelas de caseína durante su desnaturalización térmica uniéndose a su superficie. La asociación puede explicarse por la formación de enlaces disulfuro (-S-S). Un ejemplo es la asociación de la β -lg con la κ -caseína (Figura 2).

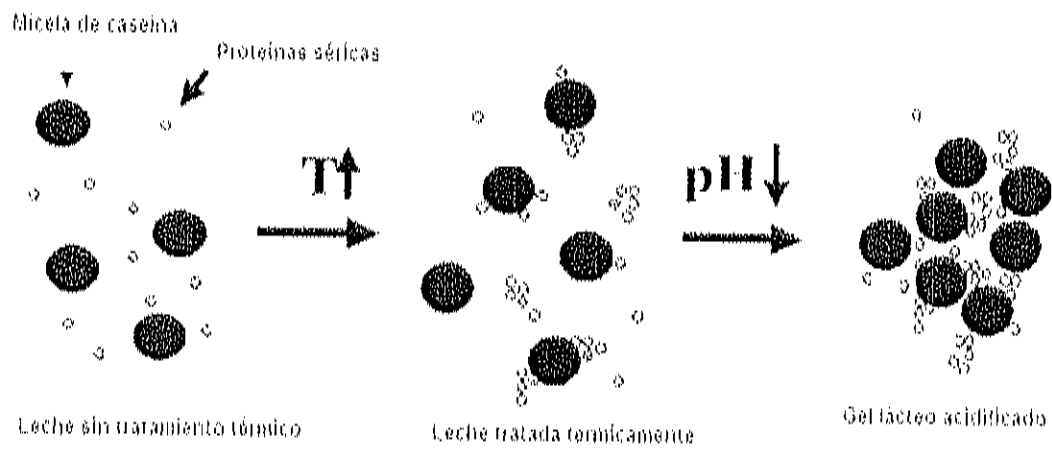


Figura 2. Representación esquemática de la asociación de micelas caseínicas con proteínas séricas.

Fuente: Vasbinder et al., 2003.

Como consecuencia del descenso del pH se producen cambios en las micelas. A pH fisiológico las micelas se mantienen intactas, debido fundamentalmente al PCC. Cuando el pH desciende, el fosfato cálcico se disuelve y los enlaces se van debilitando cada vez más. Por tanto, se produce el hinchamiento de las micelas y la disolución de parte de la caseína. A pH bajo, los puentes salinos internos entre los grupos de la proteína cargados positiva y negativamente mantienen las moléculas unidas. La atracción total es más fuerte cerca del pH isoelectrónico de la caseína, es decir, 4.6, provocando la coagulación de la micelas (Walstra et al., 2001).

Cultivos Iniciadores del Yogurt

Las bacterias acidolácticas (BAL) son microorganismos utilizados en la producción de leches fermentadas. Los cultivos iniciadores que son parte importante en la elaboración del yogurt son: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*. Estas bacterias son Gram positivas, su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 40 – 45° C, por lo que se consideran microorganismos termófilos (Tamime y Robinson, 1991).

Entre las BAL, se establece un fenómeno de mutua estimulación del crecimiento (simbiosis). Las bacterias proteolíticas (los lactobacilos) favorecen el crecimiento de los estreptococos por formación de péptidos pequeños y aminoácidos, principalmente valina. Los cocos potencian el desarrollo de los bacilos

produciendo purina, pirimidina, CO₂ y ácidos fórmico, oxalacético y fumárico. Estas dos bacterias deben encontrarse en un número aproximadamente igual (relación 1:1) para que el sabor característico del yogurt se desarrolle satisfactoriamente (Shah, 2001; Walstra et al., 2001).

Proceso de Fermentación en el Yogurt

Las BAI. obtienen su energía a través de la fermentación de los carbohidratos; siendo la lactosa el único azúcar presente en la leche y utilizado para este fin por los microorganismos del yogurt (Tamime y Robinson 1991).

El catabolismo de la lactosa por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* tiene lugar en el interior de la célula microbiana, por lo que el paso inicial es el transporte de las moléculas de lactosa a través de la pared celular. Existen para este transporte dos posibles mecanismos (Figura 3):

a) *Sistema fosfoenol-piruvato fosfotransferasa dependiente (PEP/PTS)*, en donde la lactosa es transformada a lactosa-fosfato (lactosa-P) y transportada al interior de la célula. Allí, una fosfo-β-galactosidasa (P- β-gal), hidroliza la lactosa-P para formar glucosa y galactosa-6-fosfato (galactosa-6-P). La glucosa se metaboliza hasta piruvato por la vía de Embden Meyerhof (EMP) y el piruvato se convierte en ácido láctico por la lactato deshidrogenasa. El metabolismo de la galactosa- 6 - P es diferente, primero se convierte en gliceraldehido- 3- P por la ruta

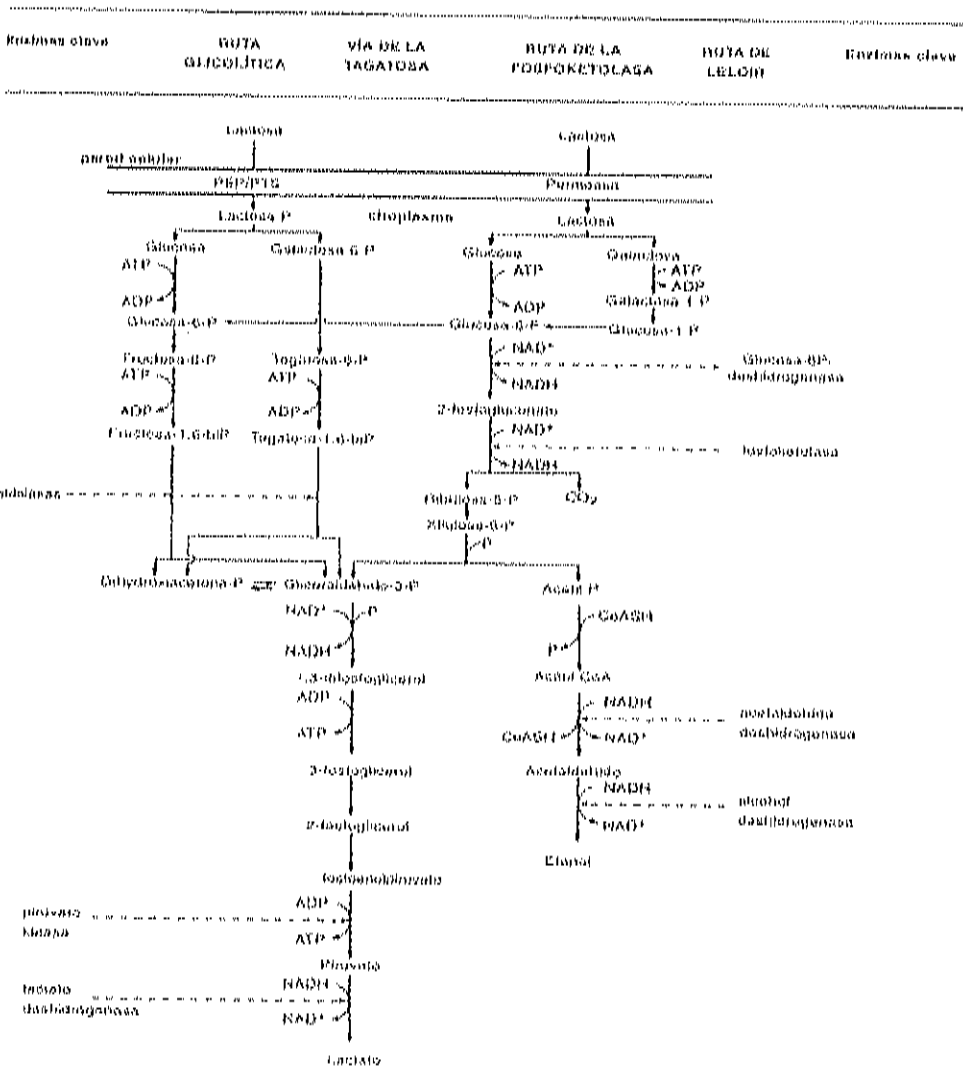


Figura 3. Metabolismo de la lactosa en las bacterias lácticas.
Fuente: Modificado según T. M. Cogan y C. Hill, 2001

D- galactosa-6-P y posteriormente, el gliceraldehido-3-P es catabolizado hasta piruvato y ácido láctico por el ciclo glucolítico (Walstra et al., 2001).

b) *Sistema permeasa ATP-dependiente*, en donde la lactosa es transportada como tal y se hidroliza para formar glucosa y galactosa por una β -galactosidasa (β -gal o lactasa). La glucosa es a su vez convertida en glucosa-6-P. Las bacterias fermentadoras de galactosa forman también glucosa-6-P a partir de la galactosa por la ruta de Leloir. El sistema permeasa es el dominante en las bacterias homofermentativas termófilas. En *Streptococcus thermophilus* no hay ninguna actividad P- β -gal. Cuando no existen las enzimas de la ruta de Leloir, la galactosa no se hidroliza; éste es el caso de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. La galactosa es secretada o se transforma en (exo)polisacáridos (Tamime y Robinson, 1991; Walstra et al., 2001).

Compuestos Responsables del Sabor y Aroma en el Yogurt

Tanto *Streptococcus thermophilus* como *Lactobacillus bulgaricus* producen sustancias que, además de contribuir a la estructura y consistencia del yogurt, determinan su sabor característico. Los principales compuestos son:

a) Ácido láctico. Los dos microorganismos forman ácido láctico a partir de la glucosa. La galactosa resultante de la hidrólisis de la lactosa no se metaboliza y por lo tanto la concentración molar de la galactosa aumenta paralelamente a la reducción del contenido de lactosa. Casi toda la glucosa se descompone vía

homofermentativa. *Streptococcus thermophilus* forma ácido L(+) láctico, mientras que *Lactobacillus bulgaricus*, lo produce en forma D(-). También generan CO₂, ácido acético y etanol, pero en cantidades muy pequeñas (Alonso y Fraga, 2001; Walstra et al., 2001; Frengova et al., 2000).

b) Acetaldehído. Este compuesto es fundamental en el aroma del yogurt. La mayor parte de este aldehído es sintetizado por los lactobacilos, principalmente a partir de treonina, que es un aminoácido que se encuentra en baja concentración en la leche. Además, debido a la proteólisis que llevan a cabo los lactobacilos también se produce treonina. La formación de acetaldehído empieza a un pH de 5, alcanza su máximo a pH 4.2 y se estabiliza a pH 4 (Tamime y Robinson, 1991).

c) Diacetilo. *Streptococcus thermophilus* y en menor grado *Lactobacillus bulgaricus* producen diacetilo. El ácido pirúvico formado en la fermentación de la lactosa es el único precursor del diacetilo (Frengova et al., 2000; Walstra et al., 2001).

El aroma típico del yogurt se debe también 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. Así mismo, los productos finales de la degradación de grasa contribuyen significativamente al aroma del yogurt (Velázquez, 2003).

Tecnología para la Elaboración del Yogurt

La tecnología del yogurt se puede resumir en seis pasos: 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, 1991).

En el proceso de elaboración del yogurt se produce una disminución del pH debido a la fermentación de la lactosa. Esta disminución trae como consecuencia la formación de un coágulo ligero y uniforme. El coágulo formado en el yogurt 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 (Lee y Lucey, 2004; Tamime y Robinson, 1991). El proceso de formación del coágulo varía de acuerdo a la disminución del pH y cuando éste alcanza un valor de 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 cuando el pH oscila entre 4,2 a 4,7 (Tamime y Robinson, 1991).

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 consistencia firme, está relacionado con un tiempo largo de acidificación, lo cual indica un efecto positivo en la textura desarrollada,

independientemente del pH final. Sin embargo, también se ha encontrado que una acidificación lenta puede hacer el gel más susceptible a la sinéresis (Lee y Lucey, 2004).

Durante el tratamiento térmico (85° C/30 min) se desnaturaliza el 60-90% de las proteínas del suero, exponiendo sus radicales libres -SH, por lo tanto existirá una tendencia de las caseínas a unirse mediante puentes disulfuro. Esta interacción hace que el coágulo sea más firme, uniforme y estable; dando mejor consistencia al producto terminado (Tamime y Robinson, 1991; Walstra et al., 2001).

Propiedades Físicas del Yogurt

La existencia de una red continua en el yogurt significa que es un gel, un material viscoelástico (comportamiento intermedio entre sólido y líquido caracterizado por una respuesta intermedia entre elástica y viscosa) (Goycoolea, 2002) que se caracteriza por un esfuerzo para fluir bastante pequeño. Cuando el gel se rompe, como ocurre en el yogurt batido, se obtiene un líquido no-Newtoniano bastante viscoso; que experimenta una fuerte fluidificación por cizalla y por lo tanto tiene una viscosidad aparente.

Características de textura. Existen varias técnicas para medir la firmeza del coágulo, como las pruebas de penetración-compresión y reología dinámica oscilatoria (Suwonsichon y Peleg, 1999). Aunque la reología dinámica es una

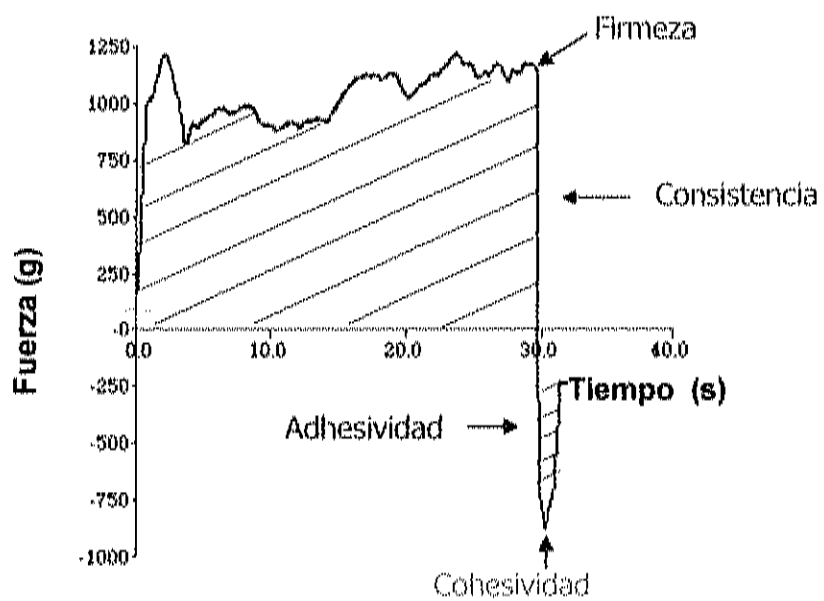


Figura 4. Curva típica de una prueba de medición de la fuerza de compresión con extrusión en reversa, utilizando el analizador de textura TA-XT2.

técnica eficaz, 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 (Velázquez, 2003).

Una desventaja que presenta el yogurt es que siendo un fluido no-Newtoniano, no da lecturas estables de viscosidad con el viscosímetro Brookfield. Una alternativa muy práctica para la evaluación de la textura es el uso del analizador de textura TA-XT2 utilizando una prueba de medición de la fuerza en compresión con celda de extrusión en reversa. Esta técnica permite obtener curvas (Figura 4) que proporcionan datos sobre los siguientes parámetros:

a) Fimeza o fuerza de gel: es la fuerza requerida para penetrar la superficie del yogurt a una cierta distancia (Hess et al., 1996)

b) Consistencia: característica que se relaciona con 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.

c) Cohesividad: es la fuerza de las uniones internas que dan cuerpo al producto (Giese, 1995). El máximo valor negativo representado en la curva.

d) Adhesividad: es 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 (Rawson y Marshall, 1997).

Sinéresis. Las propiedades físicas del gel del yogurt y la sinéresis (separación del suero) juegan un papel muy importante en su calidad y aceptación por el consumidor.

La sinéresis es uno de los defectos físicos más difíciles de controlar durante la manufactura del yogurt. Este fenómeno se debe fundamentalmente a una reorganización de la estructura gelificada, perdiendo la capacidad de retener la humedad que fue originalmente atrapada en el gel, mermando con esto el rendimiento. Para prevenir la sinéresis, mejorar la textura y las demás propiedades físicas del yogurt, se incrementa el contenido de sólidos de leche o se adicionan estabilizantes (ej., gelatina, pectina, almidón, concentrado de proteína de suero, o varios tipos de gomas) (Tamime y Robinson, 1991; Lucey, 2002). Sin embargo, éste problema prevalece actualmente en varias industrias del mercado nacional e internacional, adicionan mezclas de estabilizantes y sólidos de leche durante la elaboración del yogurt, según lo declaran en el etiquetado.

Relación entre Atributos Sensoriales y Perfil de Textura Instrumental

La evaluación de textura es un paso importante en el desarrollo de nuevos productos o para optimizar variables durante el procesamiento de un alimento. Tanto las técnicas de evaluación sensorial como las mediciones instrumentales son utilizadas para investigar y determinar los parámetros de textura de un alimento, y

de esta manera conocer la aceptación por parte del consumidor (Meullenet et al., 1998).

Las características sensoriales en el yogurt se deben a la 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 yogurt. Para obtener un producto con excelentes características sensoriales y propiedades reológicas, es de gran importancia cuidar las etapas del proceso y la calidad de la materia prima (Velázquez, 2003).

Tipos de Yogurt

En el mercado se encuentran varios tipos de yogurt: firme, batido y líquido y su fabricación (Figura 5) difiere en varias operaciones unitarias. Entre el yogurt firme y batido las principales diferencias radican en que el primero fermenta en el interior del envase, lo que implica que el gel no se rompa, mientras que el yogurt batido y el líquido sufren una agitación después de terminada la incubación. El yogurt batido presenta tendencia a la sinéresis, y para evitar este defecto y mejorar la consistencia normalmente se añade algún agente gelificante (Tamime y Robinson, 1991).

El yogurt batido puede elaborarse mediante proceso continuo. Este método presenta muchas ventajas, entre las principales un mejor control de la fermentación y mínimas pérdidas del producto. Durante la elaboración del yogurt firme, es posible

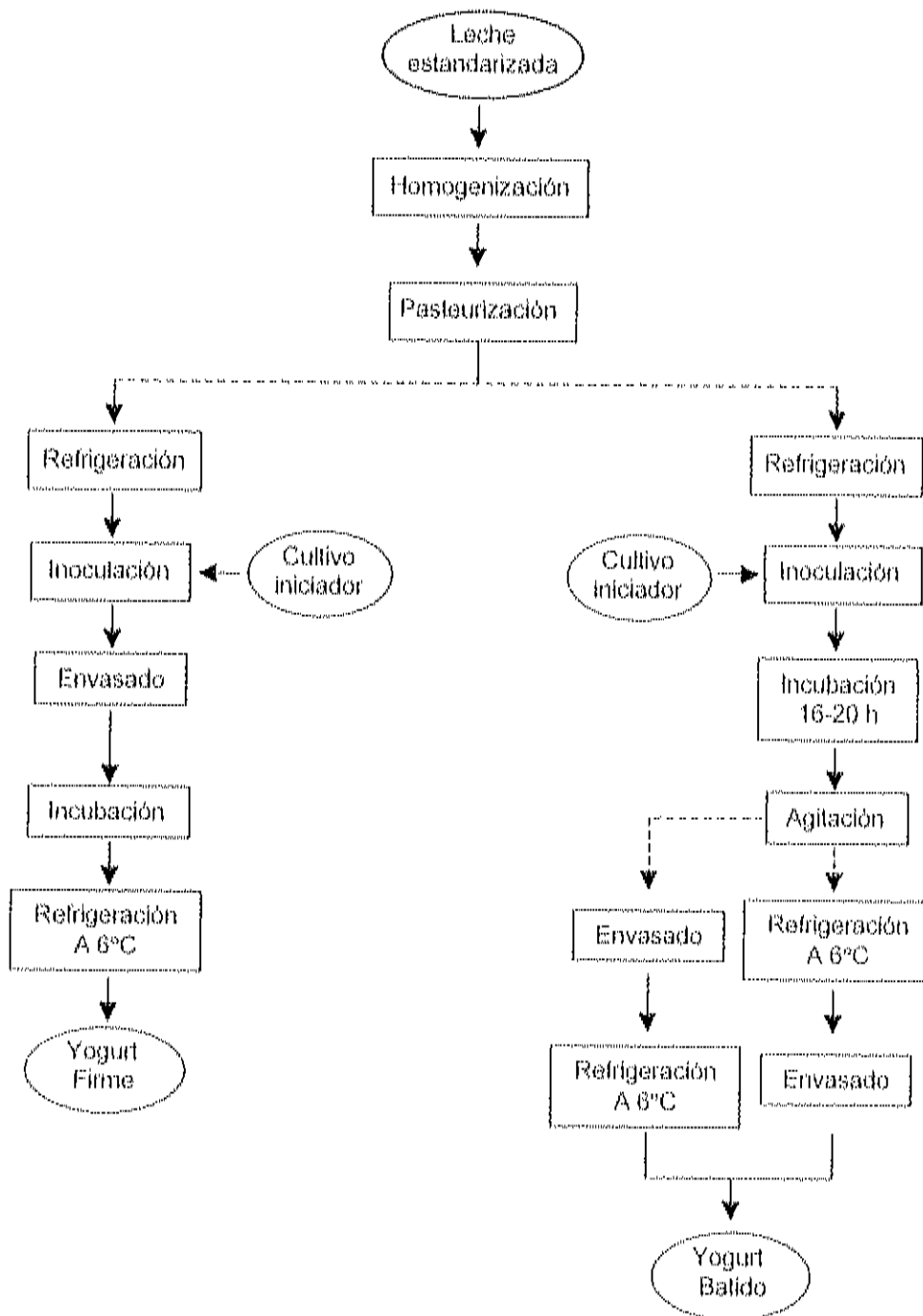


Figura 5. Proceso de elaboración de yogurt firme y yogurt batido.

Fuente: Walstra et al., 2001.

realizar en proceso continuo la preincubación hasta una etapa en donde la leche todavía no ha coagulado; para evitar la aparición de defectos de textura (Fox y McSweeney, 1999).

Uso de Estabilizantes

Actualmente, la producción del yogurt tiende a concentrarse en grandes y modernas industrias lácteas, las cuales para mejorar ciertas características de este producto, recurren al uso de estabilizantes y/o emulsificantes. La finalidad de la adición de los estabilizantes es mejorar y mantener las características deseables del yogurt, es decir, textura, viscosidad/consistencia, aspecto y cuerpo (Hess et al., 1996).

Los estabilizantes tienen básicamente dos funciones: la retención de agua y aumentar la viscosidad del producto. Las moléculas de los estabilizantes son capaces de formar una red mediante enlaces entre los mismos o distintos componentes de la leche, debido a la presencia de grupos cargados negativamente, como por ejemplo, grupos carboxilo, o a la presencia de grupos capaces de secuestrar iones calcio (Chavarría, 1999).

Existe una variedad de compuestos (carrageninas, gomas, almidón modificado, gelatina, pectinas, entre otros) que pueden ser adicionados a la leche con objeto de lograr una adecuada textura en el yogurt (Lee et al., 1990). Estos pueden ser adicionados a la leche solos o como mezclas, siendo este último lo más

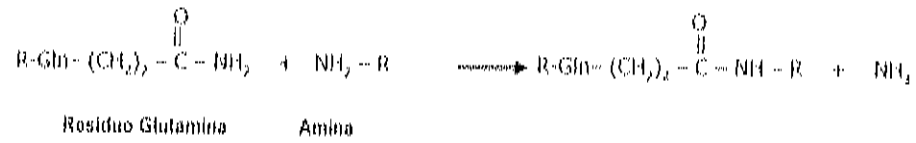
frecuente, ya que las preparaciones comerciales son una combinación de diversos estabilizantes, lo que hace que se eleven los costos de producción en el yogurt.

Schorsch et al. (2000), O'Sullivan et al. (2002a; 2002b), Motoki y Seguro (1998) entre otros investigadores, han estudiado el entrecruzamiento de diversas proteínas catalizadas por la enzima TGasa y han logrado obtener resultados interesantes respecto a geles lácteos, por lo que podría utilizarse esta enzima en la elaboración del yogurt.

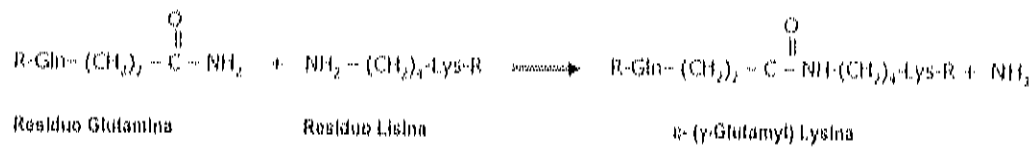
Reacciones Catalizadas por Transglutaminasa

La TGasa (proteína-glutamina γ -glutamyltransferasa, EC 2.3.2.13) modifica las proteínas principalmente por incorporación y entrecruzamiento de aminos (Figura 6) donde la enzima cataliza una reacción de transferencia entre el grupo γ -carboxiamida de la unión peptídica de residuos glutamina (donador acilo) y una variedad de aminos primarias (aceptor acilo), incluyendo el grupo ϵ -amino de residuos de lisina en ciertas proteínas. O a través de la deamidación, en donde en ausencia de aminos o residuos lisina, la enzima utiliza una molécula de agua como acepto acilo dando lugar a la hidrólisis del grupo γ -carboxiamida del residuo glutamina. (Motoki y Seguro, 1998; Nielsen, 1995; Dickinson, 1997; Sharma et al., 2001; De Jong et al., 2003; O'Sullivan et al., 2001; O'Sullivan et al., 2002b).

(1)



(2)



(3)



Figura 6. Modificación de las proteínas por MTGasa. 1) Incorporación de aminas; 2) Entrecruzamiento; 3) Deamidación.

Fuente: O'Sullivan et al., 2001; Shama et al., 2001.

Origen, Características y Propiedades Enzimáticas de la Transglutaminasa

La TGasa se encuentra en diversas especies de plantas, peces y mamíferos (Motoki y Seguro, 1998). Hasta hace pocos años, el hígado del cerdo de guinea había sido la única fuente de TGasa comercial. Sin embargo, la escasez de la fuente y el complicado procedimiento de separación y purificación para su obtención a partir de tejidos, resulta en un precio extremadamente alto (65 dls por unidad aproximadamente). Consecuentemente, es casi imposible utilizar la TGasa de tejidos de animales en el procesamiento de alimentos a escala industrial (Matsumura et al., 2000; Meiying et al., 2001; Lin et al., 2004). Por lo anterior, recientemente se ha desarrollado la producción de TGasa de origen microbiano. Para esto, diversos investigadores han utilizado la manipulación genética en microorganismos (*Escherichia coli*, *Bacillus*, levaduras y *Aspergillus*) con la finalidad de obtener grandes cantidades de TGasa a bajo precio. Sin embargo, ninguna de estas TGasas ha sido comercializada debido a la regulación de los alimentos (Motoki y Seguro, 1998).

Ando et al. (1989) mediante diversos estudios lograron identificar un microorganismo que libera la enzima dentro del caldo de cultivo (mediante fermentación), esta enzima fue nombrada como transglutaminasa microbiana (MTGasa). El microorganismo fue taxonómicamente clasificado como una variante de *Streptoverticillium mobaraense*. Su purificación mostró ser fácil por lo que su comercialización ha sido acelerada.

Estudios mediante la aplicación de técnicas electroforeticas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y cromatografía de permeación han permitido determinar el peso molecular de esta MTGasa, el cual es de 40 000 Da., aproximadamente. Otras técnicas como la degradación de Edman y recientemente la espectrometría de masas, revelaron su estructura primaria, demostrando que comprende 331 residuos de aminoácidos, y la secuencia completa indica que contiene un solo residuo de cisteína. El peso molecular calculado de la composición de aminoácidos (331) es 37, 842 Da., el cual es similar al obtenido experimentalmente. La MTGasa es, por lo tanto, considerada una proteína monomérica y simple, su punto isoeléctrico es aproximadamente de 8.9 (Ando et al., 1989; Dickinson, 1997; Motoki y Seguro, 1998; Schorsch, 2000a) y se considera estable en un amplio rango de pH. El pH óptimo es de 5 - 8, sin embargo, podría expresar actividad enzimática a pH de 4 ó 9. En un trabajo realizado por Motoki y Seguro (1998), esta enzima mostró una temperatura óptima de 50° C durante 10 minutos, perdiendo su actividad pocos minutos después durante calentamiento a 70° C. Así mismo, expresó actividad a 10° C y la mantuvo aún arriba del punto de congelación (Flanagan et al., 2003).

La MTGasa proveniente de *Streptovorticillium mobaraense* es totalmente independiente de Ca^{+2} , siendo una característica muy útil en la modificación de las propiedades funcionales de ciertas proteínas presentes en los alimentos, ya que muchas de las proteínas, como las caseínas, precipitan en presencia de Ca^{+2} . Por ello, el uso de la MTGasa es absolutamente único en comparación con las enzimas

provenientes de mamíferos que requieren Ca^{+2} para expresar su actividad enzimática (Moloki et al., 1984; Dickinson, 1997; Faergemand y Qvist, 1999), además, procede de un microorganismo no toxigénico y no patogénico (FDA, 2002).

Reacción de la Transglutaminasa Microbiana con Proteínas Lácteas

Las caseínas reaccionan de diferente manera con la TGasa; la κ y α -caseínas muestran una mayor reactividad comparadas con la β -caseína. Esta diferencia se atribuye no sólo al contenido de residuos glutamina y lisina, sino también a la especificidad de la enzima. El aminoácido lisina es un buen sustrato para la reacción con MTGasa porque posee un grupo ϵ -amino como una amina primaria; en dicha reacción, las proteínas actúan como donadores acilo, mientras que el aminoácido lisina, actúa como aceptor acilo. Los péptidos que contienen glutamina actúan como donadores acilo, mientras las proteínas actúan como aceptores acilo (Motoki y Seguro, 1998; Kamiya et al., 2003; Tang et al., 2005).

La velocidad de entrecruzamiento de las proteínas, catalizada por la TGasa depende de la estructura macromolecular. Los residuos glutamina reactivos residen en regiones flexibles de la cadena polipeptídica o en regiones con comportamiento reversible; por lo tanto, las cadenas flexibles son un buen sustrato (Schorsch et al., 2000b).

Se ha demostrado que proteínas globulares como la β -lactoglobulina no son atacadas por la TGasa en su estado nativo. La susceptibilidad al entrecruzamiento de las proteínas globulares por efecto de la TGasa podría incrementarse ya sea mediante modificación química, rompimiento de uniones disulfuro intermoleculares o por adsorción de la interfase aceite-agua (Dickinson, 1997; O'Connell y Kruif, 2003; Nieuwenhuizen et al, 2004).

Ventajas de Geles Formados con MTGasa y Modelo Propuesto de Formación del Gel

Schorsch et al. (2000b) proponen los siguientes pasos durante la formación del gel de micelas caseícas tratadas con MTGasa:

1. La MTGasa es introducida en de la dispersión de micelas caseícas a pH neutro, las uniones covalentes se crean entre la superficie de las molécula y dentro de las micelas caseícas, mientras el pH disminuye.

El primer paso depende de la velocidad en que el pH y la temperatura disminuyen:

- a) Si el pH disminuye rápidamente, como por ejemplo por un proceso de acidificación con HCl, la enzima no tiene suficiente tiempo para entrecruzar las moléculas dentro de las micelas; obteniéndose un gel débil.

- b) Puede producirse un gel fuerte si el pH disminuye de manera lenta, esto se logra pre-incubando la enzima con la dispersión de caseínas por un corto tiempo a 50° C.

c) Si la temperatura no es suficientemente elevada, la cinética de formación del gel se realiza de manera lenta, lo cual provoca la precipitación de las caseínas más rápido que la velocidad del entrecruzamiento.

La razón por la cual se obtienen estos efectos es que el entrecruzamiento en la superficie o dentro de las micelas afecta la disgregación de β y α -caseína de la micela durante la acidificación. La disgregación se evita obteniendo micelas caseicas más estables y reforzadas (Figura 7).

2. El segundo paso es la agregación de las micelas de caseína reforzadas. Schorsch y col. (2000a; b) proponen que este fenómeno es debido a dos tipos de interacciones:

a) Interacciones físicas que permiten la agregación y

b) Interacciones covalentes que refuerzan la superficie exterior de los agregados caseicos. Esto significa que la enzima promueve el entrecruzamiento no solo en la superficie y en el núcleo de cada micela, sino también entre las micelas. Los resultados pueden explicarse ya que los agregados están más cercanos entre sí, debido a la reducción de la carga y a la disminución del pH.

El estudio del entrecruzamiento en las micelas caseicas inducido por el tratamiento con MTGasa, es de interés principal en la gelificación de la leche por dos principales razones prácticas y técnicas:

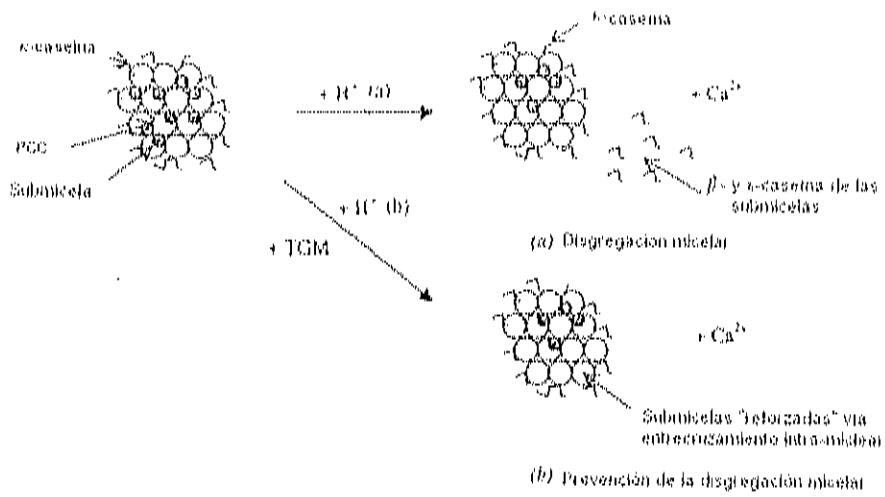


Figura 7. Representación esquemática del efecto de la MTGasa sobre la estructura micelar durante la acidificación.

Fuente: Schorsch et al., 2000b.

1.- Debido al entrecruzamiento intramolecular del núcleo de las micelas, la integridad de éstas se mantiene, lo que hace que la micela sea estable durante diversos tratamientos (ej. acidificación y/o enfriamiento);

2.- El entrecruzamiento intermicelar de las caseínas de la superficie de la micela (ej. entrecruzamiento de las micelas dentro de los agregados después de la precipitación en su punto isoeléctrico) se ve favorecido, por lo que la fuerza del gel formado por el entrecruzamiento de las micelas aumenta.

Los geles caseicos tradicionales producidos por acidificación y/o por coagulación se obtienen por interacciones físicas débiles, mientras que los geles caseicos tratados con MTGasa se obtienen por entrecruzamientos covalentes por lo que pueden elaborarse geles con diferentes características. Estos geles que contienen entrecruzamientos covalentes tienen interesantes características:

- a) Son geles mucho más fuertes (mayor viscoelasticidad),
- b) Se forman más rápidamente que los geles obtenidos de manera tradicional (acidificación o coagulación).
- c) No son dependientes de la temperatura.
- d) No exhiben sinéresis después de largo tiempo de almacenamiento.

Aplicaciones de Transglutaminasa Microbiana en Productos Lácteos

La β -lg es el mayor componente en las proteínas del suero de la leche y sus propiedades físicas son importantes para la textura de muchos derivados lácteos. La modificación de los residuos lisina de esta proteína debido a la acción de MTGasa, dio como resultado un derivado de β -lg con una mejor afinidad al agua y mayor estabilidad térmica durante la elaboración de productos lácteos. Este método de modificación ofrece la oportunidad de cambiar y mejorar las propiedades funcionales de la β -lg (O'Sullivan 2002a; Sharma et al., 2002).

Schorsch et al. (2000b) utilizaron una MTGasa independiente de Ca^{12} para la formación de geles simulando la gelificación de los productos lácteos. Sus investigaciones establecieron los mecanismos de formación de gel basándose en las condiciones de gelificación para controlar el entrecruzamiento inter e intramicelar de las caseínas. Estos geles poseen características interesantes al compararlos con los formados por acidificación tradicional o por el uso de enzimas proteolíticas. Estos geles son más fuertes, se forman más rápidamente, no son dependientes de la temperatura y no exhiben sinéresis después de un largo tiempo de almacenamiento.

La aplicación de la MTGasa en sistemas modelo de productos lácteos, demuestra el potencial de esta enzima para la elaboración de nuevos productos lácteos con propiedades tecnológicas de interés para la industria de alimentos.

Biodisponibilidad y Digestibilidad de Proteínas Entrecruzadas

El entrecruzamiento ϵ -(γ -glutamil) lisina ocurre de forma natural en tejidos de animales, plantas y en alimentos procesados, y esta formación se incrementa con el cocinado convencional. Por lo anterior, la seguridad de la molécula glutamina-lisina (G-L) se sustenta debido al consumo de ésta desde hace varios años. La unión G-L es resistente a la digestión de enzimas gastrointestinales de mamíferos, y esta unión es desdoblada posteriormente por enzimas del hígado. Como la lisina es un aminoácido esencial para los humanos y otros mamíferos, la presencia de este aminoácido puede ayudar a satisfacer los requerimientos nutricionales del cuerpo humano (Dickinson, 1997).

Friedman et al. (1990) demostró que el dipéptido G-L es metabolizado en ratas y la lisina es incorporada dentro del tejido animal.

La modificación de proteínas mediante el uso de MTGasa aparentemente no genera productos tóxicos, sabores indeseables, o pérdida significativa de nutrientes esenciales. No produce péptidos amargos, lo cual es una desventaja de las enzimas proteolíticas. Por lo tanto, el tratamiento con MTGasa proporciona excelentes oportunidades para aumentar las propiedades funcionales de las proteínas en diversos sistemas alimenticios (Dickinson, 1997; Motoki y Seguro, 1998).

Aprobación Regulatoria y Etiquetado en Alimentos

La FDA ("Food and Drug Administration" por sus siglas en inglés) de acuerdo a las conclusiones de un panel científico, ha considerado a la enzima MTGasa obtenida de la cepa S-8112 de *Streptoverticillium mobaraense* como: "Generalmente Reconocida como Segura" (GRAS), permitiéndose el uso de ésta en todos los productos regulados por este organismo para mejorar la textura y consistencia de los alimentos.

El USDA ("United States Department of Agriculture" por sus siglas en inglés) ha determinado que se declare el uso de la enzima en el etiquetado de los productos con los términos: "enzima" ó "enzima TG".

Las investigaciones realizadas a la fecha confirman la eficacia e inocuidad del uso propuesto de la transglutaminasa. El uso de esta enzima ha sido aprobado por Estados Unidos, Japón y la mayoría de los países europeos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos

Se utilizó un cultivo iniciador YC-X11^{MR}, compuesto por: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* (Chr. Hansen México). Los cultivos se adquirieron liofilizados y la inoculación fue directa, utilizándose la dosis recomendada por el fabricante (0.1%).

Enzima

MTGasa Ca⁺² independiente, derivada de *Streptoverticillium mobaraense* (ACTIVIA[®] TI) con actividad de 1,000 U/g fue proporcionada por Ajinomoto Co., a través de su representante en México, Consorcio Industrial Mexicano de Alimentos, S. A. de C. V. (Monterrey, N. L. México).

Obtención de Leche

Se utilizó leche fresca de la ordeña matutina proveniente de ganado Holstein Americano de un establo de la localidad (Hermosillo, Sonora, México).

Preparación de los Sólidos de Leche Descremada

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 Yogurt

Para la elaboración del yogurt con la enzima MTGasa se aplicaron dos procedimientos:

- 1) Adición de la enzima después de la pasteurización y
- 2) Adición de la enzima antes de la pasteurización.

Para estos dos procedimientos se estudiaron 5 tratamientos, tanto para leche entera como descremada y consistieron en:

Tratamiento A = Leche + Cultivo

Tratamiento B = Leche + Cultivo + 0.003% MTGasa

Tratamiento C = Leche + Cultivo + 0.009% MTGasa

Tratamiento D = Leche + Cultivo + 0.015% MTGasa

Tratamiento E = Leche + Cultivo + 3% Sólidos de leche

Los diferentes porcentajes de MTGasa utilizados (0.003-0.015%) se establecieron de acuerdo a los niveles máximo y mínimo recomendado por el proveedor de ACTIVIA[®] TI; además se incluyó un porcentaje intermedio (0.009%) con la finalidad de estudiar los parámetros sensoriales y de textura a dicho nivel de adición.

Preparación del Yogurt mediante Procedimiento 1

La leche fue llevada a temperatura de 65° C, y se homogenizó con un Multiquick (Braun, Gillet Comercial Operation, North America) durante 2 min; posteriormente se sometió a un proceso de pasteurización, el cual se realizó a 85° C durante 30 min (Tamime y Robinson, 1991). Una vez finalizado este tratamiento, se realizó un choque térmico a -20° C hasta alcanzar una temperatura de 2° C. La leche obtenida se refrigeró a 1.5° C para la elaboración del yogurt.

Para elaborar el yogurt control (tratamiento A), a la leche se le adicionó únicamente cultivo (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) a una temperatura de 43° C; para los tratamientos B, C y D se añadió la enzima y el cultivo a la misma temperatura (43° C). La leche utilizada en el lote E se calentó a 55° C para añadir 3% de sólidos de leche, homogenizándose con un Multiquick durante 20 s. Cuando la temperatura bajó a 43° C se adicionaron las cepas descritas anteriormente. Posteriormente la leche con el cultivo se depositó en vasos de 120 ml y se incubó a 43° C. La incubación se detuvo cuando el yogurt 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 posterior análisis, al día siguiente.

Preparación del Yogurt mediante Procedimiento 2

Para elaborar yogurt de acuerdo a los tratamientos A y E se manejó como se describe en el procedimiento anterior. La leche de los tratamientos B, C y D fue llevada a una temperatura de 50°C , adicionándose los diferentes niveles de MTGasa respectivos y se mantuvo durante 10 min. Transcurrido ese tiempo se continuó el calentamiento de la leche; cuando se alcanzaron los 65°C se homogenizó con Multiquick durante 2 min, y posteriormente se sometió al proceso de pasteurización a $85^{\circ}\text{C}/30\text{ min}$ (Tamime y Robinson, 1991) donde se inactivó la enzima. Las muestras obtenidas fueron refrigeradas a 1.5°C , hasta su posterior análisis al día siguiente.

Posteriormente, la leche de los tratamientos B, C y D se calentó a 43°C para llevar a cabo la inoculación con las cepas descritas anteriormente. A continuación la leche tratada se depositó en vasos de 120 ml y se incubó a 43°C . La incubación se detuvo cuando el yogurt 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 posterior al día siguiente.

pH

El pH se monitoreó utilizando un potenciómetro Orion modelo 710A (Orion Research Inc., USA). Las mediciones se iniciaron después de haber transcurrido una hora de incubación del yogurt hasta alcanzar un pH de 4.4 ± 0.06 .

Análisis Proximal

Las determinaciones de proteína, grasa y sólidos totales, se llevaron a cabo utilizando los métodos oficiales de la AOAC (2002).

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 120 mL que contenían 80 mL de yogurt. La medición se realizó uno a uno, inmediatamente después de retirarlos del refrigerador. La velocidad de prueba fue de 1mm/s y se registró la fuerza de

compresión a una distancia de 30 mm. La fuerza que se requirió para penetrar el coágulo a la distancia indicada se tomó como la fuerza de gel.

Consistencia, Adhesividad y Cohesividad

La medición de la fuerza de compresión proporcionó datos como consistencia, adhesividad y cohesividad. El valor de cohesividad se obtuvo cuando el disco, después de penetrar el gel y recorrer la distancia de 30 mm, regresa a la superficie de la muestra, éste valor máximo negativo representado en la curva se tomó como cohesividad (Bourne, 2002).

Susceptibilidad a Sinéresis

Este parámetro se evaluó al día siguiente de elaborar el yogurt y se determinó por diferencia de peso, al eliminar el suero expulsado utilizando una pipeta Pasteur de plástico, de acuerdo a la metodología descrita por Velázquez (2003).

Evaluación Sensorial

Entrevista Personal

Se entrevistó a un total de 25 sujetos de ambos sexos y cuyas edades oscilaban entre los 22 y 39 años, con preferencia por consumo de yogurt natural. A los aspirantes se les entrevistó individualmente, con la finalidad de conocer la disposición, interés y tiempos durante los cuales podrían participar en el entrenamiento (Pedrero y Pangborn, 1989). Los panelistas fueron estudiantes y personal que labora en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

Selección de Panelistas

Para medir la habilidad natural de los candidatos y seleccionarlos se efectuaron 15 pruebas triangulares (IFT, 1981; Pedrero y Pangborn, 1989; Anzaldúa-Morales, 1994). Estas pruebas consistieron en proporcionar a los panelistas dos muestras iguales de una determinada marca comercial de yogurt y una diferente. El criterio de selección para conformar el panel entrenado fue aquellos que acertaron el 85% (mínimo) de las 15 pruebas triangulares evaluadas (Anzaldúa-Morales, 1994).

Entrenamiento

El objetivo principal de esta etapa fue mejorar la habilidad natural del panelista para reconocer y describir los atributos de: acidez, sabor y aroma a yogurt, firmeza, viscosidad y expulsión de suero en dichas muestras. Así mismo, familiarizar a los panelistas con el tipo de prueba a realizar, los propósitos y alcances del estudio y la importancia de sus evaluaciones (IFT, 1981; González-Córdova, 1999).

El entrenamiento incluyó 10 sesiones de 1 hora cada una. Para cada atributo se utilizó como referencia un yogurt comercial y un yogurt testigo elaborado con leche mas cultivo (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus*). Durante el entrenamiento, los panelistas aprendieron a evaluar cada atributo utilizando una técnica diferente tal como se describe en la Tabla 1; posteriormente cada uno de estos atributos fueron evaluados sobre una escala no estructurada de 12.5 cm (Meilgaard et al., 1999) (Figura 8), donde el extremo izquierdo se reconoció "sin intensidad" y el extremo derecho como "máxima intensidad". La referencia utilizada para acidez fue tomada a partir de Drake et al. (2000), que correspondió a la mitad y al límite máximo de intensidad; mientras que el parámetro ideal para firmeza, sinéresis, sabor y aroma a yogurt se fijó en el límite máximo de intensidad.

Tabla 1. Atributos, referencias y técnicas de evaluación utilizadas para el entrenamiento.

<i>Atributo</i>	<i>Referencia/Técnica</i>
Acidez	Gusto básico simulado por los ácidos. Referencia: 0.08% ácido cítrico = 6.25; 0.15% ácido cítrico = 12.5
Sabor a yogur	La percepción del sabor a yogur al paladear el alimento en la boca.
Aroma a yogur	La percepción de los compuestos aromáticos al oler el alimento (sin ingerir el alimento).
Viscosidad	Yogur comercial para la viscosidad más baja y para la viscosidad más alta. La resistencia a fluir al cucharear el alimento (Duboc y Mollet, 2001).
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: Drake et al., 2000

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A. C.

Nombre: _____ **Fecha:** _____

Número de muestra: _____

Instrucciones: Pruebe las muestras (NO COMER) y note la intensidad de la característica en estudio. Califique cada atributo de acuerdo a la siguiente escala:

Sínéresis



Firmeza



Viscosidad



Aroma a yogur



Sabor a yogur



Acidez



Figura 8. Formato utilizado en el análisis descriptivo y evaluación de las muestras.

Diseño y Análisis Estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar.

Modelo:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Donde la variable independiente fueron los tratamientos y la variable dependiente la firmeza de gel, adhesividad, cohesividad, consistencia, sinéresis y parámetros sensoriales. Se realizó un Análisis de varianza (ANDEVA) para conocer la diferencia significativa ($p < 0.05$) en los tratamientos utilizados, empleando el programa NCSS versión 6.0. La comparación de medias se llevó a cabo utilizando la prueba de Tuckey-Kramer con un intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medición de pH

A diferencia de la acidificación química, la acidificación microbiana se desarrolló de forma lenta al inicio del periodo de incubación (Figura 9), esto último debido a la fase de adaptación de las bacterias (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*) al medio nutritivo. Esto representó un tiempo considerable en el que se pudo llevar a cabo el entrecruzamiento de las proteínas lácteas catalizadas por la MTGasa antes de que la disminución del pH retrazara la reacción enzimática (Faergemand et al., 1998; Nielsen, 1995).

En los yogures testigo, el adicionado con 0.003% y 0.009% de MTGasa fueron los tratamientos que utilizaron un menor tiempo de acidificación, el cual fue de 7 horas para alcanzar un pH de 4.4 ± 0.06 . La leche adicionada con 0.015% de MTGasa necesitó 8 horas para alcanzar este pH y la leche con 3% de sólidos añadidos requirió 8.5 horas. Por lo tanto, el aumentar el porcentaje de MTGasa, conllevó un aumento del tiempo de acidificación, resultado que coincide con el que reportó Faergemand et al. (1999). Este fenómeno podría deberse, a que al aumentar el porcentaje de MTGasa disminuye la disponibilidad de péptidos debido al entrecruzamiento y por lo tanto, se retrasa el crecimiento de las bacterias, principalmente de *S. thermophilus*, ya que las proteinasas que posee *L. bulgaricus* necesitan ser producidas inicialmente, para incrementar el nivel de péptidos de bajo

RESULTADOS Y DISCUSION

Medición de pH

A diferencia de la acidificación química, la acidificación microbiana se desarrolló de forma lenta al inicio del periodo de incubación (Figura 9), esto último debido a la fase de adaptación de las bacterias (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*) al medio nutritivo. Esto representó un tiempo considerable en el que se pudo llevar a cabo el entrecruzamiento de las proteínas lácteas catalizadas por la MTGasa antes de que la disminución del pH retrazara la reacción enzimática (Faergemand et al., 1998; Nielsen, 1995).

En los yogures testigo, el adicionado con 0.003% y 0.009% de MTGasa fueron los tratamientos que utilizaron un menor tiempo de acidificación, el cual fue de 7 horas para alcanzar un pH de 4.4 ± 0.06 . La leche adicionada con 0.015% de MTGasa necesitó 8 horas para alcanzar este pH y la leche con 3% de sólidos añadidos requirió 8.5 horas. Por lo tanto, el aumentar el porcentaje de MTGasa, conllevó un aumento del tiempo de acidificación, resultado que coincide con el que reportó Faergemand et al. (1999). Este fenómeno podría deberse, a que al aumentar el porcentaje de MTGasa disminuye la disponibilidad de péptidos debido al entrecruzamiento y por lo tanto, se retrasa el crecimiento de las bacterias, principalmente de *S. thermophilus*, ya que las proteinasas que posee *L. bulgaricus* necesitan ser producidas inicialmente, para incrementar el nivel de péptidos de bajo

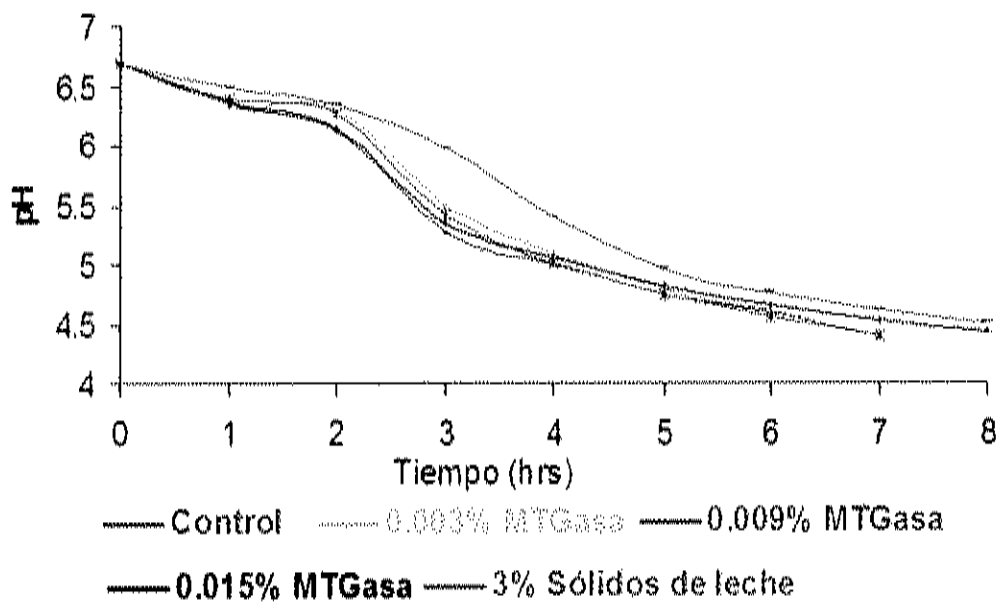


Figura 9. Efecto de la velocidad de acidificación en leche inoculada con cultivo tradicional adición de la enzima post-pasteurización (procedimiento 1)

peso molecular que son utilizados para el crecimiento de los estreptococos y así esta bacteria pueda liberar los péptidos que utiliza *L. bulgaricus* para crecer. Estas dos bacterias tienen mutua cooperación (simbiosis) durante el crecimiento por lo que la producción de ácido láctico es mucho más rápida (Abu-Tarboush, 1996; Walstra et al., 2001).

Este mismo comportamiento respecto a la velocidad de acidificación se observó para el procedimiento 2.

Análisis Proximal

Los resultados obtenidos de los análisis fisicoquímicos en cuanto a el porcentaje de proteína, grasa, sólidos totales, humedad y sólidos no grasos para yogurt elaborado con leche entera y leche descremada, tanto para procedimiento 1 como procedimiento 2, con las diferentes cantidades de MTGasa utilizada, fueron similares comparadas con el testigo, encontrándose solo diferencia significativa ($p < 0.05$) en todos los parámetros de medición cuando se adicionó 3% de sólidos de leche (Tabla 2, 3, 4 y 5). La adición incrementó la concentración de sólidos totales en la leche, por lo tanto, aumentó el porcentaje de proteína y disminuyó el porcentaje de humedad.

Tabla 2.- Análisis proximal del yogurt elaborado con leche entera y procedimiento 1.

Variables	Tratamientos				
	Testigo	0.003% MTGasa	0.009% MTGasa	0.015% MTGasa	3% Sólidos leche
% Proteína	3.0 ^b ± 0.04	3.1 ^b ± 0.13	3.1 ^b ± 0.12	3.2 ^b ± 0.13	3.7 ^a ± 0.04
% Grasa	3.2 ^b ± 0.06	3.3 ^b ± 0.06	3.3 ^b ± 0.06	3.3 ^b ± 0.06	3.8 ^a ± 0.06
% Humedad	87.9 ^a ± 0.14	87.9 ^b ± 0.21	87.6 ^a ± 0.08	87.8 ^a ± 0.11	85.3 ^b ± 0.08
% SNG ^a	8.9 ^b ± 0.21	8.8 ^b ± 0.15	9.1 ^b ± 0.07	8.9 ^b ± 0.11	10.8 ^a ± 0.08
% ST ^a	12.1 ^b ± 0.14	12.1 ^b ± 0.21	12.4 ^b ± 0.08	12.2 ^b ± 0.11	14.6 ^a ± 0.08

Diferente literal dentro de filas indica diferencia significativa ($p < 0.05$)

SNG: Sólidos No Grasos

ST: Sólidos Totales

Tabla 3.- Análisis proximal del yogurt elaborado con leche entera procedimiento 2.

Variables	Tratamientos				
	Testigo	0.003% MTGasa	0.009% MTGasa	0.015% MTGasa	3% Sólidos leche
% Proteína	3.1 ^b ± 0.03	3.2 ^b ± 0.01	3.2 ^b ± 0.10	3.3 ^b ± 0.07	3.8 ^a ± 0.21
% Grasa	3.3 ^b ± 0.02	3.3 ^b ± 0.05	3.2 ^b ± 0.05	3.3 ^b ± 0.05	4.0 ^a ± 0.11
% Humedad	87.9 ^a ± 0.45	87.8 ^b ± 0.13	87.8 ^a ± 0.09	87.2 ^a ± 0.27	85.9 ^b ± 0.24
% SNG	8.8 ^b ± 0.47	8.9 ^b ± 0.15	9.0 ^b ± 0.07	9.5 ^b ± 0.2	10.8 ^a ± 0.14
% ST	12.1 ^b ± 0.45	12.2 ^b ± 0.13	12.2 ^b ± 0.09	12.8 ^b ± 0.24	14.8 ^a ± 0.27

Diferente literal dentro de filas indica diferencia significativa ($p < 0.05$)

Tabla 4.- Análisis proximal del yogurt elaborado con leche descremada y procedimiento 1.

Variables	Testigo	Tratamientos			
		0.003% MTGasa	0.009% MTGasa	0.015% MTGasa	3% Sólidos leche
% Proteína	3.3 ^b ±0.04	3.3 ^b ±0.03	3.3 ^b ±0.05	3.4 ^b ±0.09	4.1 ^a ±0.02
% Grasa	0.2 ^b ±0.0	0.2 ^b ±0.0	0.2 ^b ±0.0	0.2 ^b ±0.0	0.5 ^a ±0.0
% Humedad	90.8 ^a ±0.03	90.8 ^a ±0.06	90.6 ^a ±0.03	90.5 ^a ±0.02	88.4 ^b ±0.02
% SNG	9.0 ^b ±0.03	9.0 ^b ±0.06	9.2 ^b ±0.03	9.3 ^b ±0.02	11.4 ^a ±0.06
% ST	9.2 ^b ±0.03	9.2 ^b ±0.06	9.4 ^b ±0.03	9.5 ^b ±0.03	11.6 ^a ±0.02

Diferente literal dentro de filas indica diferencia significativa (p < 0.05)

Tabla 5.- Análisis proximal del yogurt elaborado con leche descremada y procedimiento 2.

Variables	Testigo	Tratamientos			
		0.003% MTGasa	0.009% MTGasa	0.015% MTGasa	3% Sólidos leche
% Proteína	3.3 ^b ±0.02	3.2 ^b ±0.12	3.3 ^b ±0.25	3.4 ^b ±0.04	4.1 ^a ±0.09
% Grasa	0.28 ^b ±0.02	0.26 ^b ±0.05	0.26 ^b ±0.05	0.26 ^b ±0.04	0.5 ^a ±0.03
% Humedad	90.6 ^a ±0.06	90.6 ^a ±0.05	90.6 ^a ±0.07	87.9 ^b ±0.04	87.5 ^b ±0.05
% SNG	9.1 ^b ±0.04	9.1 ^b ±0.05	9.1 ^b ±0.07	11.8 ^a ±0.04	12.0 ^a ±0.05
% ST	9.4 ^b ±0.06	9.4 ^b ±0.05	9.4 ^b ±0.07	12.1 ^a ±0.04	12.5 ^a ±0.05

Diferente literal dentro de filas indica diferencia significativa (p < 0.05)

El principal objetivo de la adición de leche en polvo entera o descremada en la industria del yogurt, es obtener un producto de consistencia espesa y suave. Esto último se logra debido a que se modifica el porcentaje de grasa, beneficiando de esta manera ciertas características en la textura del gel; así también la homogenización influye en dichas características, ésta tiene la finalidad de romper los glóbulos de grasa en otros más pequeños para ser recubiertos por las caseínas y de esta manera participar en la agregación de las micelas durante la acidificación de la leche como conectores de partículas de caseína, logrando con ello espacios más pequeños en el poro del gel, mejorando así las características de textura (Xiong et al., 1991; Gastaldi et al., 1997; Walstra et al., 2001).

Susceptibilidad a Sinéresis

El contenido de sólidos totales en la leche de bovino utilizada para la elaboración de yogurt, no es suficiente para prevenir la sinéresis en el yogurt. Para evitar este defecto, es común el enriquecimiento con sólidos de leche y/o adicionar estabilizantes (Gastaldi et al., 1997). La opción planteada en este trabajo para evitar la sinéresis fue catalizar el entrecruzamiento de las cadenas proteínicas de la leche mediante el uso de la MTGasa.

Este efecto pudo observarse con los resultados obtenidos en esta investigación debido, a que la susceptibilidad a sinéresis presentada por el yogurt testigo y por el yogurt elaborado con 3% sólidos con leche tanto entera como descremada, fue mayor a la leche tratada con 0.015% MTGasa (Figura 10 y 11); el yogurt adicionado con 0.03 y 0.09% MTGasa no se encontró diferencia significativa respecto al testigo y al adicionado con 3% sólidos de leche, por lo tanto, estas concentraciones de enzima igualan esta característica. Se observó que la expulsión de suero fue decreciendo a medida que se incrementó la cantidad de MTGasa a la leche, esto podría deberse al entrecruzamiento, ya que se forma un tamaño de poro más pequeño en la red tridimensional, lo que genera que se contengan mayores cantidades de suero en sus espacios intersticiales, manteniendo de esta manera una mayor cantidad de agua en la matriz que forma el coágulo (Keogh y O'Kennedy, 1998; Faergemand et al., 1999; Schorsch et al., 2000).

Se observó respecto a los valores obtenidos que hay menor sinéresis en el procedimiento 1, esto se debió a que hubo mayor tiempo para que se llevara a cabo el entrecruzamiento de las proteínas lácteas catalizado por la MTGasa, sin embargo aunque en el procedimiento 2 se obtuvieron valores más altos, se observa la misma tendencia que en el procedimiento 1, disminuyó el suero expulsado conforme se aumentó la cantidad de MTGasa.

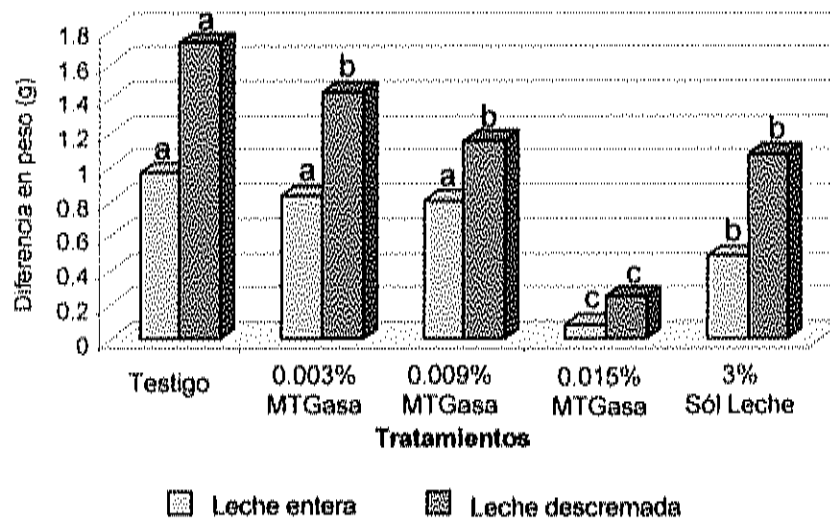


Figura 10.- Susceptibilidad a sinéresis (expresada en gramos) de yogurt elaborado con leche entera y descremada, procedimiento 1.

Diferente literal entre barras del mismo color indica diferencia significativa ($p < 0.05$)

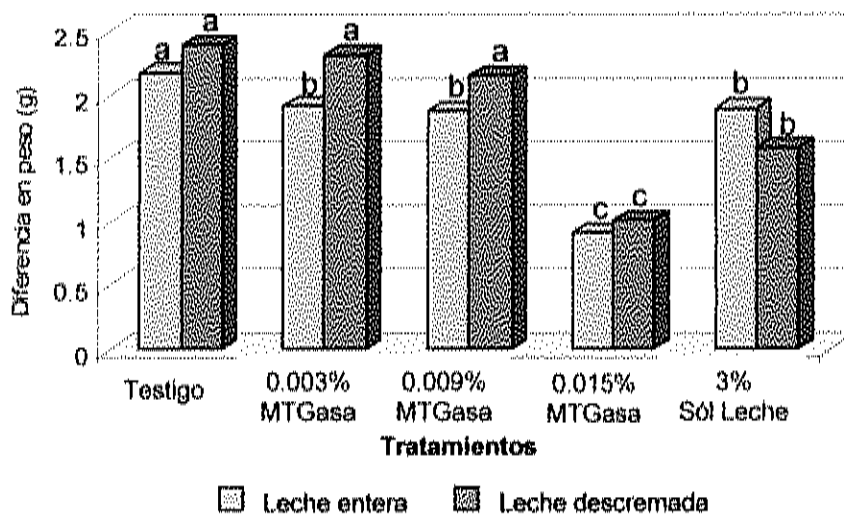


Figura 11.- Susceptibilidad a sinéresis (expresada en gramos) de yogurt elaborado con leche entera y descremada, procedimiento 2.

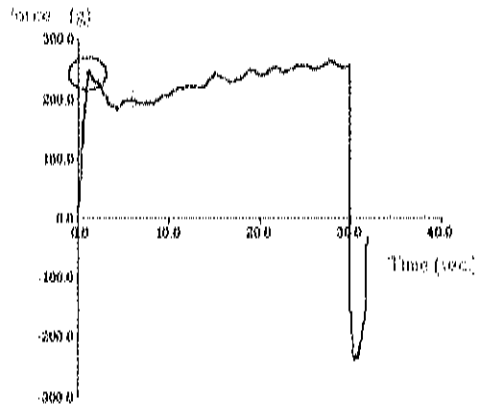
Diferente literal entre barras del mismo color indica diferencia significativa ($p < 0.05$)

Los valores en expulsión de suero fueron muy similares en el yogurt testigo, y en los tratamientos con 0.003%, 0.009% MTGasa y 3% sólidos de leche, entre estos tratamientos no se encontró diferencia significativa, pero sí con respecto al tratamiento con 0.015% MTGasa. El tratamiento utilizado para la elaboración de yogurt con 0.015% de MTGasa refleja una menor susceptibilidad a sinéresis con ambos tipos de leche, de esta manera, contribuye a disminuir la pérdida en el rendimiento del producto, ya que la sinéresis es un defecto no deseado que influye en esta característica (Tamime y Robinson, 1991). Por lo tanto, el uso de MTGasa podría ayudar a obtener una distribución más regular de las proteínas dentro del gel beneficiando una menor expulsión de suero (Faergemand et al., 1999; Lorenzen et al., 1998).

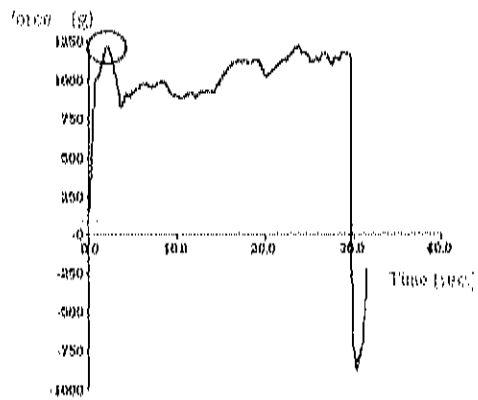
Análisis de textura

Firmeza y Consistencia

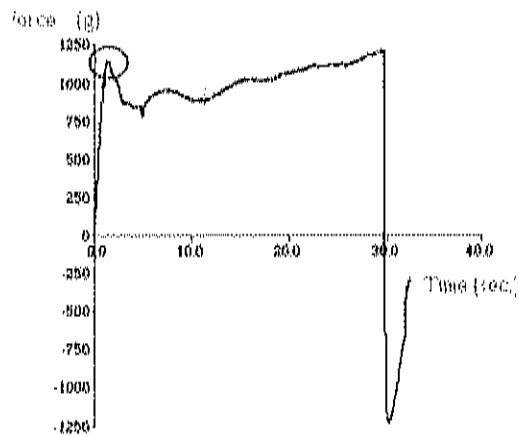
La curva de fuerza en compresión (Figura 12) para el yogurt con 0.015% MTGasa, mostró un pico definido y más alto en el punto donde empezó el rompimiento del coagulo, se observó un comportamiento similar cuando se adicionó 3% sólidos de leche. La curva para el yogurt testigo mostró un pico de menor altura, lo cual nos indica una consistencia menos firme.



a) Testigo



b) Adicionado con 0.015% MTGasa



c) Adicionado con 3% Sólidos de leche

Fig 12.- Curvas de fuerza de compresión de yogurt.

Las figuras 13, 14, 15 y 16 muestran los valores obtenidos en consistencia, adhesividad, firmeza y cohesividad de yogures elaborados con diferentes cantidades de MTGasa y del yogurt adicionado con 3% de sólidos de leche tanto enteros como descremados.

Los datos obtenidos en firmeza y consistencia fueron más altos cuando se utilizó 0.015% MTGasa comparándolo con el yogurt testigo y con los yogures con 0.003% y 0.009% de MTGasa añadida. Esto podría explicarse debido a que la distancia entre las micelas se acortan y las dimensiones entre los espacios vacíos en el coágulo disminuyen debido al entrecruzamiento de las proteínas, lo que proporciona mayor firmeza en el coágulo (Gastaldi et al., 1997; O'Connell y Kruif, 2003). Por lo tanto, los valores más altos de estos parámetros estudiados, corresponden al yogurt elaborado con 0.015% MTGasa y los más bajos al yogurt testigo. Independientemente del procedimiento utilizado. En los yogures elaborados con leche entera y descremada, la firmeza se incrementó al aumentar la cantidad de MTGasa.

Se observaron valores más altos en yogurt elaborado con el procedimiento 1, esto debido al tiempo prolongado que estuvieron en contacto las proteínas de la leche con la MTGasa, logrando obtener mayor entrecruzamiento.

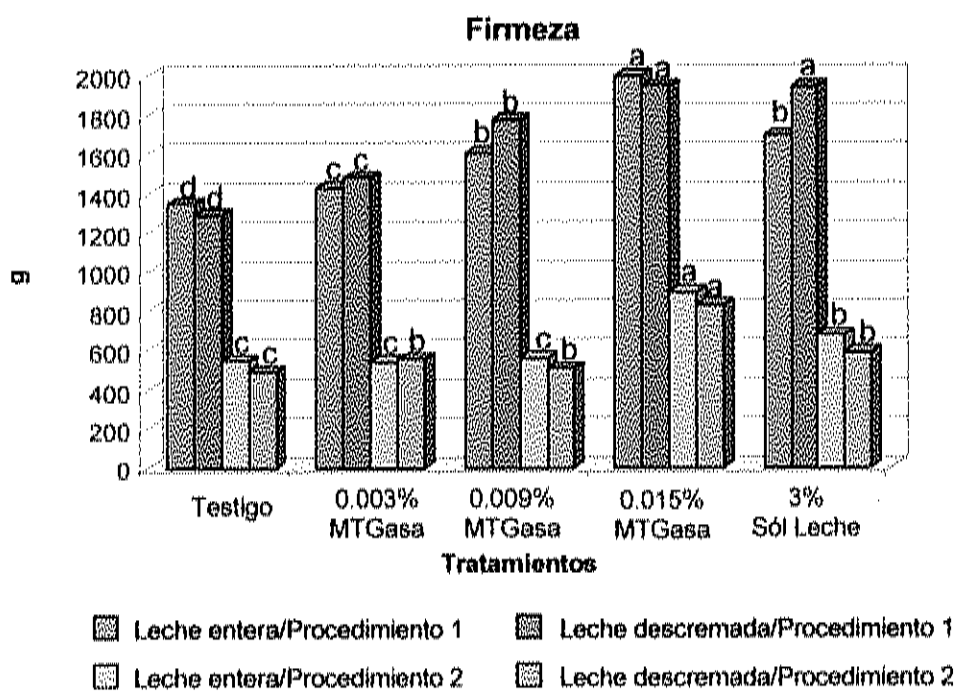


Figura 13.- Parámetro de firmeza medido en el yogurt elaborado con leche entera y descremada mediante procedimiento 1 y 2

Diferente literal entre barras del mismo color indica diferencia significativa ($p < 0.05$)

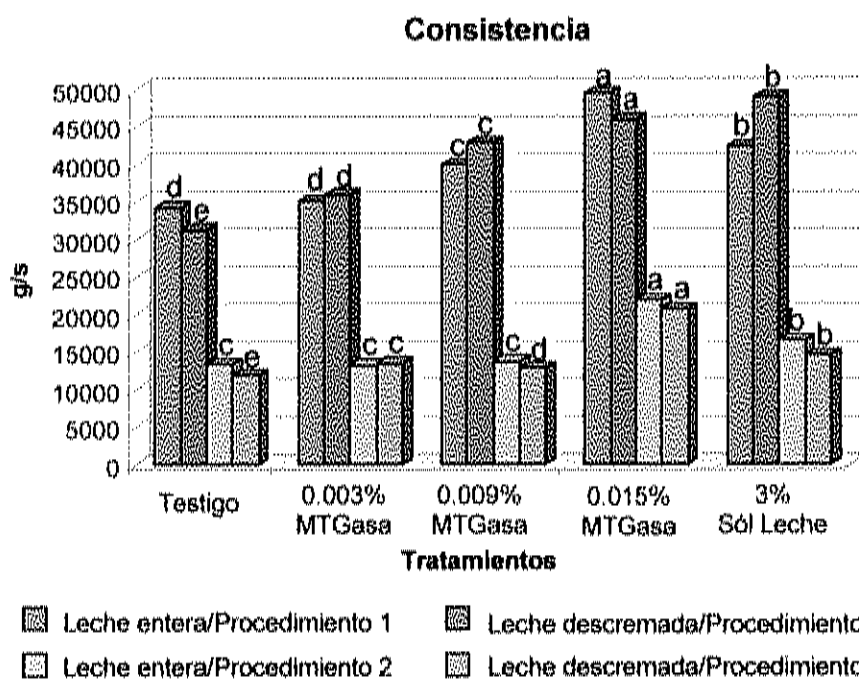


Figura 14.- Parámetro de consistencia medido en el yogurt elaborado con leche entera y descremada mediante procedimiento 1 y 2

Diferente literal entre barras del mismo color indica diferencia significativa ($p < 0.05$)

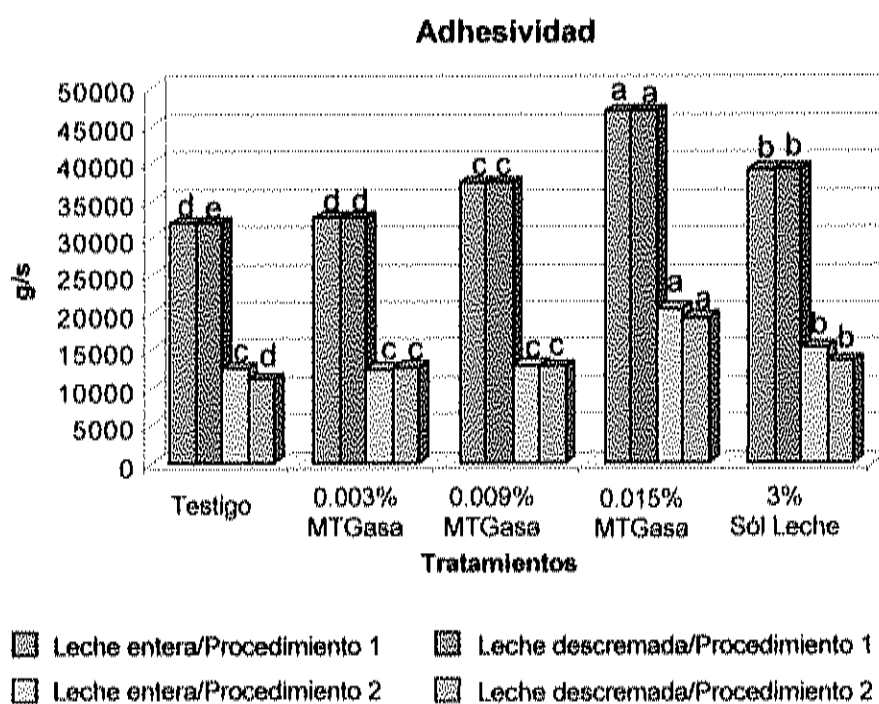


Figura 15.- Parámetro de adhesividad medido en el yogurt elaborado con leche entera y descremada mediante procedimiento 1 y 2

Diferente literal entre barras del mismo color indica diferencia significativa ($p < 0.05$)

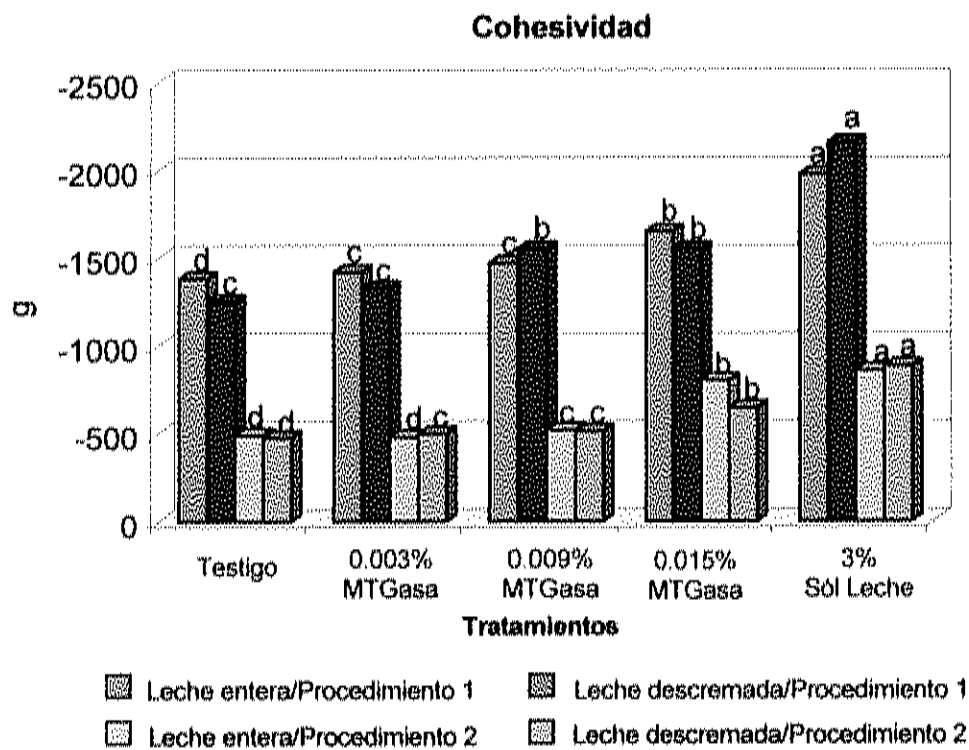


Figura 16.- Parámetro de cohesividad medido en el yogurt elaborado con leche entera y descremada mediante procedimiento 1 y 2

Diferente literal entre barras del mismo color indica diferencia significativa ($p < 0.05$)

Aunque no se obtuvieron valores muy altos en el procedimiento 2 comparado con el procedimiento 1, se observó la misma tendencia, la consistencia y firmeza aumentan conforme se adiciona mayor cantidad de enzima en la elaboración de yogurt, obteniendo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre 0.015% MTGasa y los diferentes tratamientos utilizados, indicándonos que esta cantidad de enzima es suficiente para poder modificar e igualar las características de textura con respecto al porcentaje de adición de sólidos y/o estabilizantes que normalmente utiliza la industria tanto en leche entera como descremada. Esta es una gran ventaja que otorga la enzima MTGasa debido a que uno de los principales problemas que enfrenta la industria es controlar estos defectos de textura en el yogurt elaborado con leche descremada, ya que debido a la disminución de la grasa estos parámetros se ven afectados, sin embargo con los resultados obtenidos en este estudio observamos que el uso de la MTGasa es una opción para mejorar las características de firmeza y consistencia.

Adhesividad y Cohesividad

La adhesividad en los geles de yogurt obtenidos mediante el entrecruzamiento enzimático fueron mayores, especialmente en el yogurt elaborado mediante el procedimiento 1, cuando la enzima permaneció activa. Esto debido a que formó una red proteínica más acoplada, con una distribución más regular de las proteínas en el yogurt (Lorenzen et al., 1998).

El valor de cohesividad se vio afectado por la concentración de sólidos y el contenido de grasa en el yogurt, se obtuvieron valores mayores cuando se adicionó 3% sólidos de leche en comparación con las diferentes concentraciones de enzima utilizada, sin embargo se observa que hay un aumento en el valor de cohesividad conforme se incrementa la concentración de la enzima en el yogurt, este comportamiento se observa tanto para yogurt elaborado con leche entera y descremada.

Evaluación Sensorial

Las muestras de yogurt fueron evaluadas por un panel entrenado, constituido por 8 miembros. Durante el entrenamiento los miembros del panel junto con el líder del entrenamiento discutieron y acordaron acerca de las definiciones y de cómo calificar los atributos sobre una escala. En nuestro trabajo se utilizó una escala no estructurada de 9 puntos, donde 0 = nada y 9 = mucho de los atributos estudiados.

El final del entrenamiento estuvo dado por un Análisis de varianza, donde no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre panelistas para todos y cada uno de los atributos (Tabla 6). Se eliminó 1 panelista en el atributo de sabor y 2 panelistas para firmeza y viscosidad en yogurt elaborado con leche entera ya que sus respuestas estaban fuera de la media general, lo cual provocaba diferencias entre panelistas. Así también se eliminaron 2 miembros del panel para el atributo de

Tabla 6.- Análisis de Varianza que muestra la habilidad de los panelistas.

Sinóresis

<i>Fuente Variable</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F calculada</i>	<i>Nivel de Probabilidad</i>
A: Tratamiento	2	705.2448	352.6224	72.53	0.000000*
B: Panelista	6	78.09259	9.761574	2.01	0.084126
Error	27	131.275	4.8620		
Total	54				

* Término significativo a $\alpha = 0.05$

Firmeza

<i>Fuente Variable</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F calculada</i>	<i>Nivel de Probabilidad</i>
A: Tratamiento	2	22.45286	11.22643	4.79	0.019344*
B: Panelista	6	30.22476	5.03746	2.15	0.090126
Error	21	49.23	2.344286		
Total	42				

* Término significativo a $\alpha = 0.05$

Viscosidad

<i>Fuente Variable</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F calculada</i>	<i>Nivel de Probabilidad</i>
A: Tratamiento	2	49.223	24.61167	5.53	0.011730*
B: Panelista	6	29.21	4.868333	1.09	0.397739
Error	21	93.38	4.446897		
Total	42				

* Término significativo a $\alpha = 0.05$

Aroma

<i>Fuente Variable</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F calculada</i>	<i>Nivel de Probabilidad</i>
A: Tratamiento	2	671.7295	335.8647	90.84	0.000000*
B: Panelista	6	67.65668	8.44446	2.28	0.051898
Error	27	99.82854	3.697383		
Total	54				

* Término significativo a $\alpha = 0.05$

Sabor

<i>Fuente Variable</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F calculada</i>	<i>Nivel de Probabilidad</i>
A: Tratamiento	2	56.27792	28.13896	6.68	0.005000*
B: Panelista	7	48.78146	6.96878	1.65	0.169803
Error	24	101.385	4.224375	5	24
Total	48				

* Término significativo a $\alpha = 0.05$

Acidez

<i>Fuente Variable</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F calculada</i>	<i>Nivel de Probabilidad</i>
A: Tratamiento	2	49.0337	24.51685	8.89	0.001081*
B: Panelista	8	46.35482	5.794352	2.10	0.071429
Error	27	74.46	2.757778		
Total	54				

* Término significativo a $\alpha = 0.05$

viscosidad y acidez en yogurt elaborado con leche descremada por la misma razón. Se evaluaron los atributos sensoriales con un panel no menor a 6 personas.

Sensorialmente no se evaluaron todos los tratamientos y procedimientos utilizados para elaborar el yogurt, esto con la finalidad de evitar la fatiga del panelista y con ello de una mala evaluación de los parámetros estudiados. Los tratamientos a evaluar se seleccionaron de acuerdo a los resultados obtenidos en las mediciones instrumentales, se utilizaron los que mostraron mayor textura y menor sinéresis; se eligió el procedimiento 1, elaboración de yogurt con enzima activa y los tratamientos: 0.009%, 0.015% MTGasa y 3% sólidos de leche.

Los tratamientos evaluados sensorialmente mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$) y para conocer cuál tratamiento fue el que obtuvo mayor calificación en la escala, se realizó una comparación múltiple de Tuckey.

Sinéresis

Para el parámetro de sinéresis, el tratamiento que menor expulsión de suero (calificación menor en la escala) tuvo, fue 0.015% MTGasa seguido por 0.009% MTGasa y 3% de sólidos de leche; este resultado confirma los estudios elaborados en sistemas modelo, que indican que la habilidad de hidratación del gel formado disminuye debido al entrecruzamiento formado entre las proteínas lácteas inducido por la enzima (Moloki et al., 1984; Imm et al., 2000; O'Connell y Kruif, 2003). Este

comportamiento se observa tanto para yogurt elaborado con leche entera y para yogurt elaborado con leche descremada (Figura 17).

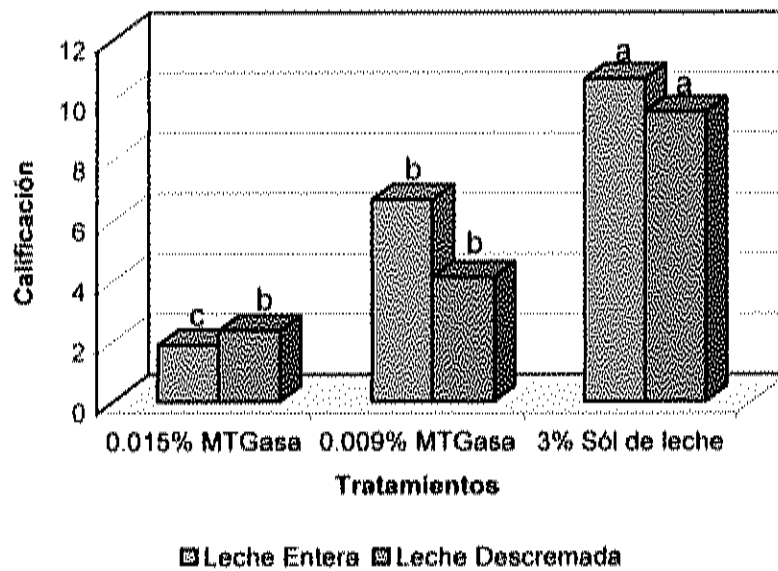
Firmeza

Al igual que los resultados instrumentales, los datos sensoriales para firmeza (Figura 18) mostraron que el yogurt elaborado con 0.015% MTGasa fue más firme en opinión de los panelistas, éste yogurt presentó la mayor calificación seguido de 3% sólidos de leche y posteriormente el tratamiento con 0.009% MTGasa para yogurt con leche entera. Este resultado se invirtió para yogurt con leche descremada debido a que las calificaciones de los panelistas en estos dos tratamientos fueron muy cercanas (alrededor de 5 puntos), lo que señala que el tratamiento de 0.009% MTGasa iguala la firmeza otorgada por la adición de 3% sólidos de leche, sin embargo no fueron calificaciones mayores que las que se obtuvieron con 0.015% MTGasa.

Viscosidad

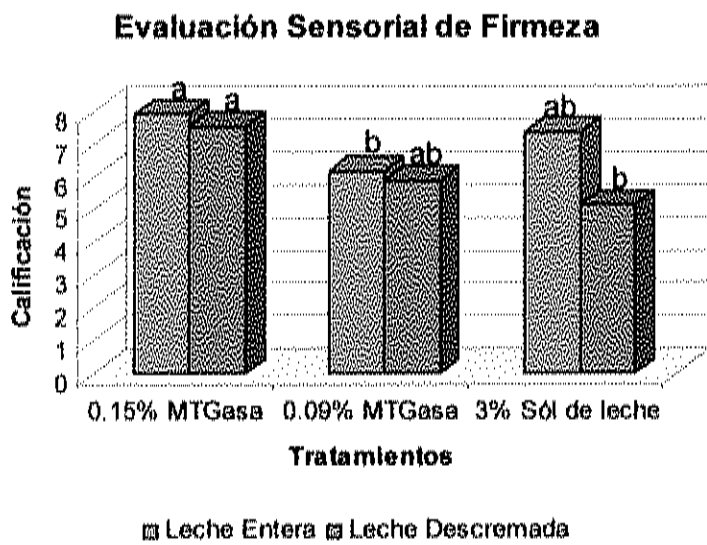
Una de las características sensoriales altamente deseables en productos lácteos es la viscosidad, este término está asociado con la suavidad y cremosidad en el yogurt (Jaworska et al., 2005). La suavidad (viscosidad) en productos lácteos aumenta al adicionar más contenido de grasa, este es el caso del tratamiento con

Evaluación Sensorial de Sinéresis



Diferente literal entre barras del mismo color indica diferencia significativa ($p < 0.05$)

Figura 17.- Análisis descriptivo de un panel entrenado para evaluar sinéresis en yogurt elaborado mediante procedimiento 1 adicionado con diferentes cantidades de MTGasa y 3% sólidos de leche.



Diferente literal entre barras del mismo color indica diferencia significativa ($p < 0.05$)

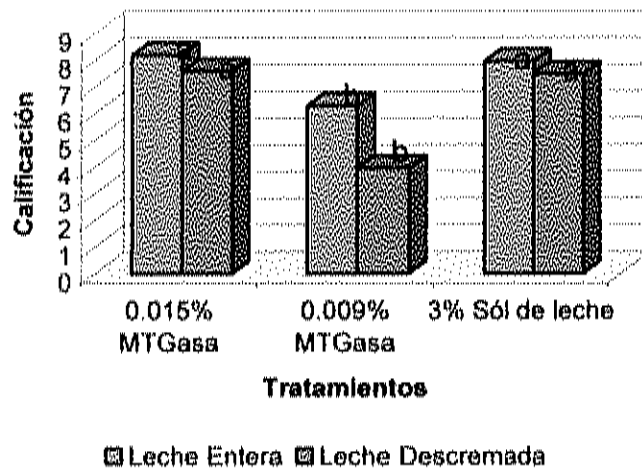
Figura 18.- Análisis descriptivo de un panel entrenado para evaluar firmeza en yogurt elaborado mediante procedimiento 1 adicionado con diferentes cantidades de MTGasa y 3% sólidos de leche.

3% sólidos. Los sólidos adicionados contribuyeron a aumentar el contenido de grasa en el yogurt (Keogh y O'Kennedy, 1998) obteniéndose con ello una mayor viscosidad en 3% sólidos de leche. No obstante en la comparación de Tukey (Figura 19) se observó que el tratamiento con 0.015% MTGasa es igual al 3% sólidos de leche, el entrecruzamiento de las proteínas lácteas llevado a cabo por la enzima otorgó un aumento en la viscosidad debido a la mayor agregación de las proteínas en la red tridimensional (Faergemand et al., 1997); el tratamiento con MTGasa mejora la fuerza de gel e incrementa la viscosidad como resultado de tener mayor capacidad de unir agua en el gel, por lo tanto, 0.015% MTGasa muestra ser una buena opción en sustitución de la adición de sólidos.

Aroma y Sabor Característico a Yogurt

El aroma y sabor en el yogurt son características importantes en su aceptación sensorial, en la Figura 20 se muestran los resultados obtenidos para el aroma característico a yogurt elaborado con leche entera, donde el tratamiento con menor aroma en la escala de calificación (2 puntos) fue para 0.009% MTGasa y la mayor calificación fue para 0.015% MTGasa. Para yogurt con leche descremada se obtuvo menor aroma para 3% sólidos de leche y mayor aroma detectado por los panelistas para 0.009% MTGasa. Estas calificaciones nos muestran que independientemente del tratamiento enzimático utilizado (0.009% o 0.015% MTGasa) este mejora las características de aroma en el producto lácteo.

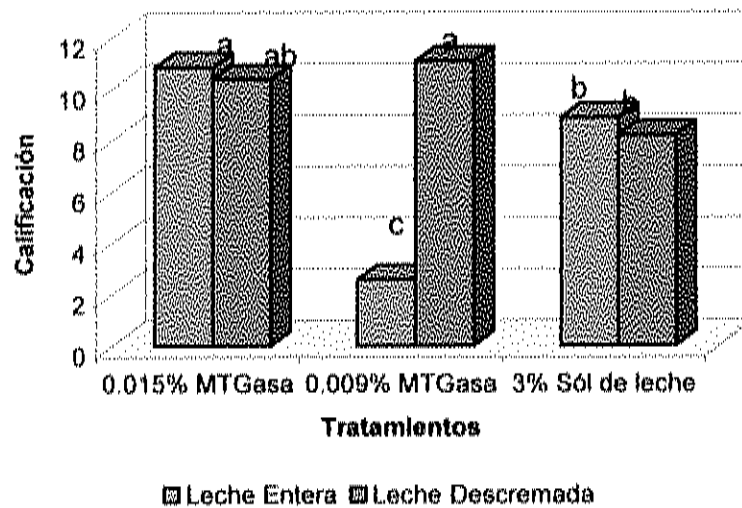
Evaluación Sensorial de Viscosidad



Diferente literal entre barras del mismo color indica diferencia significativa ($p < 0.05$)

Figura 19.- Análisis descriptivo de un panel entrenado para evaluar viscosidad en yogurt elaborado mediante procedimiento 1 adicionado con diferentes cantidades de MTGasa y 3% sólidos de leche.

Evaluación Sensorial para Aroma Característico a Yogurt



Diferente literal entre barras del mismo color indica diferencia significativa ($p < 0.05$)

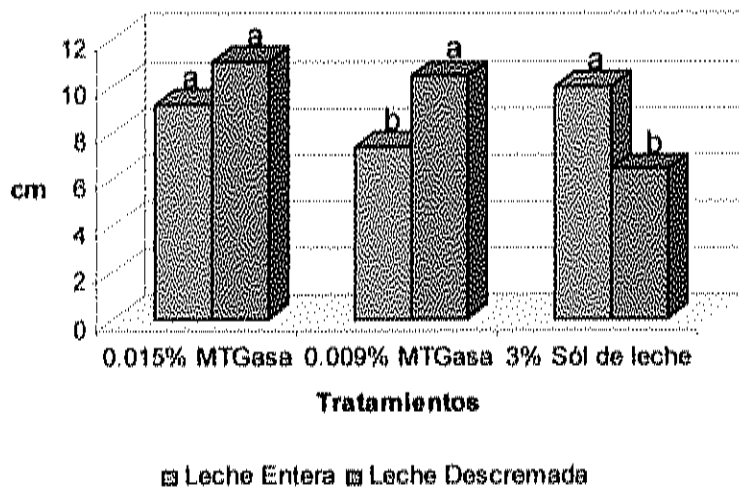
Figura 20.- Análisis descriptivo de un panel entrenado para evaluar aroma característico a yogurt, en yogurt elaborado mediante procedimiento 1 adicionado con diferentes cantidades de MTGasa y 3% sólidos de leche.

En la característica de sabor en el yogurt (Figura 21) con leche entera se observa una mayor calificación para el tratamiento con 0.015% MTGasa, sin embargo no se encuentra diferencia significativa con el tratamiento con 3% sólidos de leche, la adición de sólidos modifica el porcentaje de grasa y con ello contribuye a mejorar este parámetro (Tamime y Robinson, 1991). No se mostró este mismo comportamiento para el yogurt elaborado con leche descremada, ya que la leche en polvo adicionada era baja en grasa, lo que no ayudó a mejorar este parámetro pero sí a tener mayor firmeza por el mayor porcentaje de sólidos totales.

Acidez

Considerando que la acidez ideal estaba representada por el extremo derecho de la escala utilizada (12.5 cm), el tratamiento que presentó la calificación más próxima a la acidez ideal en yogurt con leche entera fue 3% sólidos de leche (Figura 22) no encontrándose diferencia con el tratamiento de 0.015% MTGasa; y para el yogurt elaborado con leche descremada el tratamiento más cercano a la acidez ideal de acuerdo a las calificaciones dadas por los panelistas fue para el tratamiento con 0.009% MTGasa no observándose diferencia con 0.015% MTGasa.

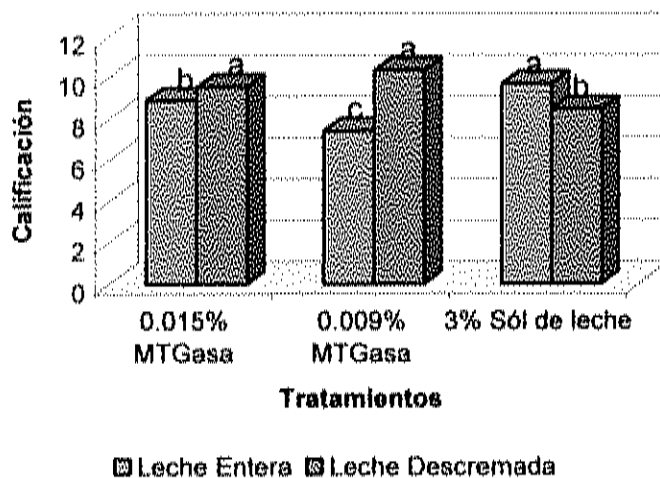
Evaluación Sensorial para Sabor Característico a Yogurt



Diferente literal entre barras del mismo color indica diferencia significativa ($p < 0.05$)

Figura 21.- Análisis descriptivo de un panel entrenado para evaluar sabor característico a yogurt, en yogurt elaborado mediante procedimiento 1 adicionado con diferentes cantidades de MTGasa y 3% sólidos de leche.

Evaluación Sensorial para Acidez Característica a Yogurt



Diferente literal entre barras del mismo color indica diferencia significativa ($p < 0.05$)

Figura 22.- Análisis descriptivo de un panel entrenado para evaluar acidez característica a yogurt, en yogurt elaborado mediante procedimiento 1 adicionado con diferentes cantidades de MTGasa y 3% sólidos de leche.

CONCLUSIONES

En el yogurt elaborado con el procedimiento 1, adicionando la enzima MTGasa después de la pasteurización, se observaron valores más elevados para firmeza, consistencia, adhesividad y cohesividad, esto debido al mayor tiempo de acción de la enzima con las proteínas lácteas; sin embargo, aunque se obtienen valores más pequeños en dichos parámetros mediante la elaboración del yogurt en el procedimiento 2, se observa esta misma tendencia, es decir, valores mayores al ir incrementando el porcentaje de MTGasa. Por lo anterior, los dos procedimientos (1 y 2) son una buena elección para mejorar estas características comparado con la adición de 3% sólidos de leche que la industria utiliza normalmente para mejorar estos parámetros junto con la adición de estabilizantes.

La sinéresis es un defecto que causa pérdidas económicas en la producción del yogurt debido a que afecta el rendimiento del producto, la adición de MTGasa podría ayudar a reducir dicha característica. Los resultados de este estudio lo confirman ya que al utilizar la enzima se ve disminuida la expulsión de suero debido a la mayor capacidad del gel de atrapar el agua. Sensorialmente también se observó una disminución en la expulsión de suero al ir incrementando el porcentaje de MTGasa así como también mayor firmeza, viscosidad, aroma, sabor y acidez al utilizar 0.009% y 0.015% MTGasa.

Los resultados obtenidos en yogurt con leche descremada muestran que, a pesar de disminuir el porcentaje de grasa, es posible obtener productos firmes, con mayor consistencia, adhesividad, cohesividad y menor sinéresis que los yogures adicionados con sólidos de leche, siendo el uso de MTGasa una alternativa para reducir la adición de estabilizantes. El entrecruzamiento catalizado por la MTGasa en leche entera y descremada destinada a la elaboración de yogurt es un método efectivo para modificar las propiedades sensoriales y de textura en dicho alimento. Considerando este tratamiento como una herramienta potencial en la producción del yogurt para mejorar o igualar las características obtenidas con la fortificación con sólidos de leche.

BIBLIOGRAFIA

- Abu-Tarboush H. M. 1996. Comparison of associative growth and proteolytic activity of yogurt started in whole milk from camels and cows. *J Dairy Sci* 79: 366-371.
- Alonso L. y Fraga M. J. 2001. Simple and rapid análisis for quantitation of the most important volatile flavor compounds in yogurt by headspace gas chromatography-mass spectrometry. *J Chrom Sci* 39: 297-300.
- Amiot J. 1991. *Ciencia y Tecnología de la Leche*. Editorial Acribia. España.
- Ando H., Adachi M., Umeda K., Matsuura A., Nonaka M., Uchio R., Tanaka H. y Motoki M. 1989. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agric. Biol. Chem* 53: 2613- 2617.
- Anzaldúa Morales Antonio. 1994. *La Evaluación Sensorial de los Alimentos en la Teoría y la Práctica*. Editorial Acribia. México.
- Badui D. 1999. *Química de los Alimentos*. Editorial Alambra Mexicana. México.
- Bourne M. (2002). *Food Texture and Viscosity*. Academic Press. Second edition. USA. 1-17
- Chavarría T. S. 1999. Aditivos que se emplean en la industria láctea. *Lácteos y Cárnicos Mexicanos*. Dic 98- Ene 99: 10-12.
- De Jong G.A.H., Wijngaards G. y Koppelman S.J. 2003. Transglutaminase inhibitor from milk. *Food Chem and Toxic* 68: 820-825.

Dickinson E. y Yamamoto Y. 1996. Rheology of milk protein gels and protein-stabilized emulsion gels cross-linked with transglutaminase. *J Agric and Food Chem* 44: 1371-1377.

Dickinson E. 1997. Enzymatic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial stabilization. *Trends in Food Sci & Tech* 8: 334-339.

Drake M., Chen X., Tamarapu S. y Leenanon B. 2000. Soy protein fortification affects sensory, chemical and microbiological properties of dairy yogurts. *J. Food Sci* 65: 1244-1247.

Duboc P., Mollet B. 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *Int Dairy J* 11: 759 – 768.

Faergemand M., Murray Brent S., Dickinson Eric. 1997. Cross-linking of milk proteins with transglutaminasa at the oil-water interface. *J. Agric. Food Chem* 45: 2514 -1519.

Faergemand M., Olte Jeanette y Qvist Karsten Bruun. 1998. Emulsifying properties of milk proteins crosslinked with microbial transglutaminasa. *Int Dairy J* 8: 715-723.

Faergemand M. y Qvist K.B. 1999. On the importance of using a Ca^{+2} independent transglutaminase for cross-linking of β -lactoglobulina. *Food Hydrocolloids* 13: 199-201.

- Food and Drug Administration U.S. 2002. Center for Food Safety and Applied Nutrition Office of Food Additive Safety. GRAS Notice No. GRN 000095. <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/foodadd.html>.
- Fennema O. R. 1996. Milk. Food Chemistry. Editorial Marcel Dekker, Inc. USA.
- Flanagan J., Gunning Y. y FitzGerald R.J. 2003. Effect of cross-linking with transglutaminase on the heat stability and some functional characteristics of sodium caseinate. *Food Res Int* 36: 267-274.
- Fox P. F. 1992. *Advanced Dairy Chemistry. Volume 1.* Blackie Academic & Professional.
- Fox P. F. y McSweeney P. L. H. 1999. *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk.* Ed. Por Law A.B., Second edition. Blackie Academic & Professional.
- Frengova G. I., Simova E. D., Breshkova D. M. y Simov Z.I. 2000. Production and monomer composition of exopolysaccharides by yogurt started cultures. *Can J. Microbiol* 46: 1123-1127.
- Friedman, M. y Finot, R. A. 1990. Nutritional improvement of bread with lysine and γ -glutamyllysine. *J Agric and Food Chem.* 38: 2011-2020.
- 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: 671 – 675.
- Gerrard A. Juliet. 2002. Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. *Trends in Food Sci & Tech* 13: 391-399

- Giese J. 1995. Measuring physical properties of foods. *Food Tech.* 49: 53-63.
- Gillet G.F.M., Chica A.R., Keillor W.J. y Pelletier N. 2004. Expression and rapid purification of highly active hexahistidine-tagged guinea pig liver transglutaminase. *Protein Expression & Purification* 33:265-264.
- González-Córdoba Aarón F. 1999. Tesis de Maestría: Detección de la rancidez hidrolítica en leche por medio de la correlación de datos analíticos y sensoriales. CIAD, A.C. Hermosillo, Sonora, México.
- Goycoolea F. 2002. Apuntes del curso "Polisacáridos Alimentarios. Centro de Investigación y Desarrollo, A. C.
- Han Xiao-Quing y Damodaran. 1996. Thermodynamic compatibility of substrate proteins affects their cross-linking by transglutaminase. *J Agric and Food Chem* 44: 1211-1217.
- 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. 1996. Rheological properties of nonfat yogurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* producing exopolysaccharide or using commercial stabilizer systems. *J Dairy Sci* 80: 252 - 263.

- Ikura K., Kita K., Fujita I., Hashimoto H. y Kawabata N. 1998. Identification of amine acceptor protein substrates of transglutaminase in liver extracts: use of 5-(Biotinamido) pentylamine as a probe. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.
- Imm J. Y., Lian P., y Lee C.M. 2000. Gelation and water binding properties of transglutaminase-treated skim milk powder. *J Food Sci* 65: 200 – 205.
- Institute of Food Technologist (IFT), 1981. Sensory evaluation guide for testing food and beverage products. By the sensory evaluation division of the IFT. Food Technology, November.
- Jaworska Danuta, Waszkiewicz-Robak Bozena, Kolanowski Wojciech y Swiderski Franciszek. 2005. Relative importance of texture properties in the sensory quality and acceptance of natural yoghurts. *Int J of Dairy Tech* 58:39 – 46.
- Kamiya N., Takazawa T., Tanaka T., Ueda H. y Nagamune T. 2003. Site-specific cross-linking of functional proteins by transglutamination. *Enzyme and Microbial Tech* 33: 492- 496.
- 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.
- Lee S. Y., Morr C. V., y Seo A. 1990. Comparison of milk-based and soymilk-based yogurt. *J Food Sci* 55: 532 -536.
- Lee W. J. y Lucey J. A. 2004. Structure and physical properties of yogurt gels: effect of inoculation rate and incubation temperature. *J Dairy Sci* 87: 3153- 3164.

- Lin Y., Chao M., Liu C. y Chu W. 2004. Cloning and expression of the transglutaminase gene from *Streptovorticillium ladakanum* in *Streptomyces lividans*. *Process Biochemistry* 39: 591-598.
- Lorenzen P., Schlimme E. y Roos N. 1998. Crosslinking of sodium caseinate by microbial transglutaminase. *Nahrung* 42: 151-154.
- Lucey J. A. 2002. ADSA Foundation Scholar Award. Formation and physical properties of milk proteins gel. *J Dairy Sci* 85: 281-294.
- Matsumura Y., Lee D-S., y Mori T. 2000. Molecular weight distributions of α -lactalbumin polymers formed by mammalian and microbial transglutaminases. *Food Hydrocolloids* 14: 49-59.
- Meilgaard Morten, Civille Gail Vance, Carr Thomas. 1999. *Sensory Evaluation Techniques*. 3rd Edition. CRC Press. USA.
- Meiyong Z., Du G., Guo W., Chen J. 2001. A temperature-shift strategy in batch microbial transglutaminase fermentation. *Process Biochem* 36: 525-530.
- Meullenet J. F., Carpenter J. A., Lyon C. E. 1998. Relationship between sensory and instrumental texture profile attributes. *J Sensory Studies* 13: 77-93.
- Motoki M. y Nio N. 1983. Crosslinking between different food proteins by transglutaminase. *J Food Sci* 48: 561-566.
- Motoki M., Nio N. y Takinami K. 1984. Functional properties of food proteins polymerized by transglutaminase. *Agric. Biol. Chem* 48: 1257- 1261.
- Motoki M. y Seguro K. 1998. Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Sci & Tech* 9: 204-210.

- Nielsen P.M. 1995. Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literature and patents, Food Biotech 9: 119-156.
- Nieuwenhuizen W., Dekker H., Gröneveld T., Koster C. y Jong G. 2004. Transglutaminase-mediated modification of glutamine and lysine residues in native bovine β -lactoglobulin. Biotech and Bioengineering 85: 248-258.
- Norma Mexicana NMX - F - 444 -1983. Alimentos-yogurt o leche búlgara. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Dirección General de Normas.
- Norma Oficial Mexicana NOM-185-SSA1-2002, Productos y servicios. Mantequilla, cremas, producto lácteo condensado azucarado, productos lácteos fermentados y acidificados, dulces a base de leche. Especificaciones sanitarias. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Dirección General de Normas.
- O'Connell J. y Kruif C. 2003. β -casein micelles; cross-linking with transglutaminase. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 216: 75-81.
- Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 2000. 17th Ed., AOAC INTERNATIONAL. Gaithersburg, MD, USA. Official Methods 989.04, 990.19, 991.20.
- Olgún-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.

- O'Sullivan M.M., Lorenzen P.C., O'Connell E. J., Kelly A.L., Schlimme E. y Fox P.F. 2001. Short communication; Influence of transglutaminase on the heat stability of milk. *J Dairy Sci* 84: 1331-1334.
- O'Sullivan M., Kelly A. y Fox P. 2002a. Influence of transglutaminase treatment on some physico-chemical properties of milk. *J Dairy Res* 69: 433-442.
- O'Sullivan M., Kelly A. y Fox P. 2002b. Effect of transglutaminase on the heat stability of milk: a possible mechanism. *J Dairy Sci* 85: 1-7.
- Pedrero, D. L. Y R. M. Pangborn. 1989. *Evaluación Sensorial de los Alimentos, Métodos Analíticos*. México: Alambra Mexicana.
- Ramírez de León J. A., Téllez Luis Josías, Uresti Marín R. y Vázquez M. 2004. *Aplicación de la enzima transglutaminasa en alimentos*. Industria Cárnica.
- Rawson Helen R y Marshall Valerie M. 1997. Effect of ropy strains of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on rheology of stirred yogurt. *Int Food Sci and Tech* 32: 213 – 220.
- Shah N. P. 2001. Funcional foods from probiotics and prebiotics. *Food Tech* 55:46-53.
- Sharma R., Lorenzen P. Chr., Qvist Karsten B. 2001. Influence of transglutaminase treatment of skim milk on the formation of ϵ -(γ -glutamyl)lysine and the susceptibility of individual proteins towards crosslinking. *Int Dairy J.* 11: 785-793.

Sharma R., Zakora M., Qvist B. 2002. Susceptibility of an industrial α -lactoalbumin concentrate to cross-linking by microbial transglutaminase. *Int Dairy J.* 12: 1005-1012.

Schorsch C., Carrie H., Clark A.H. y Norton I.T. 2000a. Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase conditions for formation of transglutaminase-induced gels. *Int Dairy J.* 10: 519- 528.

Schorsch C., Carrie H. y Norton I.T. 2000b. Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase: influence of cross-links in acid-induced gelation. *Int Dairy J.* 10: 529- 539.

Suwonsichon T. y Peleg M. 1999. Rheological characterisation of almost intact and stirred yogurt by imperfect squeezing for viscometry. *J. Sci Food Agric* 79: 911-921.

Tamime A. Y. y Robinson R. K. 1991. *Yogurt Ciencia y Tecnología*. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

Tang Chuanhe, Yang Xiao-Quan, Chen Zhong, Wu Hui y Peng Zhi-Ying. 2005. Physicochemical and structural characteristics of sodium caseinate biopolymers induced by microbial transglutaminase. *J Food Biochem* 29: 402 – 421.

Tanimoto Shin-Ya. y Kinsella E.J. 1988. Enzymatic modification of proteins: effects of transglutaminase cross-linking on some physical properties of β -lactoglobulin. *J Agric and Food Chem.* 36: 281- 285.

- Vasbinder A. J., Alling A. C., Visschers R. W. y de Kruif C. G. 2003. Texture of acid milk gels: formation of disulfide cross-links during acidification. *International Dairy Journal*, in press with permission from Elsevier Science.
- Velázquez Navarro Citali M. 2003. Tesis: Polimorfismo genético de la β -lactoglobulina y su relación con las propiedades reológicas de yogur con microorganismos prebióticos. M. C. Tesis. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Sonora, México.
- Walstra P., Geurts T.J., Noomen A., Jellema A., van Boekel M.A.J.S. 2001. *Ciencia de la Leche y Tecnología de los Productos Lácteos*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Wieland L., Eugster E., Eberhard P. 2002. Optimising the addition of transglutaminase in the preparation of sour milk products. Part 1. *Chimia*. 56: 283-284.
- Xiong Youling L., Aguilera Jose M y Kinsella John E. 1991. Emulsified milkfat effects on Rheology of acid-induced milk gels. *J Food Sci* 56: 920 - 925.

- Vasbinder A. J., Alling A. C., Visschers R. W. y de Kruif C. G. 2003. Texture of acid milk gels: formation of disulfide cross-links during acidification. *International Dairy Journal*, in press with permission from Elsevier Science.
- Velázquez Navarro Citlalli M. 2003. Tesis: Polimorfismo genético de la β -lactoglobulina y su relación con las propiedades reológicas de yogur con microorganismos prebióticos. M. C. Tesis. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Sonora, México.
- Walstra P., Geurts T.J., Noomen A., Jellema A., van Boekel M.A.J.S. 2001. *Ciencia de la Leche y Tecnología de los Productos Lácteos*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Wieland L., Eugster E., Eberhard P. 2002. Optimising the addition of transglutaminase in the preparation of sour milk products. Part 1. *Chimia*. 56: 283-284.
- Xiong Youling L., Aguilera Jose M y Kinsella John E. 1991. Emulsified milkfat effects on Rheology of acid-induced milk gels. *J Food Sci* 56: 920 - 925.