



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE INULINA Y FRUCTANOS DE AGAVE SOBRE LAS
PROPIEDADES REOLÓGICAS, MICROESTRUCTURALES Y SENSORIALES DE
BEBIDAS LÁCTEAS FERMENTADAS REDUCIDAS EN GRASA

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

PRESENTA:

GUADALUPE CRISPIN ISIDRO



Chapingo, Estado de México, enero 2013

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE INULINA Y FRUCTANOS SOBRE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS, MICROESTRUCTURALES Y SENSORIALES DE BEBIDAS LÁCTEAS FERMENTADAS REDUCIDAS EN GRASA

Tesis realizada por la C. **GUADALUPE CRISPIN ISIDRO** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

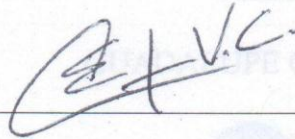
**MAESTRA EN CIENCIAS EN
CIENCIA Y TECNOLOGIA AGROALIMENTARIA**

DIRECTORA:



DRA. CONSUELO S. O. LOBATO CALLEROS

ASESOR:



DR. JAIME E. VERNON CARTER

ASESOR:



DR. GABRIEL LEYVA RUELAS

DEDICATORIA

A mi familia: Jorge y Angélica, quien en todo momento he contado con su apoyo y motivación.

A mis padres y hermanos: Ma. Luisa, Salvio (+), Silvia, Raúl, Agustín, Miguel Ángel, José Luis y José de Jesús.

AGRADECIMIENTOS

Al personal de la Universidad Chapingo y en especial a los del Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria.

A la Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros, por su apoyo y paciencia en la realización de esta investigación.

Al Dr. Hugo Espinosa Andrews, por su gran apoyo, aún sin conocerme.

A la Bióloga Yolanda Hornelas de Uribe, por toda su paciencia y gran disponibilidad en la toma de las micrografías de la presente investigación.

Al Dr. Gabriel Leyva Ruelas y al Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter, por su asesoría en la realización de esta investigación.

A mis compañeros y amigos de la Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, así como a mis amigos del Laboratorio de Investigación de Alimentos de Preparatoria Agrícola.

EFECTO DE LA ADICIÓN DE INULINA Y FRUCTANOS DE AGAVE SOBRE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS, MICROESTRUCTURALES Y SENSORIALES DE BEBIDAS LÁCTEAS FERMENTADAS REDUCIDAS EN GRASA

EFFECT OF INULIN AND AGAVE FRUCTANS ADDITION ON THE RHEOLOGICAL, MICROSTRUCTURAL AND SENSORY PROPERTIES OF REDUCED FAT FERMENTED LACTIC BEVERAGES

Guadalupe Crispín Isidro¹, Consuelo S. O. Lobato Calleros²

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la composición, reología, microestructura y aceptabilidad sensorial de seis bebidas lácteas fermentadas (BLF_{RG} + ICM₂, BLF_{RG} + ICM₄, BLF_{RG} + ICM₆, BLF_{RG} + FA₂, BLF_{RG} + FA₄ y BLF_{RG} + FA₆), adicionadas con diferentes concentraciones (2, 4 y 6 g 100 g⁻¹) de inulina de cadena media (ICM) o fructanos de agave (FA) en comparación con bebidas completa (BLF_{CG}) y reducida (BLF_{RG}) en grasa láctea. Micrografías electrónicas de barrido mostraron que la matriz proteínica de BLF_{RG} fue más abierta que aquella de BLF_{CG}. Micelas de caseína estuvieron unidas partícula a partícula en grandes agregados en las BLF_{RG}+FA; mientras que micropartículas de ICM formaron parte de la matriz proteínica de las BLF_{RG}+ICM. BLF_{RG} + ICM₄, BLF_{RG} + FA₆, BLF_{RG} + ICM₂ y BLF_{RG} + ICM₆ mostraron comportamiento reológico cercano a aquel de la BLF_{CG}, pero calificaciones más altas de aceptabilidad global.

Palabras clave: Bebidas lácteas fermentadas, inulina, fructanos de agave, reología, evaluación sensorial.

ABSTRACT

The aim of this work was to determine the composition, rheology, microstructure, and sensory acceptability of six reduced fat fermented lactic beverages (BLF_{RG} + ICM₂, BLF_{RG} + ICM₄, BLF_{RG} + ICM₆, BLF_{RG} + FA₂, BLF_{RG} + FA₄, and BLF_{RG} + FA₆) added with different concentrations (2, 4, and 6 g 100 g⁻¹) of medium chain inulin (ICM) or agave fructans (FA) in comparison with a full (BLF_{CG}) and reduced (BLF_{RG}) milk fat beverages. Scanning electron micrographs showed that the protein matrix of the BLF_{RG} was more opened than that of the BLF_{CG}. Casein micelles were linked by particle-to-particle attachment in large aggregates in the BLF_{RG}+FA; whereas microparticulates of ICM formed part of the protein matrix in the BLF_{RG}+ICM. BLF_{RG} + ICM₄, BLF_{RG} + FA₆, BLF_{RG} + ICM₂, and BLF_{RG} + ICM₆ displayed rheological behavior close to that of the BLF_{CG}, but higher overall acceptability scores.

Keywords: Fermented lactic beverages, inulin, agave fructans, rheology, sensory evaluation.

¹ Tesista

² Directora

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. Hipótesis	2
3. Objetivos	2
3.1. Objetivo general.....	2
3.2. Objetivos particulares.....	3
4. MARCO TEÓRICO	
4.1. Bebidas lácteas fermentadas	4
4.2. Fructanos de agave	4
4.3. Inulina	6
4.4. Reología	9
4.4.1.Viscoelasticidad	10
4.4.1.1. Región viscoelastica lineal.....	11
4.4.1.2. Módulo de almacenamiento, módulo de pérdida y Tan δ	12
5. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1. Materiales.....	14
5.2. Formulación de las bebidas lácteas fermentadas	14
5.3. Proceso de elaboración de las bebidas lácteas fermentadas.....	16

5.4. Determinación de la composición químico proximal y sinéresis de las bebidas lácteas fermentadas	16
5.5. Características microestructurales de las bebidas lácteas fermentadas.....	17
5.6. Determinación de las propiedades reológicas de las bebidas lácteas fermentadas	
5.6.1. Barrido de amplitud	19
5.7. Evaluación sensorial de las bebidas lácteas fermentadas.....	19
5.8. Análisis de datos	20
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
6.1. Composición química proximal de las bebidas lácteas fermentadas	22
6.2. Propiedades fisicoquímicas de las bebidas lácteas fermentadas	
6.2.1. pH.....	24
6.2.2. Acidez	25
6.2.3. Sinéresis	26
6.3. Microestructura de las bebidas lácteas fermentadas	29
6.4. Propiedades reológicas de las bebidas lácteas fermentadas	
6.4.1. Comportamiento viscoelástico de las bebidas lácteas fermentadas	35
6.5. Evaluación sensorial de las bebidas lácteas fermentadas.....	47
7. CONCLUSIONES	50
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Formulaciones de las bebidas lácteas fermentadas	15
Cuadro 2. Composición química proximal de las bebidas lácteas fermentadas	23
Cuadro 3. Valores medios de pH, acidez y sinéresis de las bebidas lácteas fermentadas durante el tiempo de almacenamiento.....	28
Cuadro 4. Parámetros reológicos del barrido de amplitud, determinados en la zona visco-elástica lineal, de bebidas lácteas fermentadas en función al tiempo de almacenamiento.	46
Cuadro 5. Valores medios de aceptabilidad global y por atributos de bebidas lácteas fermentadas	49

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura de fructanos de especies de Agaves	5
Figura 2. Micrografía MEB representativa de la BLF _{CG} . Magnificación 10 000 ×. Barra de escala 1 μm.....	29
Figura 3. Micrografía MEB representativa de la BLF _{RG} . Magnificación 10 000 ×. Barra de escala 1 μm.....	30
Figura 4. Micrografía MEB representativa de la BLF _{RG+FA2} . Magnificación 10 000 ×. Barra de escala 1 μm.....	31
Figura 5. Micrografía MEB representativa de la BLF _{RG+FA4} . Magnificación 10 000 ×. Barra de escala 1 μm.....	32
Figura 6. a) y b) Micrografías MEB representativas de la BLF _{RG+FA6} . Magnificación 10 000 ×. Barra de escala 1 μm.....	32
Figura 7. a) y b) Micrografías MEB representativas de granulos de inulina de cadena media (ICM) secados a punto crítico. Magnificación 2 500×. Barra de escala 10 μm...	33
Figura 8. Micrografía MEB representativa de la BLF _{RG+ICM2} . Magnificación 10 000 ×. Barra de escala 1 μm.....	34
Figura 9. Micrografía MEB representativa de la BLF _{RG+ICM4} . Magnificación 10 000 ×. Barra de escala 1 μm.....	34

Figura 10. Micrografía MEB representativa de la BLF _{RG+ICM6} . Magnificación 10 000 ×. Barra de escala 1 μm	35
Figura 11. Variación del módulo de almacenamiento (G') de las BLF como función de la deformación, después de 1 d de preparación.....	37
Figura 12. Variación del módulo de pérdida (G'') de las BLF como función de la deformación, después de 1 d de preparación	38
Figura 13. Variación del módulo de almacenamiento (G') de las BLF como función de la deformación, después de 15 d de preparación	41
Figura 14. Variación del módulo de pérdida (G'') de las BLF como función de la deformación, después de 15 d de preparación	42
Figura 15. a) Variación de $\tan \delta$ de las BLF como función de la deformación, después de 1 d preparadas.....	45
Figura 15. b) Variación de $\tan \delta$ de las BLF como función de la deformación, después de 15 d de almacenamiento	45

LISTA DE ABREVIATURAS

BLF_{CG}: Bebida láctea fermentada completa en grasa láctea

BLF_{RG}: Bebida láctea fermentada reducida en grasa láctea

FA: Fructanos de agave

ICM: Inulina de cadena media

(p/p): relación peso/peso

(p/v): relación peso/volumen

r. p. m: revoluciones por minuto

min. : minuto

G': módulo de almacenamiento

G'': módulo de pérdida

Pa: Pascal, unidad de fuerza aplicada a una superficie.

h : horas

d: día(s)

subs. : subespecie

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, las contribuciones a la salud han constituido un concepto importante para el desarrollo y la venta de alimentos. Además, la tendencia en el consumo de alimentos procesados reconocidos como “totalmente naturales” continúa incrementándose; entre estos, los productos lácteos fermentados, como las bebidas, presentan una demanda considerable en el mercado, debido a su imagen saludable resultante de la acción benéfica de sus bacterias viables. Diversos estudios se han realizado para la obtención de números más altos y la identificación y aislamiento de especies de bacterias probióticas con beneficios específicos para la salud, pero de igual importancia se ha reconocido la adición de prebióticos a diversos alimentos. Así, las bebidas lácteas fermentadas (BLF) son buenos candidatos para ser incorporados con prebióticos, como inulina de cadena media (ICM) y fructanos de agave (FA). El uso de los fructanos como nuevo ingrediente alimenticio saludable continúa creciendo en la industria alimentaria, debido a sus beneficios, tales como prebiótico natural, fibra dietética, y por sus propiedades funcionales (estabilizador, edulcorante, humectante, entre otros). En México, los fructanos pueden ser obtenidos de las plantas del género *Agave*, en particular, existe un gran interés en el *Agave tequilana* Weber var. *Azul*, debido a que México es considerado el centro de origen y de mayor biodiversidad de este género. La inulina se ha investigado más ampliamente y se han comprobado sus propiedades funcionales, las cuales han brindado buenos resultados como sustitutos de

grasa en productos lácteos; en contraste, los fructanos de agave sólo se han empleado en la producción industrial del tequila y jarabes de alta fructosa.

Aunque varios estudios han indicado la viabilidad del uso de prebióticos para enriquecer la calidad de productos alimenticios, los efectos de su adición en las propiedades estructurales, mecánicas y sensoriales de productos específicos ha sido escasamente investigada. Con base en lo expuesto el objetivo de este trabajo fue: Evaluar el efecto de la incorporación de fructanos de agave e inulina de cadena media, en sustitución parcial de la grasa láctea, sobre las propiedades de composición, reológicas, microestructurales y sensoriales de bebidas lácteas fermentadas.

2. HIPÓTESIS

La adición de fibras dietéticas, tales como los fructanos de agave e inulina de cadena media, a bebidas lácteas fermentadas (BLF), permiten la obtención de BLF reducidas en grasa láctea, comparables en propiedades fisicoquímicas, reológicas, microestructurales y sensoriales con aquellas BLF completas en grasa láctea.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la incorporación de fructanos de agave e inulina de cadena media en sustitución parcial de la grasa láctea sobre las propiedades de composición, reológicas, microestructurales y sensoriales de bebidas lácteas fermentadas.

3.2. Objetivos particulares

- a) Establecer formulaciones y método de preparación de bebidas lácteas fermentadas (BLF) reducidas en grasa láctea (1.3 g de grasa láctea 100 g⁻¹), adicionadas con 2, 4 y 6 g · 100 g⁻¹ de fructanos de agave e inulina de cadena media.
- b) Determinar las propiedades de composición química y reológicas de las BLF, como función del tiempo de almacenamiento (1 y 15 días).
- c) Identificar las características microestructurales de las variaciones de BLF, mediante la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido.
- d) Evaluar la aceptabilidad global sensorial y por atributos de las BLF.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Bebidas lácteas fermentadas

De acuerdo con el Código de Regulación Federal (FDA, por sus siglas en inglés), una BLF es definida como “un alimento producido mediante uno o más ingredientes lácteos (crema, leche, leche parcialmente descremada, y leche descremada), con un cultivo de bacterias ácido lácticas que contienen: *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* y *Streptococcus* subs. *thermophilus*. La BLF antes de la adición de sabores, debe contener 3.25 % de grasa láctea, no menos de 8.25 % de sólidos no grasos y una acidez por arriba del 0.9 % expresada como ácido láctico. Este producto lácteo deberá llevar un tratamiento térmico antes de la fermentación para destruir todo microorganismo patógeno viable, lo que dará una larga vida de anaquel. Las BLF bajas en grasa y libres de grasa láctea tienen una descripción similar, con contenidos de 0.5 a 2 % y por debajo de 0.5 % de grasa láctea, respectivamente (FDA, 1996 a y b).

4.2 Fructanos de agave

Los fructanos están presentes naturalmente en muchas plantas como hidratos de carbono de reserva, los cuales aumentan la tolerancia al frío y la sequía de plantas (Ritsema y Smeekens, 2003). Si bien en los fructanos derivados de bacterias pueden estar enlazados

100 000 residuos de fructosa en una sola molécula, en contraparte en los fructanos derivados de plantas las unidades fructosiladas están en un rango de 10 a 200. Entre las plantas que almacenan fructanos, las que tiene mayor importancia económica, son por ejemplo: los cereales (cebada, trigo y avena), verduras (dalias y tulipanes), gramíneas forrajeras (*Lolium* y *Festuca*), y las plantas de agave (Sánchez y Hope, 1953; Vijn y Smeekens, 1999). Debido a la configuración beta de los enlaces entre los monómeros de fructosa, los fructanos tipo inulina resisten la hidrólisis enzimática por las enzimas digestivas humanas salivales y del intestino delgado, específicas para enlaces alfa-glicosídicos. Como resultado, los fructanos tipo inulina son indigeribles y se fermentan en el colon (Ritsema y Smeekens, 2003; Roberfroid, 2007). En México, los fructanos pueden ser obtenidos de las plantas del género *Agave*, en particular existe un gran interés en el *Agave tequilana* Weber var. Azul además de otras especies, debido a que México es considerado el centro de origen y de mayor biodiversidad de este género. Mancilla-Margalli y López (2006) informaron que los fructanos de agave se componen de una mezcla compleja que contiene principalmente neo-fructanos gramínans y ramificados (Figura 1).

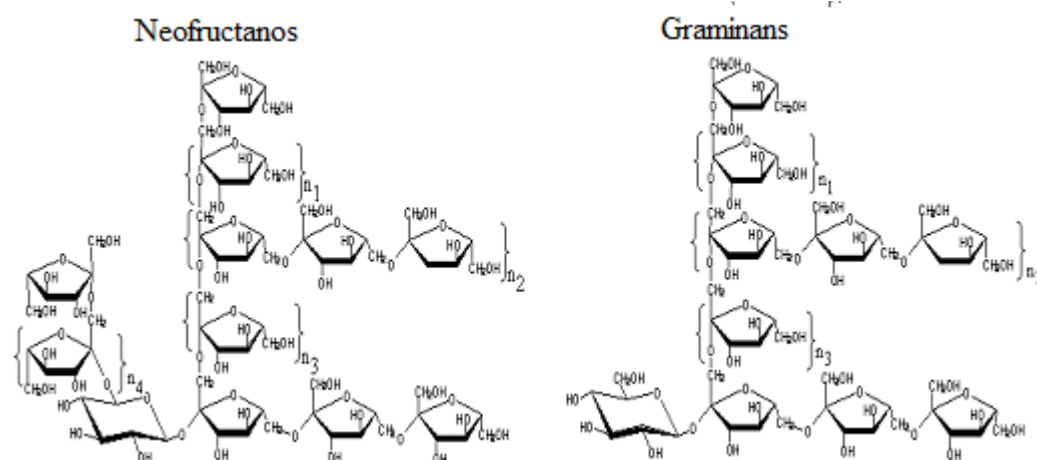


Figura 1. Estructura de fructanos de especies de Agaves. Fuente: López *et al.* (2003).

Los fructanos de *Agave tequilana* Weber var. Azul. son moléculas derivadas del agave, que poseen una configuración ramificada a diferencia de la configuración lineal presente en la inulina comercial (derivada de la *Cichorium intybus*), lo que les podría otorgar diferentes propiedades y aplicaciones tecnológicas. Ponce *et al.* (2008) encontraron que la composición de fructanos de *Agave tequilana* Weber var. Azul, mostraron una mezcla con diferentes tamaños y pesos moleculares promedio de 3 182 Da., así como un grado de polimerización promedio de 18.

Espinosa-Andrews y Urías-Silvas (2012) en muestras de fructanos de agave encontraron una compleja mezcla de mono-, di-, oligo y polisacáridos, usando la técnica de cromatografía de capa delgada a altas presiones. Urías *et al.* (2008) evaluaron el potencial de los fructanos de agave tipo inulina frente a la modulación de la glucosa y el metabolismo lipídico y la secreción de GLP-1 (por sus siglas en inglés, significa Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide) en ratones e informaron de una incidencia positiva de los fructanos del agave sobre el control del peso corporal, lo que podría ser de interés en el control de la obesidad y destacaron su potencial de mejora en los niveles de glucosa y la homeostasis de los lípidos, así como la modulación de la GLP-1 y la expresión del proglucagón.

4.3. Inulina

La inulina está presente como carbohidrato de reserva en un gran número de plantas (Van Loo *et al.*, 1995; Ritsema y Smeekens, 2003); es un componente natural de varias frutas y verduras. Puede encontrarse por ejemplo en las cebollas (1-5 % en base fresca),

ajo (4-12 %), plátano (0.2 %) y las raíces de achicoria (15-20 %). La inulina nativa es una mezcla de cadenas de oligómeros y polímeros con un número variable de moléculas de fructosa, unidos por enlaces β (2 $\rightarrow$ 1), que también incluye generalmente, una molécula de glucosa en el extremo de la cadena. Es precisamente la configuración anomérica β del C2 en su monómero de fructosa lo que a la inulina le otorga su carácter de fibra dietética (Flamm *et al.*, 2001) porque esta configuración la convierte en resistente a la hidrólisis en el intestino delgado; lo anterior debido a que las enzimas digestivas son específicas para enlaces alfa-glicosídicos. La inulina no es considerada como un aditivo, sino como algo natural y un ingrediente nutritivo seguro, y también se considera como GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro) por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (Coussement, 1999; Kaur y Gupta, 2002; Milo, 2004). Los beneficios de la ingestión de inulina no incluyen sólo los inherentes a su condición de fibra dietética (reducción del colesterol y los niveles de lípidos en sangre, control de tránsito intestinal, aumento en la absorción del calcio, etc.) (Flamm *et al.*, 2001), sino también las derivadas de su carácter prebiótico, relacionados principalmente con la estimulación del crecimiento de las bacterias promotoras de la salud (por ejemplo, las bifidobacterias) (Roberfroid *et al.*, 1998; Roberfroid y Slavin, 2000). Además de sus efectos benéficos sobre la salud, la inulina posee interesantes propiedades funcionales y puede ser usada como un edulcorante bajo en calorías, sustituto de la grasa o modificador de textura (Tungland y Meyer, 2002). Estas propiedades están relacionadas con el grado de polimerización de sus cadenas. La inulina de cadena corta o de oligofructosa es mucho más soluble y más dulce que la inulina nativa, con un perfil de sabor similar al de la sacarosa y un bajo contenido

calórico (1-2 kcal g⁻¹) pero con un menor poder edulcorante (30-35 %). Puede ser útil para sustituir parcialmente a la sacarosa en una formulación o para sustituirla totalmente cuando se combina con otros edulcorantes no calóricos. La inulina de cadena larga, con un alto grado de polimerización (22-25), es más estable térmicamente, menos solubles y más viscosa que la nativa (Wada *et al.*, 2005) y se puede utilizar como un sustituto de grasa, con una capacidad de sustitución que es prácticamente el doble que el de la inulina nativa (Franck, 2002). Sus características funcionales y nutricionales convierten a la inulina en un ingrediente muy atractivo. En la mayoría de los casos, las inulinas se añaden a los diferentes alimentos con la finalidad de complementar la ingestión de fibra, en cantidades que varían entre 3 y 6 g por porción o para asegurar su naturaleza bifidogénica, en una cantidad de 3.8 g por porción (Coussement, 1999). Aunque un gran número de productos comerciales incluyen inulina en su formulación, existe poca información disponible sobre sus efectos en las características físicas, estructurales y sensoriales de diferentes tipos de alimentos. Algunos autores han analizado el efecto de la adición de inulina sobre las propiedades reológicas y las características sensoriales de varios productos lácteos, como los helados (El-Nagar *et al.*, 2002), yogures (Dello Staffolo *et al.*, 2004; Guven *et al.*, 2005), queso fresco (Koca y Metin, 2004; Henelly *et al.*, 2006) y postres lácteos (Tárrega y Costell, 2006). En la mayor parte de estas investigaciones el objetivo fue utilizar inulina, en general con alto grado de polimerización, en formulaciones de alimentos bajos en grasa. Algunos estudios han explorado las diferencias en las propiedades fisicoquímicas de la inulina de oligofructosa con diferentes grados de polimerización (De Gennaro *et al.*, 2000; Schaller *et al.*, 2000; Blecker *et al.*, 2003); sin embargo, es escasa la información disponible sobre la influencia de inulinas con diferentes grados de polimerización sobre las propiedades

sensoriales de los alimentos. Recientemente, Kip *et al.* (2006) analizaron el efecto de la adición de inulina con dos grados de polimerización media, sobre las propiedades sensoriales de yogur bajo en grasa, observando diferencias mínimas en la viscosidad y la firmeza de diferentes muestras de yogures batidos; mientras que muestras conteniendo inulina de cadena larga presentaron una percepción bucal un poco más cremosa. No se encontraron diferencias significativas en las puntuaciones de cremosidad entre las muestras, debido probablemente a que el perfil sensorial utilizado en su trabajo no era suficientemente sensible para medir diferencias significativas entre muestras que no son fácilmente distinguibles.

4.4 Reología

La reología es definida como la ciencia de la deformación y el flujo de materiales. Estudia y formula las leyes del comportamiento mecánico de los materiales (Muller, 1973; Steffe, 1996).

Toda prueba reológica se lleva a cabo mediante la aplicación de un esfuerzo a una muestra y la medición de su deformación, o la aplicación de una deformación y la medición de la resistencia que presenta (Rosenthal, 2001). Los conceptos básicos de *esfuerzo* (fuerza por área) y *deformación* (deformación por longitud) son importantes para todas las evaluaciones reológicas (Tabilo y Barbosa, 2005). El esfuerzo (σ) es la medida de fuerza por unidad de área superficial, expresada en Pascales (Pa). La dirección de la fuerza con respecto a la incidencia sobre el área superficial determina el tipo de esfuerzo. El esfuerzo normal (σ) ocurre cuando la fuerza es directamente

perpendicular a la superficie y puede realizarse durante tensión o compresión. El esfuerzo de corte (τ) ocurre cuando la fuerza actúa en paralelo a la superficie (Tabilo y Barbosa, 2005). El concepto de deformación se refiere a: la cantidad adimensional de la deformación relativa de un material; si el esfuerzo aplicado es de tensión o compresión la deformación se denota como ε y si el esfuerzo aplicado es de corte, la deformación del material se denota como γ (Tabilo y Barbosa, 2005).

4.4.1. Viscoelasticidad

La viscoelasticidad es una propiedad de los materiales que exhiben simultáneamente un comportamiento reológico de líquido ideal (viscoso) y sólido ideal (elástico). De acuerdo al comportamiento de los materiales, se toman puntos de referencia constituidos por sustancias ideales: Al sólido ideal se le conoce como sólido de Hooke; mientras que al líquido ideal se le conoce como líquido Newtoniano (Muller, 1973). Un sólido se describe como un material cuya característica distintiva es la elasticidad y un líquido o fluido se describe como un material cuya característica particular es la viscosidad (Morris, 1995). Si se combina un sólido de Hooke con un fluido Newtoniano se obtiene el conocido modelo de Maxwell; este modelo matemático permite explicar el comportamiento de fluidos viscoelásticos, pero tiene como restricción su aplicación solamente en el comportamiento viscoelástico lineal (Muller, 1973).

Los materiales se clasifican en sólidos y líquidos ideales y en sólidos y líquidos viscoelásticos, en función de la respuesta de relajación del esfuerzo a la aplicación de

una deformación. Los fluidos de comportamiento viscoso ideal, se deforman irreversiblemente puesto que la energía de deformación se disipa en forma de calor y al desaparecer la fuerza no recuperan la forma original. En contraste, en el comportamiento elástico en sólidos ideales, la energía de deformación y la forma original se recuperan totalmente cuando cesa la aplicación de la fuerza. En la práctica, la mayoría de los materiales exhiben un comportamiento viscoelástico, intermedio entre sólido puro y líquido puro, en el que disipan parte de la energía de deformación al fluir y almacenan otra parte de la energía, empleándola para recuperar parcialmente la forma original al interrumpir la aplicación de la fuerza externa.

4.4.1.1. Región de viscoelasticidad lineal

Se refiere a un rango de magnitud de la deformación (deformación o velocidad de deformación) en el que la relación es lineal con el esfuerzo generado y en el que las propiedades reológicas dependen únicamente del tiempo (Morrison, 2001).

Las bajas deformaciones conseguidas en los reómetros permiten la medición de las funciones del material en el régimen de viscoelasticidad lineal, de forma que la respuesta de un material en este régimen, que está fuertemente condicionada con su estructura molecular, es una herramienta importante para la caracterización de materiales.

Los ensayos oscilatorios pueden realizarse en tensión, compresión o cizalla. Los equipos comerciales operan en modo de deformación, a velocidad controlada, en los que la deformación es fijada y se mide el esfuerzo, y en modo de esfuerzo controlado, en los

que la amplitud de esfuerzo es fijada y se mide la deformación. Como condiciones para la adecuada descripción de los ensayos oscilatorios a través de las correspondientes ecuaciones matemáticas se asume que la deformación es igual en todos los puntos de la muestra, la inercia de la muestra es despreciable y se cumplen las condiciones de viscoelasticidad lineal.

4.4.1.2. Módulo de almacenamiento, módulo de pérdida y Tan δ

Para un sólido elástico ideal, el esfuerzo cortante está en fase con la deformación aplicada y para un fluido Newtoniano (líquido viscoso ideal) el esfuerzo cortante está 90° ($\pi/2$) fuera de fase con la deformación aplicada. Para un fluido viscoelástico el esfuerzo cortante se desplaza respecto a la señal de deformación un ángulo de diferencia δ de valor entre 0° y 90° .

El componente esfuerzo en fase con la deformación cortante, definida como módulo de almacenamiento o módulo elástico (G' , Pa), es igual a la relación del esfuerzo cortante (en fase con la deformación, σ') con la deformación:

$$G' = \sigma' \cdot \gamma^{-1}$$

El módulo de almacenamiento (G') es asociado con la habilidad para almacenar energía, mientras la integridad estructural del alimento se mantiene (Tunick *et al.*, 1993). La magnitud de G' es dependiente de los arreglos en la estructura del alimento que toman

lugar en el proceso de oscilación y representa el comportamiento elástico de la muestra (Tabilo y Barbosa, 2005).

El componente 90° fuera de fase respecto a la deformación cortante, definido como módulo de pérdida o módulo viscoso (G'' , Pa), es expresado como la relación del esfuerzo cortante (fuera de fase con la deformación, σ'') con la deformación (Bourne, 2002).

$$G'' = \sigma'' \cdot \gamma^{-1}$$

El módulo de pérdida (G'') es una medida de la habilidad del alimento para disipar energía e indicativo de la ruptura de la estructura (Tunick *et al.*, 1993) y representa el comportamiento viscoso del alimento (Tabilo y Barbosa, 2005).

Si el valor de G' es mayor que aquel de G'' , el comportamiento mecánico del alimento es predominantemente sólido; es decir, la deformación puede ser esencialmente elástica o recuperable; por el contrario, si el valor de G'' es mayor al de G' , la energía usada para deformar el material es disipada viscosamente y el alimento se comporta predominantemente como líquido (Tabilo y Barbosa, 2005).

El factor de cedencia, $\tan \delta$ (G''/G'), revela la proporción del comportamiento viscoso al elástico ante la deformación. Valor de $\tan \delta = 0$ corresponde a una respuesta elástica; si $\tan \delta = \infty$ se trata de una respuesta viscosa y si $0 < \tan \delta < \infty$ el material muestra respuesta viscoelástica (Tabilo y Barbosa, 2005).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

Leche entera en polvo (NIDO[®], Nestlé México S.A. de C.V., México, D. F.), leche descremada en polvo (American Dairy[®]), fructanos de agave (FA, proporcionados por el Dr. Hugo Espinosa Andrews del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Av. Normalistas 800, Guadalajara, Jalisco 44270, México), inulina de cadena media (ICM, grado de polimerización ≥ 10 , grado de dulzor 10 %, Orafiti[®] GR, Tienen, Bélgica), cultivo láctico iniciador liofilizado (conteniendo *Streptococcus* subs. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* y *Lactococcus lactis* subs. *lactis*, CHOOZIT My 800 – 5 DCU, Danisco France S. A. S., Dange Saint Romain, Francia).

5.2 Formulación de las bebidas lácteas fermentadas

Se formularon dos BLF control, una completa en grasa (BLF_{CG}) conteniendo 2.6 g de grasa láctea $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ y una BLF reducida en grasa (BLF_{RG}) conteniendo 1.3 g de grasa láctea $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$. En adición se formularon seis variaciones de BLF reducidas en grasa conteniendo 1.3 g de grasa láctea $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ e incorporada con inulina de cadena media (ICM) o con fructanos de agave (FA) en sustitución de la grasa láctea, en proporciones

de 2, 4 o 6 g·100 g⁻¹; los códigos de estas BLF fueron: BLF_{RG} + ICM2, BLF_{RG} + ICM4, BLF_{RG} + ICM6, BLF_{RG} + FA2, BLF_{RG} + FA4 y BLF_{RG} + FA6. En la formulación de todas las BLF se estandarizaron los contenidos de sólidos no grasos (SNG = 10.3 g · 100 g⁻¹) y de proteína láctea (2.8 g · 100 g⁻¹) (Cuadro 1). Las BLF contuvieron 6.0 g de sacarosa 100 g⁻¹ de leche, a excepción de aquellas incorporadas con FA. Para la formulación de estas últimas se realizaron pruebas preliminares para determinar la cantidad de sacarosa a disminuir en la leche, de acuerdo a la concentración de FA establecida, con la finalidad de obtener un dulzor equivalente en todas las BLF. La cantidad de sacarosa se sustituyó de la siguiente manera: se redujo 1 g de sacarosa por 6 g de FA contenidos en 100 g de BLF (Cuadro 1).

Cuadro 1. Formulaciones de las bebidas lácteas fermentadas.

Código de la BLF	SNGL (g·100 g⁻¹)	SGL (g·100 g⁻¹)	FA (g·100 g⁻¹)	ICM (g·100 g⁻¹)	Sacarosa (g·100 g)
BLF _{CG}	10.30	2.60	-	-	6.00
BLF _{RG}	10.30	1.30	-	-	6.00
BLF _{RG + FA2}	10.30	1.30	2.00	-	5.67
BLF _{RG + ICM2}	10.30	1.30	-	2.00	6.00
BLF _{RG + FA4}	10.30	1.30	4.00	-	5.33
BLF _{RG + ICM4}	10.30	1.30	-	4.00	6.00
BLF _{RG + FA6}	10.30	1.30	6.00	-	5.00
BLF _{RG + ICM6}	10.30	1.30	-	6.00	6.00

BLF: bebida láctea fermentada; CG: completa en grasa; RG: reducida en grasa; FA: fructanos de agave; ICM: inulina de cadena media; SNG: sólidos no grasos; SGL: sólidos de grasa láctea.

5.3 Proceso de elaboración de las bebidas lácteas fermentadas

Se prepararon lotes de 3 L de las variaciones de BLF. Mezclas de leche entera en polvo y leche descremada en polvo se rehidrataron a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ con agitación moderada y se refrigeraron a 4°C por 24 h, para permitir la hidratación completa de los polvos. La leche rehidratada se calentó a 30°C y se adicionó con el azúcar y en su caso con FA e ICM. Cada lote de leche se homogeneizó (4 000 rpm, 2 min) con un homogeneizador (Ultra-turrax® T50 basic IKA Works, Inc., Wilmington, EUA) y se sometió a tratamiento térmico a $82 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10 min, en baño maría (Lobato-Calleros *et al.*, 2004). En todos los casos los lotes de leche se enfriaron a $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y en este punto se inocularon con $0.03\text{ g de cultivo láctico} \cdot \text{L}^{-1}$ e incubaron a $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta que una acidez de $75\text{-}80^{\circ}\text{D}$ fue alcanzada. Las BLF se enfriaron y refrigeraron a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 h, después de lo cual se sometieron a agitación moderada (CAFRAMO, modelo RZR1, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EUA), para romper la estructura del gel y lograr un cuerpo fluido. Las BLF se mantuvieron en refrigeración hasta su caracterización.

5.4 Determinación de la composición químico proximal y sinéresis de las bebidas lácteas fermentadas

Las variaciones de BLF se sometieron a determinaciones de proteína (método Kjeldahl), grasa (método de Gerber), sólidos totales y humedad (método de secado a la estufa) (AOAC, 1995) a los 3 días de elaboradas. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

El pH de las variaciones de BLF se determinó mediante un pH-metro (HI2211 pH/ORP Meter, Hanna instruments, Michigan, Estados Unidos de América) a 20 °C. La acidez titulable de las variaciones de BLF se determinó por titulación volumétrica con NaOH 0.1 N y fenolftaleína como indicador.

La susceptibilidad a sinéresis de las BLF se determinó mediante el método de Keogh y O’Kennedy (1998) con ligeras modificaciones. Tubos de centrifuga conteniendo 10 g de muestra de BLF fueron centrifugados (centrífuga J-600, Sol-bat, S. A de C.V. Puebla, México) a 1800 rpm durante 10 min a 4 °C. El lactosuero separado se decantó, se pesó y se expresó como porcentaje relativo al peso original de las muestras de BLF. El grado de sinéresis se determinó por triplicado después de 1 y 15 días de elaboradas las BLF.

El % de sinéresis se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de sinéresis} = (\text{peso del lactosuero} / \text{peso de la muestra}) \cdot 100$$

5.5. Características microestructurales de las bebidas lácteas fermentadas

Muestras de las variaciones de las BLF fueron tomadas del centro del recipiente contenedor. Se adaptaron tubos de plástico para microcentrífuga para colocar las muestras. Se les cortó el fondo, se les perforó la tapa en forma circular; tanto el fondo como la perforación de la tapa se cubrieron con malla. Sobre la malla que sustituyó el fondo de los tubos, se colocaron las muestras de las BLF de forma individual (aprox. 1 g). Los tubos con muestra se colocaron en forma vertical, con la tapa hacia arriba, en un

recipiente de vidrio conteniendo una solución de glutaraldehído al 2 % en buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7.2), usada para fijar las proteínas (Kalab *et al.*, 1995). El recipiente de vidrio fue de tamaño tal, que impidió que los tubos flotaran o se voltearan. Las muestras permanecieron sumergidas en la solución de glutaraldehído a 4 ± 2 °C, por 2 h. Después de este tiempo, los tubos se retiraron del recipiente con glutaraldehído y se vertió en su interior, a través de la malla colocada en la tapa, solución de buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7.2) para enjuagar la muestra; entonces los tubos se volvieron a sumergir en solución de glutaraldehído, donde permanecieron por 24 h más (4 °C) (McManus *et al.*, 1993). Las muestras post-fijadas se lavaron con la solución de buffer de fosfatos y se deshidrataron mediante su inmersión en soluciones de etanol (30, 50, 70, 80 y 90 %, permaneciendo 2 h en cada una) y en etanol absoluto hasta que fueron secadas a punto crítico en un equipo Technics CPA II Critical Point Dryer (Tousimis, Rockville, MD), sin ser retiradas del tubo que las contuvo desde el inicio de su preparación. Las muestras secas se montaron en soportes de aluminio con cinta adhesiva doble de cobre, usados para Microscopía Electrónica de Barrido y se cubrieron con oro en un equipo Fine Coat Jeol-JFC-1100 (Jeol Ltd., Akishima, Japón). La microestructura de las variaciones de las BLF se examinó con un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6360LV (Jeol Ltd., Akishima, Japón) a magnificaciones de 5000× y 10000×, tomando muestras de áreas múltiples, de donde se obtuvieron micrografías de áreas típicas. Las micrografías usadas en esta investigación no presentan alteraciones. La microestructura de gránulos de inulina de cadena media se examinó con un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6360LV (Jeol Ltd., Akishima, Japón) a magnificaciones de 2500×.

5.6 Determinación de las propiedades reológicas de las bebidas lácteas fermentadas

5.6.1 Barrido de amplitud

Las variaciones de las BLF se sometieron a pruebas oscilatorias dinámicas en un reómetro Physica MCR 301 Dynamic Shear Rheometer (Antón Paar Messtechnik, Stuttgart, Alemania). La geometría usada fue cono-plato, en la cual el cono rotatorio tuvo 50 mm de diámetro y un ángulo de 1° (CP50-1-SN5550). La distancia entre cono y plato se fijó en 0.051 mm. Muestras de las BLF (≈ 3.0 g) se colocaron cuidadosamente en el plato, dejándose reposar por 20 min para que la estructura se recuperara; posteriormente se sometieron a barridos de amplitud para determinar la región viscoelástica lineal (RVL), usando un rango de deformación de 0.01 a 100 % y una frecuencia de 1 Hz, manteniendo una temperatura de $4 \pm 0.01^\circ\text{C}$ (Physica TEK 150P, Physica Messtechnik, Stuttgart, Alemania). Mediante el software RheoPlus/32 V2.62, se obtuvieron los valores del módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdida (G'') y factor de cedencia ($\tan \delta$) de las BLF. Las determinaciones reológicas se realizaron por triplicado a los 1 y 15 días de almacenamiento a 4°C .

5.7 Evaluación sensorial de las bebidas lácteas fermentadas

Con la finalidad de evaluar sensorialmente a las BLF, se aplicaron dos pruebas: aceptabilidad por atributos y aceptabilidad global. En estas pruebas participaron 60

consumidores frecuentes de bebidas lácteas fermentadas, pertenecientes a la Universidad Autónoma Chapingo, con edades de 14 a 55 años, de entre los cuales: 27 fueron mujeres y 34 hombres. Para establecer los atributos a evaluar en las BLF, mediante una sesión con un panel de consumidores de yogures (ocho personas), se les ofrecieron muestras de las variaciones de las BLF elaboradas, solicitándoles que las probaran y luego realizaran anotaciones sobre los atributos que percibían diferentes entre ellas, llegando a un consenso, los atributos seleccionados fueron: cremosidad, acidez, dulzor, el sabor a yogur y el sabor global.

A las personas participantes, se les proporcionó en orden aleatorio, muestras de 15 mL de las diferentes variaciones de BFL (4 °C) en pequeños vasos de plástico, codificadas con números aleatorios de tres dígitos y se les solicitó que indicaran el grado de aceptabilidad por cada atributo y en su caso de aceptabilidad global para cada una de ellas; para ello se utilizó una escala hedónica de 9 puntos en donde: 1 = me disgusta extremadamente, 2 = me disgusta mucho, 3 = me disgusta moderadamente, 4 = me disgusta poco, 5 = ni me disgusta ni me gusta, 6 = me gusta poco, 7 = me gusta moderadamente, 8 = me gusta mucho y 9 = me gusta extremadamente.

5.8. Análisis de datos

Los datos obtenidos de composición química proximal, sinéresis y propiedades reológicas de las BFL, se sometieron a Análisis de Varianza, aplicando un diseño completamente al azar ($p \leq 0.05$) y se aplicó comparación de medias ($p \leq 0.05$) utilizando la prueba de Tukey en los casos pertinentes. Los datos de la evaluación

sensorial se analizaron mediante Análisis de Varianza, aplicando un diseño de bloques completamente al azar. El paquete estadístico empleado para los análisis de varianza fue el paquete Statgraphics Plus software (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, USA).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Composición química proximal de las bebidas lácteas fermentadas

Modificaciones en la composición de las formulaciones de las BLF causaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en sus contenidos de grasa, sólidos totales y humedad, pero no en su contenido de proteína ($p > 0.05$) (Cuadro 2). La BLF_{CG} presentó mayor contenido de grasa láctea (GL) ($p \leq 0.05$) que el resto de las BLF; resultado congruente con el mayor contenido de grasa en la leche usada para la preparación de la BLF_{CG}, respecto a aquel establecido para la leche utilizada en la elaboración de las BLF reducidas en grasa. El contenido de sólidos totales fue afectado positivamente por la incorporación de FA e ICM; aumentos en las cantidades de FA e ICM incrementaron el contenido de sólidos totales de las BLF. El contenido de humedad de las BLF varió de 78.1 a 84.32 % y estuvo relacionado negativamente con su contenido de sólidos totales.

Cuadro 2. Composición química proximal de las bebidas lácteas fermentadas.

Código de la BLF	Grasa láctea (%)	Proteína (%)	Sólidos totales (%)	Humedad (%)
BLF _{CG}	2.65 ^b (0.07)	2.86 ^a (0.09)	16.64 ^a (0.49)	83.35 ^c (0.49)
BLF _{RG}	1.30 ^a (0.00)	2.69 ^a (0.06)	15.68 ^a (0.02)	84.32 ^c (0.02)
BLF _{RG + FA2}	1.27 ^a (0.04)	2.91 ^a (0.26)	16.83 ^a (0.63)	83.16 ^c (0.63)
BLF _{RG + ICM2}	1.30 ^a (0.00)	2.89 ^a (0.04)	17.00 ^a (0.49)	82.99 ^c (0.49)
BLF _{RG + FA4}	1.30 ^a (0.00)	2.78 ^a (0.11)	19.14 ^b (0.13)	80.85 ^b (0.13)
BLF _{RG + ICM4}	1.30 ^a (0.00)	2.88 ^a (0.01)	19.50 ^b (0.65)	80.50 ^b (0.65)
BLF _{RG + FA6}	1.30 ^a (0.00)	2.98 ^a (0.26)	20.57 ^{bc} (0.60)	79.42 ^{ab} (0.60)
BLF _{RG + ICM6}	1.27 ^a (0.04)	3.02 ^a (0.01)	21.89 ^c (0.15)	78.10 ^a (0.15)

Valores en paréntesis se refieren a desviación estándar de las medias; BLF: bebida láctea fermentada; CG: completa en grasa; RG: reducida en grasa; FA: fructanos de agave; ICM: inulina de cadena media; SNG: sólidos no grasos; SGL: sólidos de grasa láctea.^{a, b, c} Diferentes superíndices en la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

6.2 Propiedades fisicoquímicas de las bebidas lácteas fermentadas

6.2.1. pH

Los valores de pH de las BLF después de 1 d de preparadas variaron de 4.59 a 4.84 (Cuadro 3); mientras que después de 15 d de almacenamiento estuvieron en el rango de 4.31 a 4.44. Los datos expuestos indicaron una disminución ($p \leq 0.05$) en los valores de pH para todas las BLF con el tiempo de almacenamiento. Descensos en los valores de pH de yogur con el tiempo de almacenamiento han sido explicados con base a una continuada actividad metabólica del cultivo láctico empleado en su elaboración, fenómeno conocido como post-acidificación (Serra *et al.*, 2009). Variaciones en los valores de pH entre BLF pueden ser atribuidos a variaciones en su composición. De acuerdo a Ponce *et al.* (2008) el comportamiento del pH de soluciones acuosas de fructanos de agave a concentraciones de 36 % (p/p), es afectado por la presencia de iones, como impurezas. Guggisbert *et al.* (2009) indicaron que el pH de yogures conteniendo 0.1 y 1.0 % p/p de grasa láctea en combinación con inulina de cadena larga (0, 1, 2 y 4 % p/p) osciló entre 4.1 y 4.3 después de 6 d de almacenamiento, y que estos valores no fueron influenciados significativamente por la adición de inulina. Además estos autores informaron que yogures con 2 y 3.5 % p/p de grasa láctea e inulina de cadena larga (0, 1, 2 y 4%) presentaron valores de pH más altos ($p < 0.001$) que los yogures arriba mencionados.

6.2.2. Acidez

Los valores de acidez mostrados por las BLF después de 1 d de preparadas variaron significativamente, y se encontraron en el rango de 72.0 a 80.5 °D (Cuadro 3). Con el tiempo de almacenamiento los valores de acidez se incrementaron ($p \leq 0.05$), congruentemente con la disminución de pH sufrida por las BLF. A los 15 d de almacenamiento el rango de acidez de las BLF osciló de 90 a 108 °D. El valor de acidez de la BLF_{CG} fue comparable ($p > 0.05$) con aquel de la BLF_{RG}, pero fue menor significativamente de aquellos exhibidos por las BLF reducidas en grasa incorporadas con ICM o FA. La post-acidificación durante el tiempo de almacenamiento puede ser ligado a la transformación progresiva de la lactosa en ácido láctico; sin embargo, en BLF adicionadas con componentes solubles de fibra, otros mecanismos pueden tomar lugar, los cuales promueven un incremento adicional en los valores de acidez (Ramírez *et al.*, 2010).

Conforme se incrementó la concentración de FA, las BLF mostraron valores de acidez mayores después de 15 d de almacenamiento, indicando ello que el fenómeno de post-acidificación se acentuó con incrementos en las concentraciones de FA. Así, la acidez después de 15 d de almacenamiento en las BLF conteniendo fructanos varió de mayor a menor de la siguiente forma: BLF_{RG + FA6} > BLF_{RG + FA4} > BLF_{RG + FA2}. En las BLF reducidas en grasa incorporadas con ICM se presentó un fenómeno similar, pero el aumento significativo en acidez se dio sólo cuando se incrementó la concentración de ICM de 2 a 4 g 100 g⁻¹, no observándose incremento en la acidez con el aumento de ICM de 4 a 6 g 100 g⁻¹ (acidez: BLF_{RG + ICM6} = BLF_{RG + ICM4} > BLF_{RG + ICM2}). Passephol

et al. (2008) elaboraron BLF reducidas en grasa (0.1 % p/p) con inulina de cadena corta, media y larga en concentraciones de 4 %, así como dos controles sin inulina (completa en grasa conteniendo 3.5 % p/p de grasa láctea y reducida en grasa conteniendo 0.1 % p/p de grasa láctea) e informaron que no hubo diferencias ($p \leq 0.05$) en sus valores de pH y acidez entre 1 y 28 d de almacenamiento, pero sí después de este periodo. Estos autores explicaron las variaciones en acidez con base a la actividad metabólica y enzimática de la mezcla de cultivos durante el almacenamiento a bajas temperaturas, independientemente del grado de polimerización de la inulina. De Castro *et al.* (2008) indicaron que la adición de oligofructosa (inulina de cadena media), en concentraciones de 2 y 5 % p/v a BLF (2.2 % p/p de grasa láctea) no causó modificaciones ($p \leq 0.05$) en su acidez, mostrando todas las BLF valores de acidez de 0.78 % de ácido láctico. Sendra *et al.* (2008) encontraron que la adición de fibra cítrica en leches fermentadas aumentó el crecimiento y la supervivencia de bacterias probióticas, los cuales en turno probablemente indujeron a una más rápida transformación de la lactosa en ácido láctico. Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que la presencia de FA afectó en mayor grado la acidez de las BLF durante su almacenamiento, en comparación con el efecto ejercido por la ICM.

6.2.3. Sinéresis

La susceptibilidad a sinéresis de las BLF se vio afectada por su composición (Cuadro 3). Después de 1 d de preparación, las BLF que mostraron porcentajes de sinéresis comparables ($p > 0.05$) a aquel de la BLF_{CG}, fueron: BLF_{RG + ICM4}, BLF_{RG + FA6} y BLF_{RG + ICM6}. A partir de estos resultados puede observarse que concentraciones

relativamente elevadas de ICM y FA rindieron BLF con menor grado de susceptibilidad a sinéresis. En términos generales, con el tiempo de almacenamiento se observaron incrementos en los porcentajes de sinéresis de las BLF. Aunque los fenómenos que ocurren durante la sinéresis no son claros, se ha argumentado que aumentos en la sinéresis con el tiempo de almacenamiento están asociados con re-arreglos importantes de la red de caseína (van Vliet *et al.*, 1997), los cuales promueven la expulsión de suero; siendo uno de ellos el aumento en la acidez. La fermentación de la lactosa por bacterias lácticas, se ve reflejada en la producción de ácido láctico y en una acidez más elevada en los productos lácteos, lo cual resulta en una mayor contracción de la matriz de la micela de caseínas, incrementando la expulsión del suero (Lourens *et al.*, 2001; Achanta *et al.*, 2007).

A los 15 d de almacenamiento se observaron tendencias de las BLF a sinéresis similares a las presentadas después de 1 d de elaboradas, siendo las BLF con porcentajes de sinéresis similares a aquel de la BLF_{CG} las siguientes: BLF_{RG + FA4}, BLF_{RG + FA6} y BLF_{RG + ICM6}. La funcionalidad de hidrocoloides en yogur es explicada con base en su habilidad para enlazar agua, interaccionar con los constituyentes de la leche (principalmente proteínas), y estabilizar la red proteínica, previniendo el movimiento libre del agua (Tamime y Robinson, 1999). Tanto la ICM como los FA son capaces de absorber elevadas cantidades de agua, pero se ha informado que los FA muestran más alta capacidad de absorción de agua, comparado con datos informados para inulina, por presentar los primeros estructura ramificada y los segundos estructura lineal (Kawai *et al.*, 2011); las unidades de fructosa libres contienen mayor cantidad de grupos hidroxilo que permiten ligar el agua (Espinosa-Andrews y Urías-Silvas, 2012).

Cuadro 3. Valores medios de pH, acidez y sinéresis de las bebidas lácteas fermentadas durante el tiempo de almacenamiento.

Código de la BLF	pH		Acidez		Sinéresis	
			(° D)		(%)	
	día 1	día 15	día 1	día 15	día 1	día 15
BLF _{CG}	4.60 ^{a B} (0.01)	4.31 ^{a A} (0.01)	72.00 ^{a A} (1.41)	90.00 ^{a B} (1.41)	2.55 ^{a A} (0.21)	4.79 ^{a B} (0.59)
BLF _{RG}	4.69 ^{b B} (0.01)	4.41 ^{abc A} (0.00)	72.00 ^{a A} (2.83)	92.50 ^{ab B} (2.12)	6.08 ^{bcd A} (0.36)	9.23 ^{c B} (0.82)
BLF _{RG + FA2}	4.62 ^{a B} (0.01)	4.42 ^{bc A} (0.04)	75.5 ^{abc A} (0.71)	93.50 ^{bc B} (0.71)	6.52 ^{cd A} (0.08)	6.84 ^{b A} (0.13)
BLF _{RG + ICM2}	4.63 ^{a B} (0.01)	4.34 ^{abc A} (0.02)	79.5 ^{c A} (0.71)	93.50 ^{bc B} (0.71)	7.37 ^{d A} (0.08)	9.78 ^{c B} (0.96)
BLF _{RG + FA4}	4.84 ^{c B} (0.01)	4.44 ^{c A} (0.05)	80.5 ^{c A} (0.71)	97.00 ^{d B} (1.41)	7.00 ^{d B} (0.09)	5.60 ^{ab A} (0.27)
BLF _{RG + ICM4}	4.62 ^{a B} (0.01)	4.34 ^{abc A} (0.01)	79.00 ^{bc A} (0.00)	96.50 ^{cd B} (0.71)	4.71 ^{abc A} (0.16)	6.85 ^{b B} (0.39)
BLF _{RG + FA6}	4.59 ^{a B} (0.07)	4.40 ^{abc A} (0.01)	74.00 ^{ab A} (0.00)	108.00 ^{d B} (1.41)	4.09 ^{ab A} (0.24)	5.03 ^{a A} (0.99)
BLF _{RG + ICM6}	4.71 ^{b B} (0.01)	4.33 ^{ab A} (0.10)	79.00 ^{bc A} (2.83)	96.50 ^{cd B} (2.12)	3.48 ^{a A} (0.36)	6.22 ^{ab B} (0.86)

Valores en paréntesis se refieren a la desviación estándar de las medias; BLF: bebida láctea fermentada; CG: completa en grasa; RG: reducida en grasa; FA: fructanos de agave; ICM: inulina de cadena media. ^{a, b, c, d}, Diferentes superíndices en la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$). ^{A, B}, Diferentes superíndices en la misma fila indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

6.3. Microestructura de las bebidas lácteas fermentadas

Las micrografías obtenidas mediante la técnica de Microscopia Electrónica de Barrido, mostraron las características microestructurales de las BLF. La microestructura de la BLF_{CG} (Figura 2) consistió de una red tridimensional de agregados de micelas de caseína, conservando estas últimas su forma globular. Los agregados de caseína estuvieron interespaciados por lactosuero y los componentes de la leche dispersos en el mismo, así como por bacterias ácido lácticas, responsables del proceso fermentativo de la lactosa. Estos hallazgos son acordes a los informados por otros autores (Sandoval *et al.*, 2004; Lobato-Calleros *et al.*, 2009).

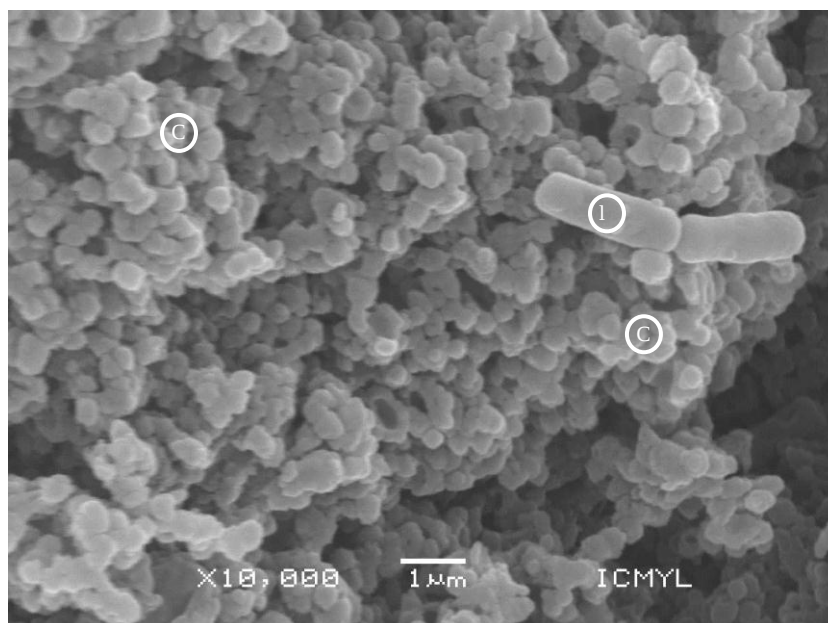


Figura 2. Micrografía MEB representativa de la BLF_{CG}, en la que se apreció la formación de una red tridimensional de caseína (c) y la presencia de lactobacilos (l). Magnificación 10 000 ×. Barra de escala 1 μm.

La microestructura de la BLF_{RG} (Figura 3) consistió de una red tridimensional de agregados de micelas de caseína, formando una red más abierta y menos estructurada con inter-espacios de lactosuero más amplios a lo observado en la BLF_{CG} (Figura 2). Lo anterior, debido a un menor contenido de glóbulos de grasa actuando como promotores de la red de proteína (Sandoval *et al.*, 2004).

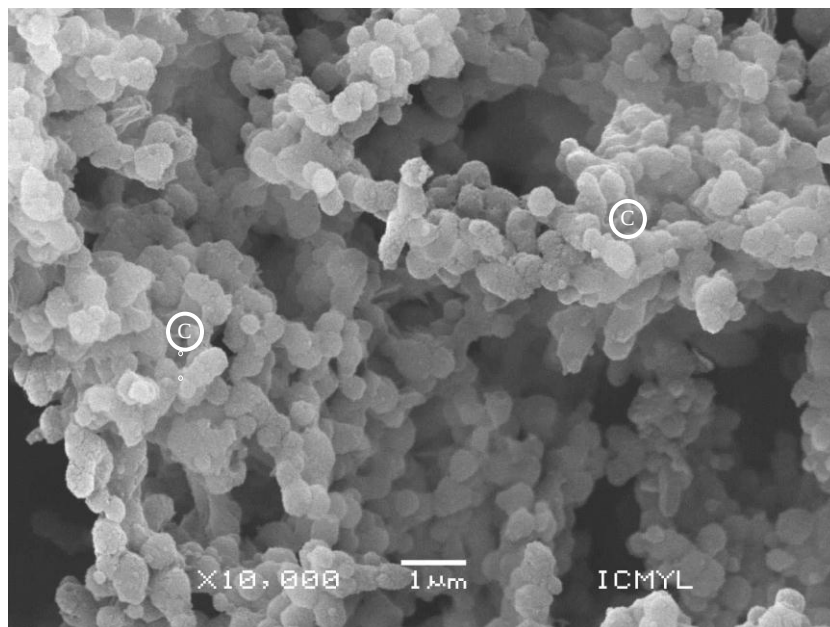


Figura 3. Micrografía MEB representativa de la BLF_{RG}, en la que se apreció la formación de una red tridimensional de caseína abierta (c), intercalada por espacios ocupados originalmente por lactosuero. Magnificación 10 000 ×. Barra de escala 1 μm.

En la micrografía de la BLF_{RG} + FA2, se observa una red de agregados de micelas de caseína (Figura 4), ligeramente más compacta que aquella de la BLF_{RG} (Figura 3), en la cual se alcanza a observar la presencia de agregados amorfos atribuidos a la asociación de cadenas de FA.

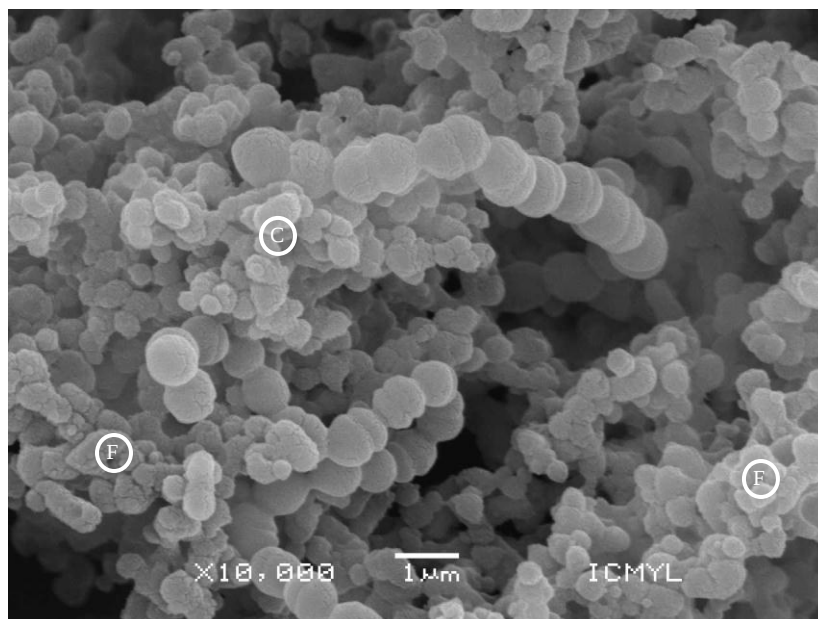


Figura 4. Micrografía MEB representativa de la BLF_{RG} + FA₂, conteniendo 2 g de FA 100 g⁻¹, en la que se apreció la formación de una red tridimensional de caseína (c), en la que se observan agregados amorfos (F) entre micelas de caseína, atribuidos a las cadenas de fructanos de agave. Magnificación 10 000 ×. Barra de escala 1 μm.

La existencia de agregados amorfos de FA es más acentuada en las redes proteínicas de la BLF_{RG} + FA₄ (Figura 5) y la BLF_{RG} + FA₆ (Figura 6. a y b), confiriendo una mayor interconectividad y grado de compactación a la red proteínica de estas bebidas, incrementándose con la concentración de FA usada durante su elaboración. La agregación de las cadenas de FA puede ser fácilmente observada en la microestructura de la BLF_{RG} + FA₆ (Figura 6 a y b). No existe en la literatura información alguna sobre los arreglos microestructurales del FA.

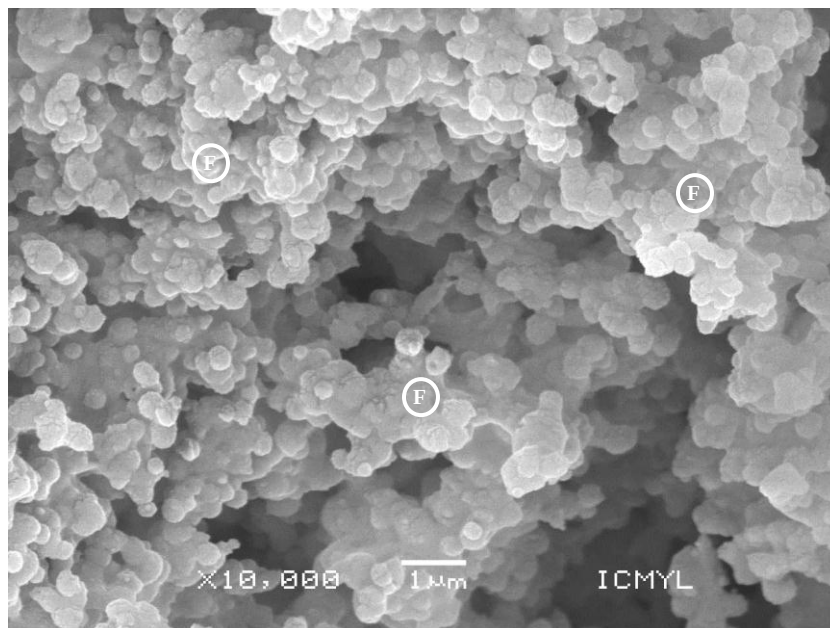


Figura 5. Micrografía MEB representativa de la BLF_{RG + FA4}, conteniendo 4 g de FA 100 g⁻¹, en la que se puede apreciar la presencia de un material amorfo interconectando las micelas de caseína (F), atribuido a los FA. Magnificación 10 000 ×. Barra de escala 1 μm.

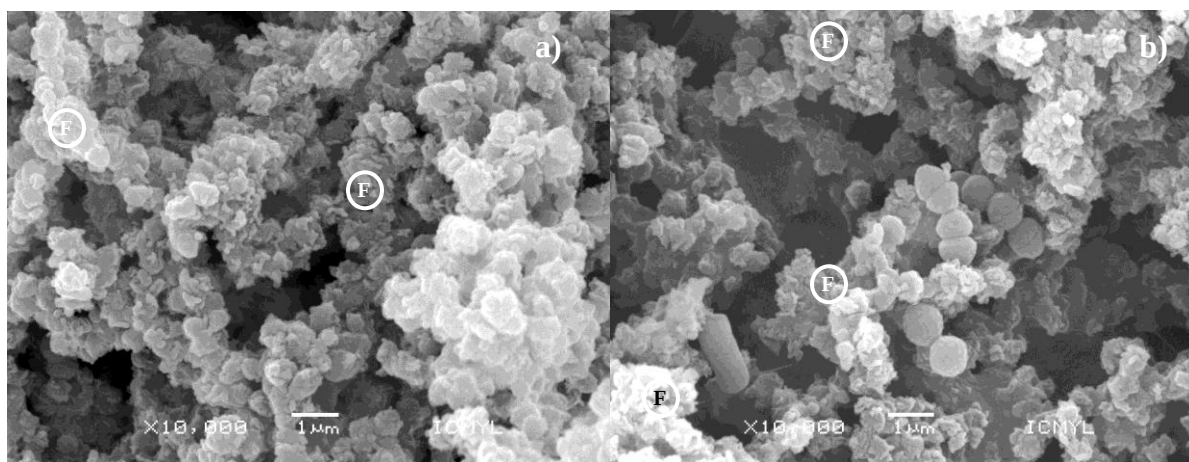


Figura 6. a) y b) Micrografías MEB representativas de la BLF_{RG + FA6}, conteniendo 6 g de FA 100 g⁻¹, en la que puede observarse el recubrimiento de las micelas de caseína por estructuras amorfas (F) de distintos tamaños. Magnificación 10 000 ×. Barra de escala 1 μm.

En las figuras 7. a) y b), se presenta la microestructura de gránulos de inulina secados a punto crítico y recubiertos con oro, pudiendo observar que son micropartículas de forma redondeada, de tamaño relativamente homogéneo y superficie lisa, con diversas fracturas lineales. La microestructura de las BLF incorporadas con distintas concentraciones de ICM, se muestran en las figuras 8 a 10, pudiendo observar que al incrementarse la concentración de este oligosacárido se tuvo la presencia de un mayor número de estructuras amorfas, de superficie lisa, con aspecto de pétalos concéntricos, atribuidas a la agregación de las cadenas de ICM. Se ha informado que el grado de polimerización de oligofructosa o inulina de cadena corta es insuficiente para formar microcristales y solamente la inulina de cadena larga y la nativa en soluciones acuosas concentradas pudo desarrollar una estructura de gel, formada por una red de partículas cristalinas (Chiavaro *et al.*, 2007; Hébert *et al.*, 1998). De acuerdo a Hébert *et al.* (1998) solo las cadenas más largas con grado de polimerización > 10 participan en la formación de geles; cadenas más pequeñas permanecen disueltas.

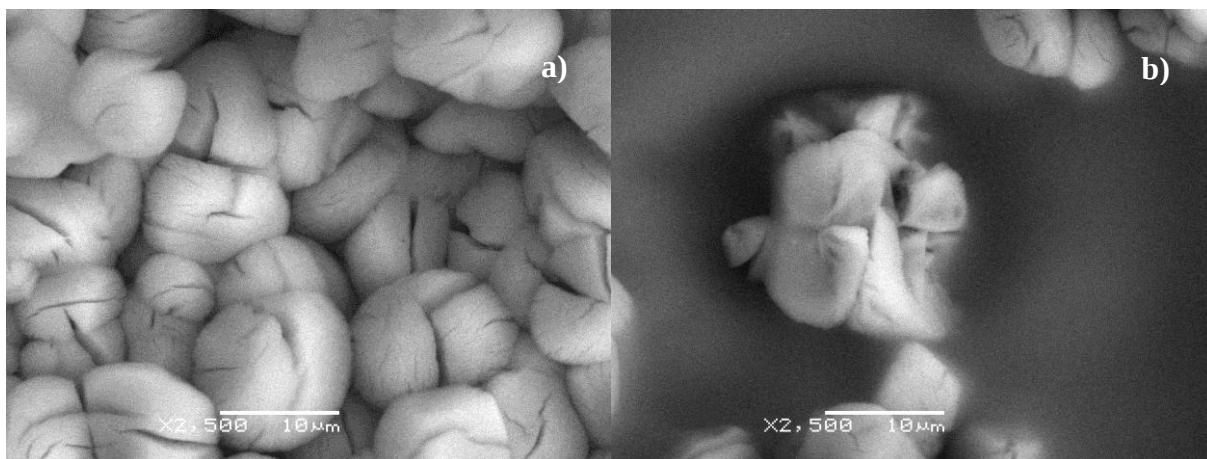


Figura 7. a) y b) Micrografías MEB representativas de gránulos de inulina de cadena media (ICM) secados a punto crítico. Magnificación 2 500 $\times$. Barra de escala 10 μm .

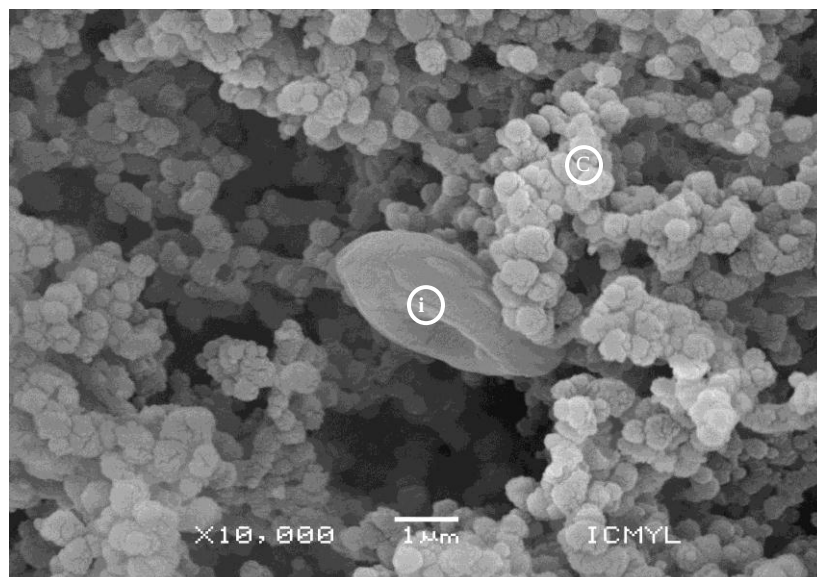


Figura 8. Micrografía MEB representativa de la BLF_{RG} + ICM₂, conteniendo 2 g de ICM 100 g⁻¹, en la puede observarse la presencia de un gránulo de inulina (i) inmerso en la red proteínica (c). Magnificación 10 000 ×. Barra de escala 1 μm.

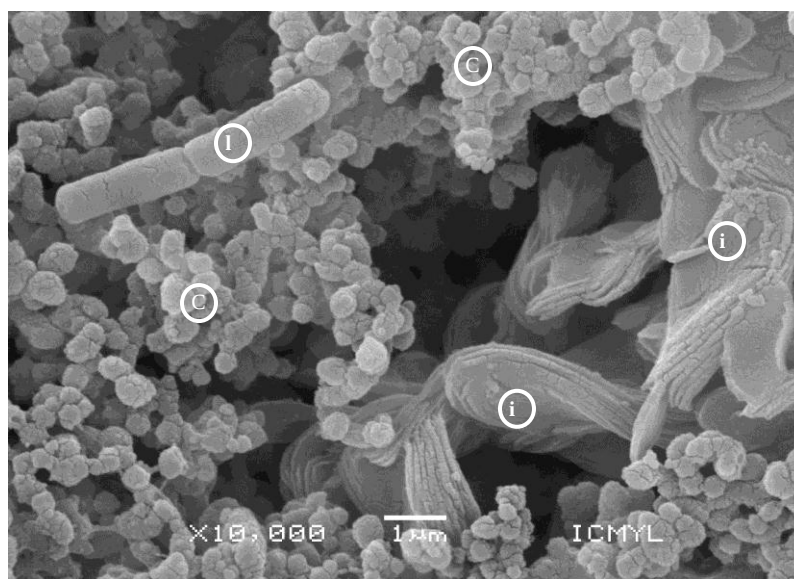


Figura 9. Micrografía MEB representativa de la BLF_{RG} + ICM₄, conteniendo 4 g de ICM 100 g⁻¹, en la puede observarse la presencia de diversos gránulos de inulina (i) embebidos en la red proteínica (c), así como lactobacilos (l). Magnificación 10 000 ×. Barra de escala 1 μm.

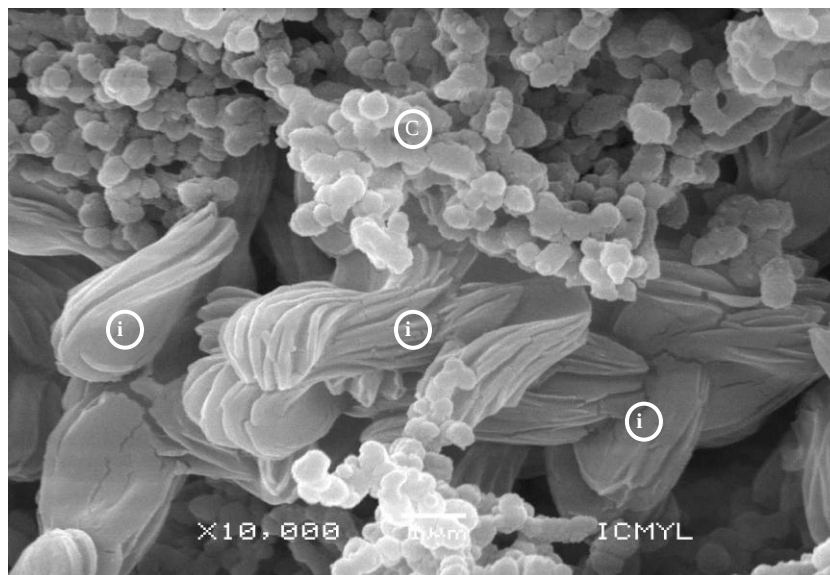


Figura 10. Micrografía MEB representativa de la BLF_{RG + ICM6}, conteniendo 6 g de ICM 100 g⁻¹, en la puede observarse la presencia de numerosos gránulos de inulina (i) inmersos en la red proteínica (c). Magnificación 10 000 ×. Barra de escala 1 µm.

6.4. Propiedades reológicas de las bebidas lácteas fermentadas

6.4.1. Comportamiento viscoelástico de las bebidas lácteas fermentadas

Las BLF son sistemas alimenticios visco-elásticos por lo que sus propiedades reológicas pueden ser analizadas con base en sus valores de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G''). G' está asociado con la habilidad para almacenar energía mientras la integridad estructural del alimento se mantiene (Tunick *et al.*, 1993). La magnitud de G' es dependiente de los arreglos en la estructura del alimento que toman lugar en el proceso de oscilación y representa el comportamiento elástico de la muestra (Tabilo y Barbosa, 2005). G'' por su parte, es una medida de la habilidad del alimento para disipar

energía e indicativo de la ruptura de la estructura (Tunick *et al.*, 1993) y representa el comportamiento viscoso del alimento (Tabilo y Barbosa, 2005). Siendo así que valores mayores de G' , en comparación con aquellos de G'' , representan mayor grado de estructuración, indicativo de un comportamiento predominantemente elástico. Las variaciones de los valores de G' y G'' de las BLF como función de la deformación (Figuras 11 y 12), después de 1 día de elaboradas, mostraron tendencias similares, pudiendo identificarse tres regiones de comportamiento: Región I, a deformaciones de 0.017 hasta alrededor de 0.20 %, en la que los valores de ambos módulos permanecieron prácticamente constantes, por lo que fue identificada como región viscoelástica lineal (RVL); Región II, a deformaciones mayores de 0.20 % hasta aproximadamente 2.0 %, en la que los valores de ambos módulos disminuyeron de forma no lineal y Región III, a valores de deformación mayores de 2.0 % en la que los valores de G' y G'' sufrieron disminución pronunciada. En la RVL, los valores de ambos módulos fueron independientes de la deformación (Morrison, 2001) y aquellos de G' fueron mayores a los de G'' (Figs. 11 y 12), indicando ello que las BLF mostraron la formación de red proteínica tridimensional con comportamiento reológico predominantemente elástico. En la región II los valores de G' y G'' disminuyeron como resultado de la ruptura de la red proteínica de las BLF. En esta región ocurre ruptura y reformación de enlaces a distintas velocidades, dependiendo de las interacciones moleculares entre los componentes principales de las BLF (micelas de caseína, glóbulos de grasa láctea, proteínas de lactosuero). Finalmente, en la región III, los valores de G' disminuyeron más rápidamente que los de G'' ; las curvas de ambos módulos se cruzaron y G'' alcanzó valores mayores que G' , presentándose entonces el desarrollo típico de un fluido viscoelástico, originado probablemente por la destrucción de enlaces entre las micelas de

caseína que conformaron la red proteínica de las BLF, fluyendo así los componentes de las BLF al ser sometidas a deformaciones elevadas (Hess *et al.*, 1997; Keogh y O’Kennedy,1998).

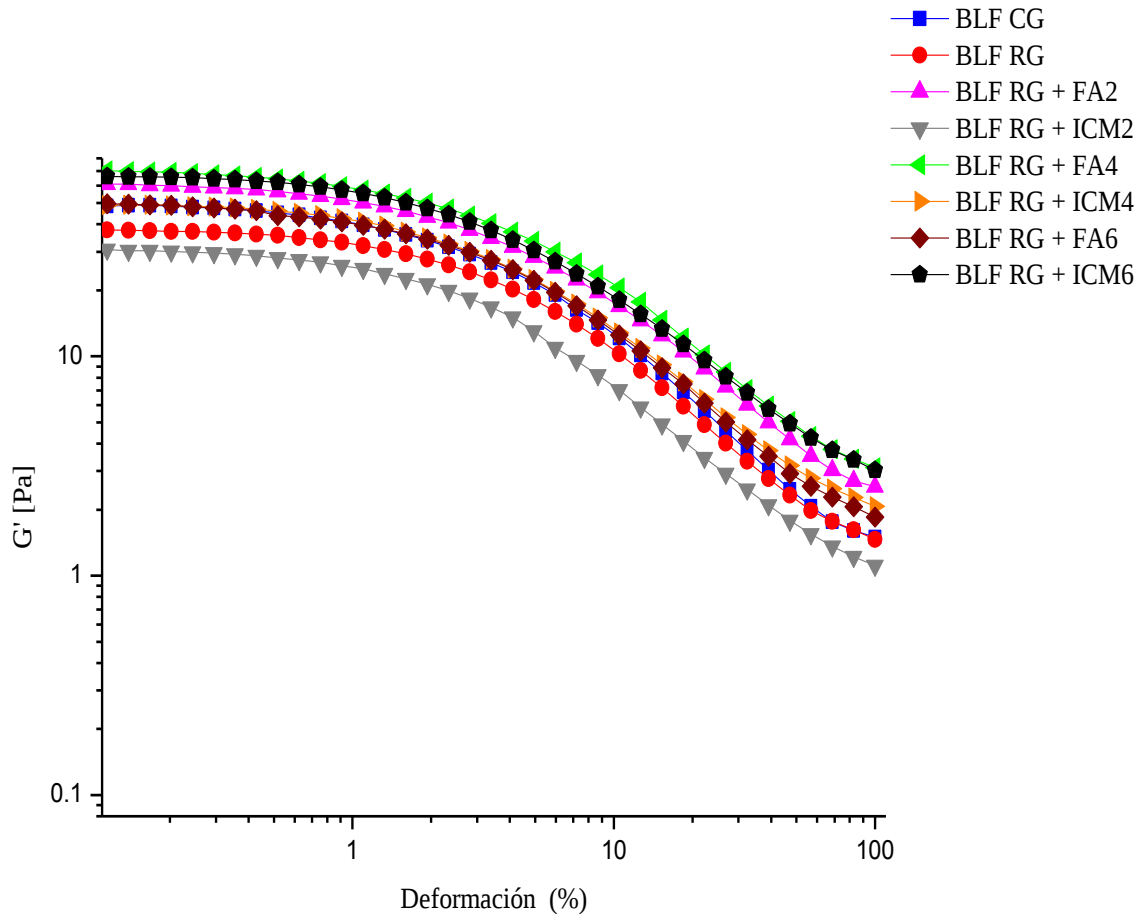


Figura 11. Variación del módulo de almacenamiento (G') de las BLF como función de la deformación después de 1 d de preparación.

[Pa]: unidad de fuerza aplicada a una superficie; BLF: bebida láctea fermentada; CG: completa en grasa; RG: reducida en grasa; FA: fructanos de agave; ICM: inulina de cadena media; 2, 4 y 6: g de FA o ICM $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$.

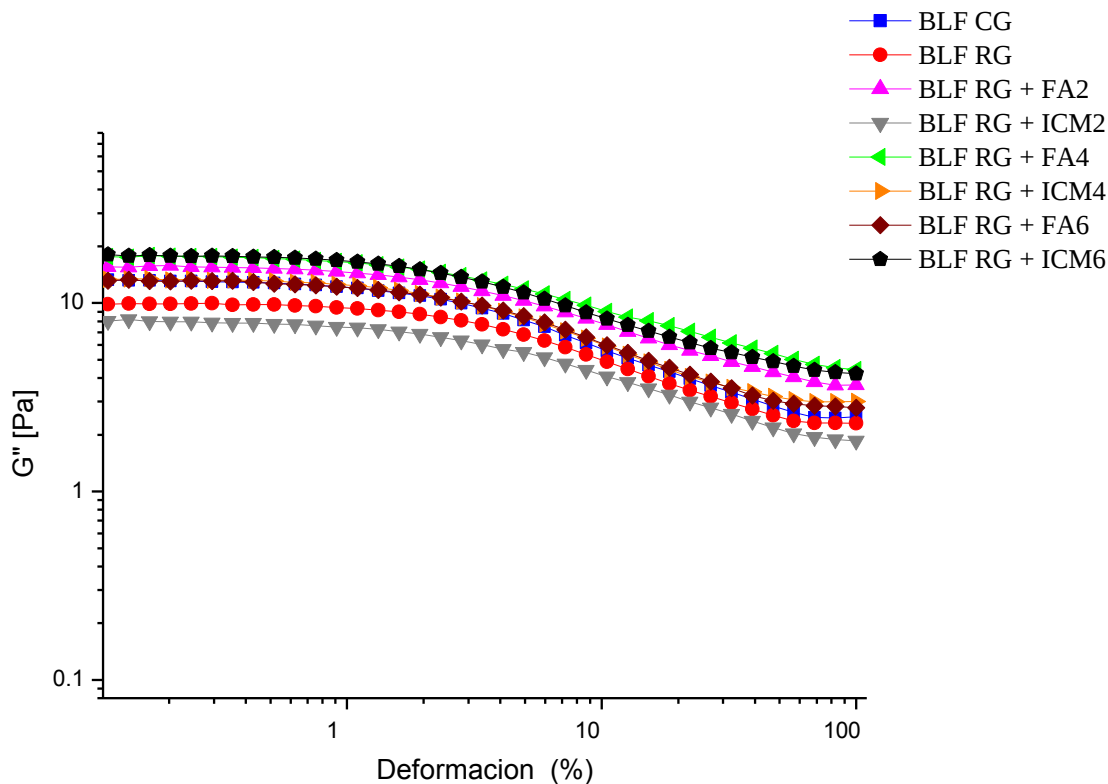


Figura 12. Variación del módulo de pérdida (G'') de las BLF como función de la deformación después de 1 d de preparación.

BLF: bebida láctea fermentada; CG: completa en grasa; RG: reducida en grasa; FA: fructanos de agave; ICM: inulina de cadena media; 2, 4 y 6: g de FA o ICM $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$.

Modificaciones en la composición de las BLF causaron alteraciones en sus propiedades visco-elásticas después de 1 d de elaboradas. Los valores del módulo elástico (G') en la RVL (Cuadro 4) variaron en orden decreciente de la siguiente manera: BLF_{RG + FA4} = BLF_{RG + ICM6} > BLF_{RG + FA2} = BLF_{CG} = BLF_{RG + FA6} = BLF_{RG + ICM4} > BLF_{RG} = BLF_{RG + ICM2}. De forma semejante a G' se comportaron los módulos viscosos (G'') de las BLF, variando de valores mayores a menores de la siguiente manera: BLF_{RG + ICM6} = BLF_{RG + FA4} > BLF_{RG + FA2} = BLF_{CG} = BLF_{RG + ICM4} = BLF_{RG + FA6} > BLF_{RG} = BLF_{RG}.

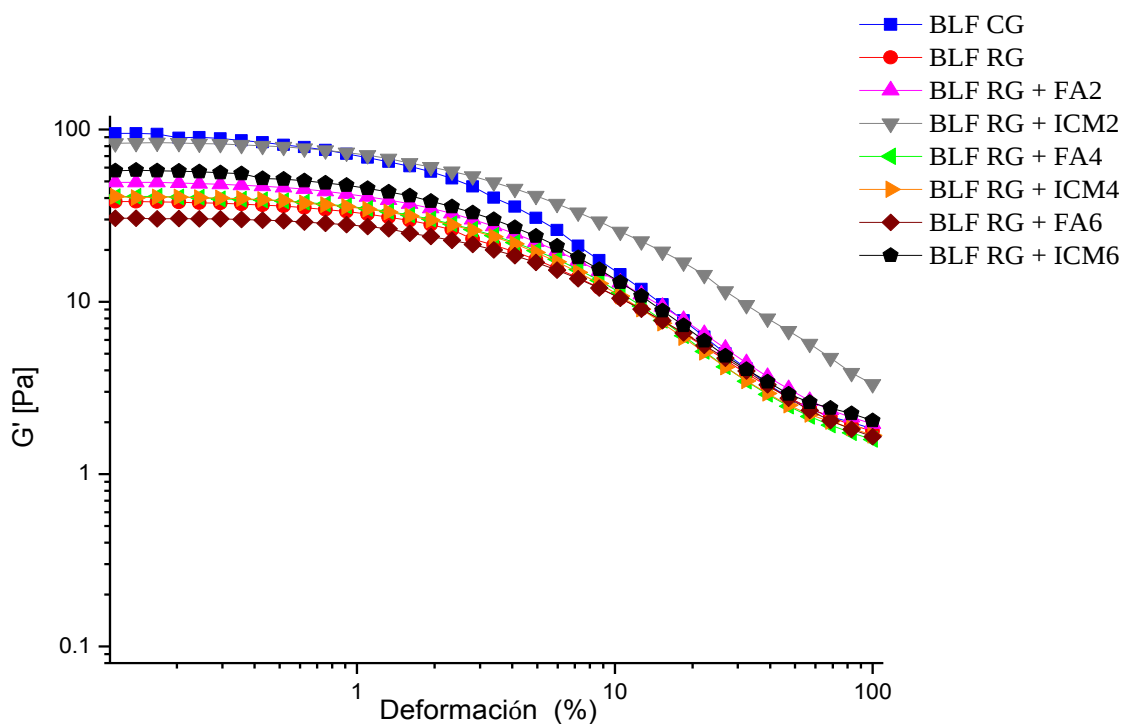
+ ICM2 (Cuadro 4). La reducción de grasa en la BLF_{RG} causó disminución significativa en sus propiedades visco-elásticas, al compararlas con aquellas de la BLF_{CG}, indicando ello un debilitamiento de su estructura relacionado con la reducción en el número de glóbulos de grasa láctea tomando parte de su estructura. En efecto, el arreglo estructural de las redes de micelas de caseína en la BLF_{RG} fue más abierto y relajado (Figura 3) que el observado en la BLF_{CG} (Figura 2). Las BLF están formadas por una red proteínica viscoelástica, con estructura y propiedades de un gel débil, la cual surge como resultado de interacciones entre agregados de caseína, proteínas de lactosuero y glóbulos de grasa láctea (Lobato-Calleros *et al.*, 2009); por tanto, reducciones en el número de glóbulos de grasa láctea disminuyen las propiedades mecánicas de las BLF. Resultados similares han sido informados por otros autores (Keogh y O’Kennedy, 1998; Lobato-Calleros *et al.*, 2004).

La presencia de oligosacáridos (ICM y FA) en la estructura de las BLF reducidas en grasa en general mejoraron sus propiedades visco-elásticas, a excepción de la ICM en una concentración de 2 g. 100 g⁻¹ (BLF_{RG + ICM2}). Lo anterior muestra que los FA e ICM reforzaron la red proteínica, a grados tales que superaron las propiedades visco-elásticas de la BLF_{CG}, como es el caso de BLF_{RG + ICM6} y BLF_{RG + FA4}. Los arreglos microestructurales de estas bebidas (Figuras 10 y 5) demostraron que tanto la ICM como los FA se incorporaron a la red proteínica, formando la primera, micro-partículas con forma de pétalos de flor (Figura 10), que muy probablemente reforzaron la estructura de las BLF. Para el caso de los FA se observaron estructuras amorfas que interconectaron las redes de micelas de caseína (Figura 5).

Por su parte, BLF_{RG + FA2}, BLF_{RG + FA6} y BLF_{RG + ICM4} mostraron propiedades visco-elásticas comparables ($p > 0.05$) a las correspondientes a la BLF_{CG}. Estos resultados indicaron que una concentración menor de FA ($2 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) en comparación con $4 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de ICM, fue suficiente para proporcionar a las BLF reducidas en grasa de una estructura con propiedades mecánicas similares a aquellas de la BLF_{CG}. Villegas y Costell (2007) informaron que la capacidad mimética a la grasa láctea por la inulina en bebidas lácteas dependió no solamente de su longitud de cadena, sino también de su concentración; requiriéndose porcentajes mayores a 8 % p/p de inulina de cadena larga para obtener bebidas lácteas reducidas en grasa teniendo espesamiento y cremosidad similares a aquellos percibidos en BLF completas en grasa. Una probable explicación al papel desempeñado por los oligosacáridos en la estructura de las BLF reducidas en grasa puede ser su acción para evitar la floculación de las micelas de caseína que la constituyen. Las bebidas lácteas fermentadas comúnmente son adicionadas con polisacáridos para prevenir la agregación extensiva de micelas de caseína, llevando a estabilización estérica a concentraciones crecientes (Janhøj *et al.*, 2008; Everett y McLeod, 2005). De acuerdo a especificaciones de manufactura, la inulina de cadena media (Raftilina GR) con un grado de polimerización de 10, es también recomendada como sustituto de grasa, debido a la presencia de fracciones de alto peso molecular (Niness, 1999). En adición, partículas de gel formadas tanto por los FA, como la ICM bajo la acción de calor, pudieron haber interrumpido la fusión de las micelas de caseína de las BLF reducidas en grasa, de manera semejante hasta cierto punto, al efecto ejercido por los glóbulos de grasa láctea. Ponce *et al.* (2008) informaron que la inulina de cadena larga forma partículas de gel mediante la acción del calor, con tamaños de $2.31 \text{ } \mu\text{m}$. Aun cuando no existe información sobre las interacciones de los FA en

sistemas con proteínas o lípidos propios de la leche, se demostró que estos se integraron a la red proteínica de las BLF, recubriendo e interconectando las micelas de caseína.

Durante el tiempo de almacenamiento las BLF sufrieron cambios en sus valores de G' y G'' , indicando ello modificaciones en su arreglo microestructural; sin embargo, las curvas de estos módulos versus deformación (Figuras 13 y 14) presentaron las mismas tendencias que al primer día post-elaboración, pudiendo identificarse las tres regiones descritas para el día 1 de post-elaboración de las BLF (Figuras 11 y 12).



Los valores de G' para las BLF variaron de mayor a menor de la siguiente forma: BLF_{CG} > BLF_{RG + ICM2} > BLF_{RG + ICM6} > BLF_{RG + FA2} > BLF_{RG + FA4} = BLF_{RG + ICM4} = BLF_{RG} > BLF_{RG + FA6}. En términos generales, los valores de G'' de las BLF se comportaron de manera similar a los de G' , variando de mayor a menor de la siguiente forma: BLF_{CG} = BLF_{RG + ICM2} > BLF_{RG + ICM6} = BLF_{RG + FA2} = BLF_{RG + ICM4} = BLF_{RG + FA4} = BLF_{RG} = BLF_{RG + FA6} (Figura 14).

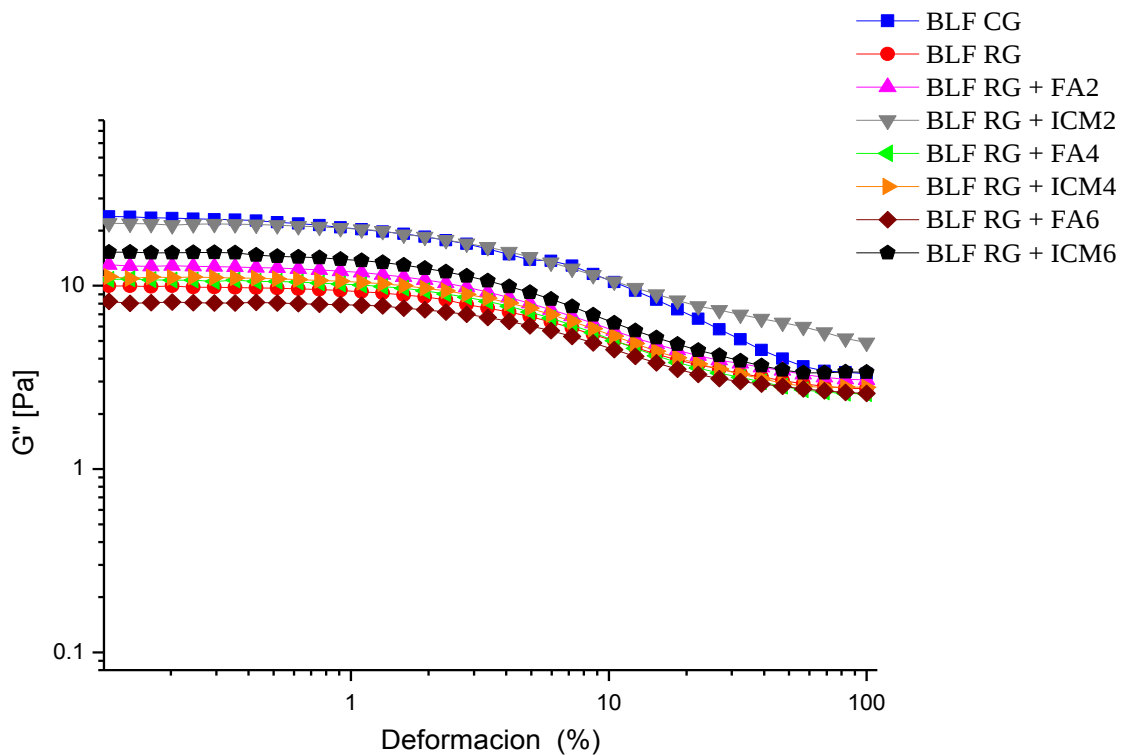


Figura 14. Variación del módulo de pérdida (G'') de las BLF como función de la deformación después de 15 d de almacenamiento.

BLF: bebida láctea fermentada; CG: completa en grasa; RG: reducida en grasa; FA: fructanos de agave; ICM: inulina de cadena media; 2, 4 y 6: g de FA o ICM $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$.

Cambios en las propiedades mecánicas de las BLF confirma su reconocimiento como sistemas alimenticios dinámicos, que sufren re-arreglos estructurales con el tiempo (Lee y Lucey, 2010). Variaciones en los valores de los módulos de G' y G'' de las BLF parecieron estar asociados por una parte con su contenido de grasa y por otra parte con procesos de post-acidificación ocurridos durante el almacenamiento; estos últimos relacionados a su vez con la concentración de oligosacáridos usada en su elaboración. Así, la BLF_{CG} sufrió una mayor estructuración de su red proteínica, lo que se infiere a partir del aumento en sus módulos G' y G'' (Cuadro 4), posiblemente debido al aumento de su acidez a valores establecidos como adecuados para su estructuración (90 °D), a través de la agregación de las micelas de caseína en redes altamente estructuradas (Lobato-Calleros *et al.*, 2009). En contraste, la red proteínica de la BLF_{RG}, no sufrió reforzamiento con el tiempo, permaneciendo los valores de sus módulos G' y G'' prácticamente constantes ($p > 0.05$); lo anterior debido probablemente a la disminución en el número de sus glóbulos de grasa láctea. En relación a las BLF reducidas en grasa incorporadas con oligosacáridos, puede observarse en general que aumentos en las concentraciones de estos sacáridos causaron aumentos significativos en su acidez (Cuadro 3), dando valores mayores ($p \leq 0.05$) que aquel observado para la BLF_{CG}, los cuales produjeron decremento en las propiedades mecánicas de sus redes de proteína, probablemente por afectar el grado de estructuración de los arreglos tridimensionales de las micelas de caseína, a través de una agregación y/o precipitación excesivas. Paseephol *et al.* (2008) elaboraron yogures (0.1 % p/p de grasa láctea) adicionados con 4 % p/p de inulina de cadena larga, media y corta, encontrando que la inulina de cadena media e inulina de cadena corta, no mostraron un efecto notablemente diferente sobre la reología de los yogures. A pesar de ello, los yogures con inulina de cadena media exhibieron una

textura ligeramente más firme que los yogures con inulina de cadena corta, mostrando funciones reológicas más cercanas al yogur completo en grasa. Estos autores supusieron que el efecto de la inulina sobre el comportamiento del yogur se debió a la intervención de la inulina en la formación de la red proteínica; en concreto a la dispersión de sus moléculas entre micelas de caseína, sugiriendo un efecto similar al ejercido por los glóbulos de grasa láctea sobre la formación de la matriz proteínica.

Los valores de $\tan \delta$ (G''/G') de las BLF difirieron significativamente después de 1 d de preparadas dependiendo de su composición; sin embargo los valores de $\tan \delta$ de las distintas BLF fueron similares al correspondiente a la BLF_{CG} (Cuadro 4). Con el tiempo de almacenamiento se observaron pequeñas variaciones en los valores de $\tan \delta$ de las BLF, pero estos no fueron significativos y en este periodo todas las BLF mostraron valores de $\tan \delta$ comparables ($p > 0.05$). $\tan \delta$ es un valor adimensional que compara la cantidad de energía pérdida durante un ciclo de prueba con la cantidad de energía almacenada durante este tiempo. $\tan \delta$ indica si predominan las propiedades viscosas o las propiedades elásticas (Lobato-Calleros *et al.*, 2009). Valores de $\tan \delta$ menores a la unidad (Figuras 15 a y b), indicaron que las BLF tuvieron propiedades elásticas predominantes.

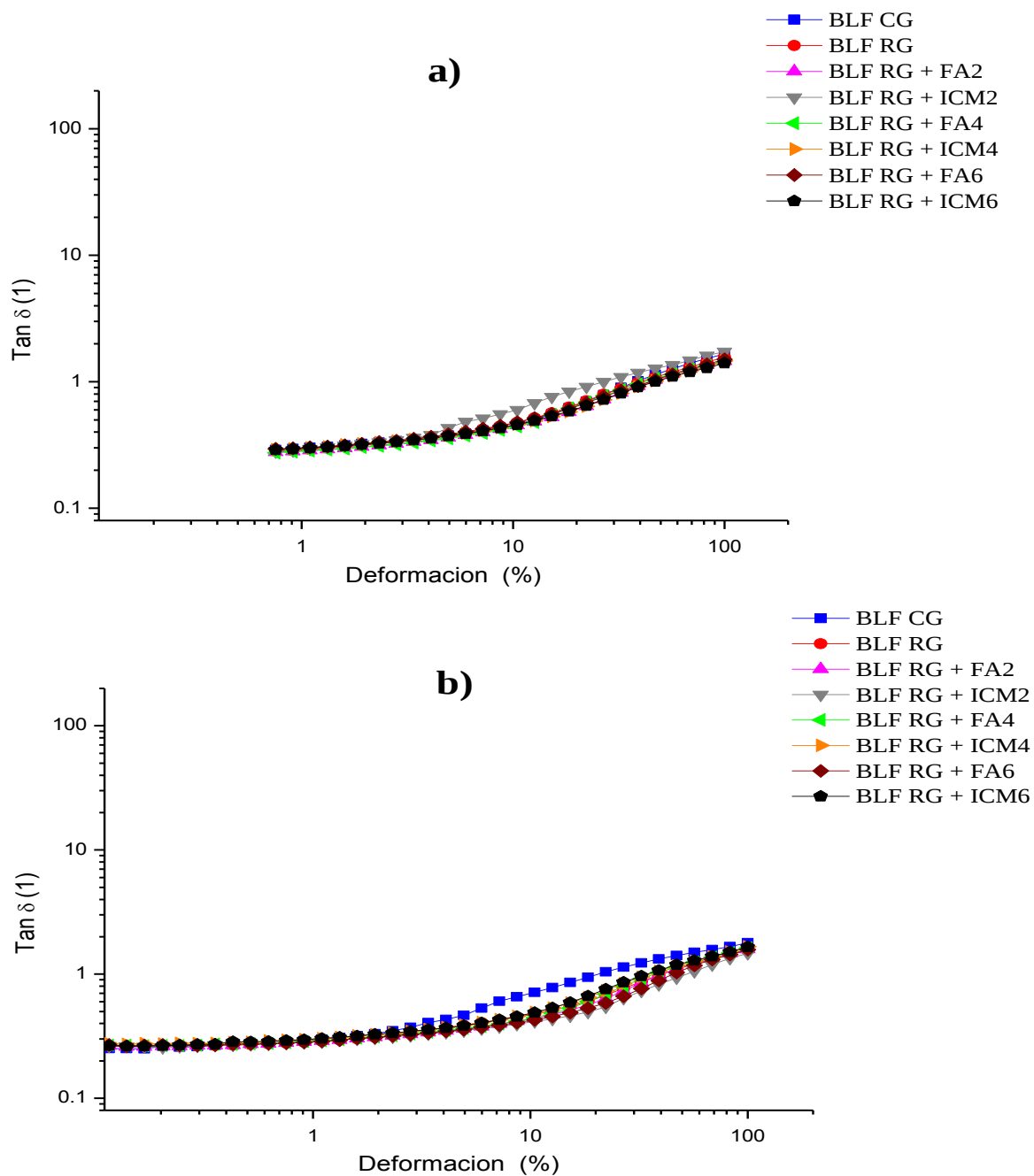


Figura 15. Variación de $\text{Tan } \delta$ de las BLF como función de la deformación, después de:
(a) 1 d preparadas y (b) 15 d de almacenamiento.

BLF: bebida láctea fermentada; CG: completa en grasa; RG: reducida en grasa; FA: fructanos de agave; ICM: inulina de cadena media; 2, 4 y 6: g de FA o ICM $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$.

Cuadro 4. Parámetros reológicos del barrido de amplitud, determinados en la zona visco-elástica lineal, de bebidas lácteas fermentadas en función al tiempo de almacenamiento.

Código de la BLF	G' [¶]		G'' [§]		$\tan \delta$ ^Φ	
	[Pa]		[Pa]		[1]	
	día 1	día 15	día 1	día 15	día 1	día 15
BLF _{CG}	55.58 ^{b A} (1.21)	94.58 ^{f B} (3.04)	15.01 ^{b A} (0.35)	23.36 ^{c B} (1.02)	0.27 ^{ab A} (0.00)	0.25 ^{a A} (0.01)
BLF _{RG}	40.02 ^{a A} (2.24)	39.02 ^{b A} (2.42)	9.17 ^{a A} (0.30)	9.95 ^{a A} (1.06)	0.22 ^{a A} (0.02)	0.25 ^{a A} (0.01)
BLF _{RG + FA2}	58.54 ^{b A} (2.70)	50.83 ^{c A} (2.92)	15.10 ^{b A} (0.65)	12.77 ^{ab A} (1.29)	0.25 ^{ab A} (0.00)	0.25 ^{a A} (0.00)
BLF _{RG + ICM2}	31.99 ^{a A} (2.43)	81.92 ^{e B} (1.54)	9.01 ^{a A} (0.73)	22.00 ^{c B} (1.25)	0.28 ^{b A} (0.04)	0.26 ^{a A} (0.03)
BLF _{RG + FA4}	74.20 ^{c B} (2.12)	40.60 ^{b A} (1.30)	18.66 ^{c B} (1.47)	10.83 ^{ab A} (0.35)	0.25 ^{ab A} (0.02)	0.26 ^{a A} (0.01)
BLF _{RG + ICM4}	50.99 ^{b B} (1.64)	40.31 ^{b A} (1.67)	14.45 ^{b B} (0.53)	11.10 ^{ab A} (0.72)	0.28 ^{b A} (0.01)	0.27 ^{a A} (0.00)
BLF _{RG + FA6}	54.61 ^{b B} (1.49)	30.40 ^{a A} (0.34)	13.03 ^{b B} (0.94)	8.11 ^{a A} (0.21)	0.23 ^{ab A} (0.02)	0.26 ^{a A} (0.00)
BLF _{RG + ICM6}	67.01 ^{c A} (2.39)	60.92 ^{d A} (1.54)	19.35 ^{c B} (1.02)	15.40 ^{b A} (1.94)	0.28 ^{b A} (0.00)	0.25 ^{a A} (0.03)

Valores en paréntesis se refieren a la desviación estándar de las medias; BLF: bebida láctea fermentada; CG: completa en grasa; RG: reducida en grasa; FA: fructanos de agave; ICM: inulina de cadena media. ^{a, b, c, d, e, f}, Diferentes superíndices en la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$) entre variaciones de BLF; ^{A, B}, Diferentes superíndices en la misma fila indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

6.5. Evaluación sensorial de las bebidas lácteas fermentadas

Todos los atributos sensoriales evaluados fueron dependientes de la composición de las BLF y difirieron significativamente (Cuadro 5). Las calificaciones medias de aceptabilidad de los atributos sensoriales de las BLF oscilaron en el rango 5.97 a 7.87, indicando esto que éstas fueron asignadas con calificaciones que variaron de me gusta poco (6.0) a me gusta mucho (8.0) (Cuadro 5). La cremosidad de las variaciones de las BLF, de acuerdo a los panelistas fue percibida en el siguiente orden: $BLF_{RG + ICM4} > BLF_{RG + FA6} = BLF_{RG + ICM6} = BLF_{RG + ICM2} = BLF_{RG + FA4} = BLF_{RG} > BLF_{RG + FA2} > BLF_{CG}$. Estos resultados indican que a pesar de que la BLF_{CG} contuvo mayor fracción grasa, su cremosidad por los consumidores fue percibida como menor ($p \leq 0.05$) a aquellas del resto de las BLF.

La acidez exhibida por la BLF_{CG} fue percibida como similar ($p > 0.05$) a aquellas mostradas por el resto de las BLF; a excepción de la acidez de la $BLF_{RG + ICM6}$ que obtuvo mayor aceptabilidad ($p \leq 0.05$). En relación al dulzor, los panelistas asignaron calificaciones diferenciadas ($p > 0.05$) a las BLF, siendo aquellas formuladas con ICM las que obtuvieron mayor aceptabilidad en este atributo. Lo anterior, probablemente debido a que en estas BLF no hubo sustitución de sacarosa como en el caso de las BLF formuladas con FA. La aceptabilidad del dulzor de las BLF formuladas con FA fue independiente de la concentración de FA adicionada y fue comparable ($p > 0.05$) aquella de la BLF_{CG} . A partir de estos resultados se puede inferir que la sustitución de 1 g de sacarosa por 6 g de FA es correcto para el desarrollo de un dulzor comparable al de la sacarosa.

De forma sorpresiva, en general las bebidas conteniendo ICM o FA mostraron mayor aceptabilidad en el atributo de sabor a yogur, en comparación con la BLF_{CG}. Una probable explicación a este fenómeno pudiera ser el hecho de que los consumidores están acostumbrados a consumir yogures comerciales que en su mayoría contienen ingredientes tales como almidones, pectinas y gomas. Al parecer el sabor a yogur influyó en la aceptabilidad del sabor global de las BLF, presentando la BLF_{CG} la calificación menor ($p \leq 0.05$) en este atributo.

Los resultados de las pruebas de aceptabilidad global de las BLF (Cuadro 5) reflejaron el siguiente orden decreciente de aceptación: $BLF_{RG + ICM4} = BLF_{RG + ICM6} = BLF_{RG + ICM2} = BLF_{RG + FA6} > BLF_{RG + FA4} > BLF_{RG + FA2} = BLF_{RG} > BLF_{CG}$. Estos resultados mostraron mayor aceptabilidad ($p \leq 0.05$) hacia las BLF adicionadas con ICM, independientemente de la concentración usada. Por su parte los FA sólo en una concentración de 6 g 100 g⁻¹ rindieron una bebida (BLF_{RG + FA6}) con aceptabilidad global comparable ($p > 0.05$) a las asignadas a las BLF con ICM. De forma general, las BLF formuladas con ICM o FA superaron la aceptabilidad de la BLF_{CG}.

Cuadro 5. Valores medios de aceptabilidad global y por atributos de bebidas lácteas fermentadas.

Código de la BLF	Aceptabilidad global	Creemosidad	Acidez	Dulzor	Sabor a yogur	Sabor global
BLF _{CG}	6.14 ^a (1.91)	6.07 ^a (1.97)	5.97 ^a (1.95)	6.39 ^a (1.86)	6.24 ^a (1.89)	6.25 ^a (1.90)
BLF _{RG}	6.38 ^{ab} (1.96)	6.88 ^{bc} (1.86)	6.39 ^{ab} (1.98)	6.61 ^{ab} (1.87)	6.87 ^{abc} (1.79)	7.05 ^b (1.81)
BLF _{RG + FA2}	6.62 ^{ab} (1.90)	6.72 ^{ab} (1.64)	6.65 ^{ab} (1.95)	6.50 ^{ab} (1.89)	7.15 ^{bcd} (1.76)	7.07 ^b (1.95)
BLF _{RG + ICM2}	7.44 ^c (1.59)	6.93 ^{bc} (1.86)	6.36 ^{ab} (1.93)	7.07 ^{bc} (1.65)	7.23 ^{bcd} (1.60)	7.41 ^{bc} (1.53)
BLF _{RG + FA4}	6.93 ^{bc} (1.61)	6.85 ^{bc} (1.65)	6.30 ^{ab} (1.76)	6.62 ^{ab} (1.76)	6.84 ^{ab} (1.73)	7.30 ^{bc} (1.72)
BLF _{RG + ICM4}	7.54 ^c (1.75)	7.46 ^c (1.60)	6.62 ^{ab} (1.98)	7.70 ^c (1.61)	7.49 ^{cd} (1.83)	7.77 ^c (1.84)
BLF _{RG + FA6}	7.36 ^c (1.77)	7.10 ^{bc} (1.86)	6.25 ^{ab} (1.92)	6.87 ^{ab} (1.86)	7.20 ^{bcd} (1.71)	7.07 ^b (1.99)
BLF _{RG + ICM6}	7.44 ^c (1.86)	6.98 ^{bc} (1.75)	6.90 ^b (1.99)	7.54 ^c (1.53)	7.52 ^d (1.63)	7.87 ^c (1.51)

Valores medios; BLF: bebida láctea fermentada; CG: completa en grasa; RG: reducida en grasa; FA: fructanos de agave; ICM: inulina de cadena media. ^{a, b, c, d}, Diferentes superíndices en la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$) entre variaciones de BLF.

7. CONCLUSIONES

Modificaciones en la composición de las formulaciones de las bebidas lácteas fermentadas (BLF) causaron diferencias significativas en sus contenidos de grasa, sólidos totales y humedad, pero no en su contenido de proteína.

Las BLF incorporadas con inulina de cadena media (ICM) o fructanos de agave (FA) mostraron valores de acidez mayores con el tiempo de almacenamiento, en comparación con los valores de la bebida láctea fermentada completa en grasa (BLF_{CG}).

La presencia de ICM y FA en concentraciones de 4 y 6 g 100 g⁻¹ en las BLF reducidas en grasa, disminuyó su susceptibilidad a sinéresis a porcentajes comparables al correspondiente a la BLF_{CG}.

Tanto la ICM como los FA formaron estructuras amorfas que se incorporaron a la red proteínica de las BLF y mejoraron sus propiedades viscoelásticas. De esta manera después de 1 d de preparación las BLF_{RG + FA2}, BLF_{RG + FA6} y BLF_{RG + ICM4} presentaron valores de módulo elástico (G') y módulo de pérdida (G'') comparables a aquellos de la BLF_{CG}; mientras que después de 15 d las BLF_{RG + ICM2}, BLF_{RG + ICM6} y BLF_{RG + FA2} fueron las que mostraron valores más cercanos de G' y G'' a aquellos exhibidos por la BLF_{CG}.

Los resultados de la evaluación sensorial indicaron que los atributos sensoriales de cremosidad, acidez, dulzor, sabor a yogur y sabor en general difirieron significativamente entre las BLF, pero las $BLF_{RG + ICM2}$, $BLF_{RG + ICM4}$, $BLF_{RG + FA6}$ y $BLF_{RG + ICM6}$ fueron asignadas con calificaciones de aceptabilidad global mayores significativamente a la asignada a la BLF_{CG} .

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Achanta K., K. J. Aryana, Ch. A. Boeneke. 2007. Fat free plain set yogurts fortified with various minerals. *Food Science and Technology* 40: 424–429.
2. AOAC. 1995. *Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists*, Washington D.C. EUA.
3. Blecker C., J. P. Chevalier, C. Fournies, J. C. Van Herck, C. Deroanne, M. Paquot. 2003. Characterization of different inulin samples by DSC. Influence of polymerization degree on melting temperature. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 71: 215-224.
4. Bourne M. C. 2002. *Food texture and viscosity: Concept and measurement* (2nd ed.). Academic Press. Nueva York.
5. Chiavaro E., E. Vittadini, C. Corradini. 2007. Physicochemical characterization and stability of inulin gels. *European Food Research and Technology* 225: 85-94.
6. Coussement P. A. A. 1999. Inulin and oligofructose: Safe intakes and legal status. *Journal of Nutrition* 129: 1412S–1417S.

7. De Castro F. P., T. M. Cunha., P. L. M. Barreto, R. D. Amboni, E. S. Prudêncio. 2008. Effect of oligofructose incorporation on the properties of fermented probiotic lactic beverages International Journal of Dairy Technology 62: 68-74.
8. De Gennaro S., G. G. Birch, S. A. Parke, B. Stancher. 2000. Studies on the physicochemical properties of inulin and inulin oligomers. Food Chemistry 68: 179-183.
9. Dello Staffolo M., N. Bertola, M. Martino, A. Bevilacqua. 2004. Influence of dietary fiber addition on sensory and rheological properties of yogurt. International Dairy Journal 14: 783-789.
10. El-Nagar G., G. Glowers, C. M. Tudorica, V. Kuri. 2002. Rheological quality and stability of yog-ice cream with added inulin. International Journal of Dairy Technology 55: 89-93.
11. Espinosa-Andrews H., J. E. Urias-Silvas. 2012. Thermal properties of agave fructans (*Agave tequilana* Weber var. Azul). Carbohydrate Polymers 87:2671-2676.
12. Everett D. W., R. E. Mcleod. 2005. Interactions of polysaccharide stabilisers with casein aggregates in stirred skim-milk yoghurt. International Dairy Journal 15: 1175–1183.

13. Flamm G., W. Glinsmann, D. Kritchevsky, L. Prosky, M. Roberfroid. 2001. Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 41: 353–362.
14. Food and Drug Administration (FDA), 1996a. *Lowfat BLFt*. 21CFR 131.203, Code of Federal Regulations. U.S. Dept. of Health and Human Services, Washington, DC.
15. Food and Drug Administration (FDA), 1996b. *Nonfat BLFt* 21 CFR 131.206, Code of Federal Regulations. U.S. Dept. of Health and Human Services, Washington, DC.
16. Guggisberg D., J. Cuthbert-Steven, P. Piccinali, U. Bütikofer, P. Eberhard. 2009. Rheological, microstructural and sensory characterization of low-fat and whole milk set yoghurt as influenced by inulin addition. *International Dairy Journal* 19: 107–115.
17. Guven M., K. Yasar, O. B. Karaca, A. A. Hayaloglu. 2005. The effect of inulin as a fat replacer on the quality of set-type low-fat yogurt manufacture. *International Journal of Dairy Technology* 58: 180-184.
18. Hébert C. L., J. A. Delcour., M. H. Koch., K. Booten, R. Kleppinger, N. Mischenko, H. Reynaers. 1998. Complex melting of semi-crystalline chicory (*Cichorium intybus* L.) root inulin. *Carbohydrate Research* 310: 65-75.

19. Henelly P. J., P. G. Dunne, D. M. O'Sullivan, E. D. O'Riordan. 2006. Textural, rheological and microstructural properties of imitation cheese containing inulin. *Journal of Food Engineering* 75: 388–395.
20. Hess S. J., R. F. Roberts, G. R. Ziegler. 1997. Rheological properties of nonfat yogurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* producing exopolysaccharide or using commercial stabilizer systems. *Journal Dairy Science* 80: 252-263.
21. Janhøj T., M. B. Frøst, R. Ipsen. 2008. Sensory and rheological characterization of acidified milk drinks. *Food Hydrocolloids* 22: 798–806.
22. Kalab M., Allan-Wojtas, P., S. S. Miller. 1995. Microscopy and other imaging techniques in food structure analysis. *Trends in Food Science & Technology* 6: 177-186.
23. Kaur N., A. K. Gupta. 2002. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences* 27: 703–714.
24. Kawai K., K. Fukami, P. Thanatuksorn, C. Viriyarattanasak, K. Kajiwara, 2011. Effects of moisture content, molecular weight, and crystallinity on the glass transition temperature of inulin. *Carbohydrate Polymers* 83: 934–939.
25. Keogh M. K., B. T. O'Kennedy. 1998. Rheology of stirred yogurt as affected by milk fat, protein and hydrocolloids. *Journal of Food Science* 53: 108-112.

26. Kip P., D. Meyer, R. H. Jellema. 2006. Inulins improve sensoric and textural properties of low-fat yoghurts. *International Dairy Journal* 16: 1098-1103.
27. Koca, N., M. Metin, 2004. Textural, melting and sensory properties of low-fat fresh kashar cheeses produced by using fat replacers. *International Dairy Journal* 14: 365-373.
28. Lee W. J., J. A. Lucey. 2010. Formation and physical properties of yogurt. *The Asian-Australasian Association of Animal Production Societies* 23: 1137-1136.
29. Lobato-Calleros C., O. Martínez-Torrijos, O. Sandoval-Castilla, J. P. Pérez-Orozco, E. J. Vernon-Carter. 2004. Flow and creep compliance properties of reduced-fat yoghurts containing protein based fat replacers. *International Dairy Journal* 14: 777–782.
30. Lobato-Calleros C., M. T. Recillas-Mota, T. Espinosa-Solares, J. Alvarez-Ramirez, E. J. Vernon-Carter. 2009. Microstructural and rheological properties of low-fat stirred yoghurts made with skim milk and multiple emulsions. *Journal of Texture Studies* 40: 657-675.
31. López M. G., N. A. Mancilla-Margalli, G. Mendoza-Diaz. 2003. Molecular Structures of Fructans from *Agave tequilana* Weber var. *azul*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7835-7840.

32. López M. G., N. A. Mancilla-Margalli. 2007. The nature of fructooligosaccharides in Agave plants. En *Recent advances in fructooligosaccharides research*. Editores: N. Shiomi, B. Noureddine, O. Shuichi. pp. 47-67. Research Signpost, Kerala, India.
33. Lourens-Hattingh A., B. C. Viljoen. 2001 Yogurt as a probiotic carrier. *International Dairy Journal* 11: 11–27.
34. Mancilla-Margalli, N. A., M. G. López. 2006. Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasylirion species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 7832–7839.
35. McManus W., D. J. McMahon, C. J. Oberg. 1993. High-resolution scanning electron microscopy of milk products: a new sample preparation procedure. *Food Structure* 12: 475-482.
36. Milo L. 2004. Nutraceuticals and functional foods. *Food Technology* 58: 71–75.
37. Nishinari K. 1995. Polysaccharide rheology and in-mouth perception. En *Food Polysaccharides and their Applications*. Editores: A. M. Stephen, G. O. Phillips, P. A. Williams. pp. 517-547. Marcel Dekker, Inc., Nueva York.
38. Morrison F. A. 2001. *Understanding Rheology*, Oxford University Press, Nueva York.

39. Muller H. G. 1973. *Introducción a la Reología de los Alimentos*. Ed Acribia, Zaragoza, España.
40. Niness K. R. 1999. Nutritional and health benefits of inulin and oligofructose. *Journal of Nutrition* 129: 1402S–1406S.
41. Paseephol T., D. M. Small, F. Sherkat. 2008. Rheology and texture of set yogurt as affected by inulin addition. *Journal of Texture Studies* 39: 617–634.
42. Ponce S. J. A., B. E. R. Macías, M. J. F. A. Soltero, E. V. V. Fernández, P. V. Zúñiga, B. H. B. Escalona. 2008. Physical-Chemical and non-linear rheological properties of aqueous solutions of agave fructanos. *e-Gnosis* 6: 1-23.
43. Ramirez-Santiago, C., L. Ramos-Solis, C. Lobato-Calleros, C. Peña-Valdivia, E. J. Vernon-Carter, J. Alvarez-Ramírez. 2010. Enrichment of stirred yogurt with soluble dietary fiber from *Pachyrhizus erosus* L. Urban: Effect on syneresis, microstructure and rheological properties. *Journal of Food Engineering* 101: 229-235.
44. Ritsema T., S. Smeekens. 2003. Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 223–230.
45. Roberfroid M. B. 2007. Inulin-type fructans: functional food ingredients. *The Journal of Nutrition* 137 (suppl. 11): 2493–2502.

46. Roberfroid M. B., J. A. E. Van Loo, G. R. Gibson. 1998. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *The Journal of Nutrition* 128: 11–19.
47. Roberfroid M., J. Slavin. 2000. Nondigestible oligosaccharides. *Critical reviews in Food Science and Nutrition* 40: 461–480.
48. Rosenthal J. A. 2001 *Textura de los alimentos medida y percepción*. Ed. Acribia, Zaragoza, España.
49. Sánchez-Marroquín, A., P. H. Hope. 1953. Agave juice: fermentation and chemical composition studies of some species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1: 246–249.
50. Sandoval-Castilla, O., C. Lobato-Calleros, E. Aguirre-Mandujano, E. J. Vernon-Carter. 2004. Microstructure and texture of yoghurt as influenced by fat replacers. *International Dairy Journal* 14: 151-159.
51. Schaller-Povolny L. A., D. E. Smith, T. P. Labuza. 2000. Effect of water content and molecular weight on the moisture isotherms and glass transition properties of inulin. *International Journal of Food Properties* 3:173-192.
52. Sendra E., P. Fayos, Y. Lario, J. Fernández-López, E. Sayas-Barberá, J. A. Pérez-Alvarez. 2008. Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. *Food Microbiology* 25: 13–21.

53. Serra M., A. J. Trujillo, B. Guamis, V. Ferragut. 2009. Evaluation of physical properties during storage of set and stirred yogurts made from ultra-high pressure homogenization treated milk. *Food Hydrocolloids* 23: 82-91.
54. Steffe J. F. 1996. *Rheological Methods in Food Process Engineering*. 2ª Edición. Freeman Press. East Lansing, MI, EUA.
55. Tabilo-Munizaga, G., G. V. Barbosa-Cánovas. 2005. Rheology for the food industry. *Journal of food Engineering* 67:147-156.
56. Tamime A. Y., R. K. Robinson. 1999. *Yoghurt: Science and Technology*, segunda edición. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, Inglaterra.
57. Tárrega, A., E. Costell. 2006. Effect of inulin addition on rheological and sensory properties of fat-free starch-based dairy desserts. *International Dairy Journal* 16: 1104-1112.
58. Tunland B. C., D. Meyer. 2002. Non-digestible oligosaccharides (dietary fibre): their physiology and role in human health and food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3: 73-92.

59. Tunick M. H., K. L. Mackey, J. J. Shieh, P. W. Smith, P. Cooke, E. L. Malin. 1993. Rheology and microstructure of low-fat Mozzarella cheese. *International Dairy Journal* 3: 649-662.
60. Urías-Silvas, J. E., P. D. Cani., E. Delmeé, M. G. López, N. M. Delzenne. 2008. Physiological effects of dietary fructans extracted from *Agave tequilana* Gto. and *Dasylirospora* sp. *British Journal of Nutrition* 99: 254–261.
61. Van Loo J., P. Coussement, L. de Leenheer, H. Hoebregs, and G. Smits. 1995. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35: 525-552.
62. van Vliet T., J. A. Lucey, K. Grolle, P. Walstra. 1997. Rearrangements in acid induced casein gels during and after gel formation. En *Food Colloids: Proteins, Lipids and Polysaccharides*. Editores: E. Dickinson, B. Bergenstahl. pp. 335-345. Royal Society of Chemistry, Cambridge, Inglaterra.
63. Vijn I., S. Smeekens. 1999. Fructan: More than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology* 120: 351–359.
64. Villegas B., E. Costell. 2007. Flow behaviour of inulin milk beverages. Influence of inulin average chain length and of milk fat content. *International Dairy Journal* 17: 776–781.

65. Wada T., J. Sugatani, E. Terada, M. Ohguchi, M. Miwa. 2005. Physicochemical characterization and biological effects of inulin enzymatically synthesized from sucrose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1246-1253.