

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTUDIO REOLÓGICO DE LA GELIFICACIÓN ÁCIDA DE LA LECHE EN  
PRESENCIA DE GELANA DESACILADA

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Que para obtener el título de *Ingeniero en Alimentos*, presenta:

Mariana Trejo Guerrero

Dirección: Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández.

Codirección: Dr. Norberto Chavarría Hernández.

Tulancingo de Bravo, Hidalgo, 2009

Este trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Físico-Química y Laboratorio de Análisis Especiales del Centro de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de los Alimentos del Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAP) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. La dirección de este trabajo estuvo a cargo de la Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández. El trabajo forma parte de las actividades de los proyectos: **Cátedra Coca-Cola para Jóvenes Investigadores 2005-2007**, XXIX Premio Nacional en Ciencia y Tecnología de Alimentos, distinción otorgada en México a la Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández y **“Consolidación del Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria”**, PIFI P/CA-3 2006-14-04.

# ÍNDICE GENERAL

## RESUMEN

<b>CAPÍTULO 1: GENERALIDADES</b>	<b>1</b>	
1.1	Conceptos básicos de reología	1
1.2	Pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud	6
1.3	Descripción y clasificación de geles alimentarios	10
1.4	Soluciones macromoleculares y geles de polisacáridos	12
1.5	Descripción general de la leche	15
1.5.1	Composición química y estado físico de la leche	15
1.5.2	Importancia tecnológica de la leche	16
1.5.3	Principales constituyentes de la leche	17
1.6	Micela de caseína	23
1.7	Factores que causan la desestabilización de la micela de caseína y la formación de geles lácteos	27
1.8	Propiedades reológicas, microestructurales y sinéresis de los geles ácidos de leche conseguidos por acidificación con glucono- $\delta$ -lactona	30
1.8.1	Propiedades reológicas	31
1.8.2	Microestructura	38
1.8.3	Sinéresis	42
1.9	Gelana	43
1.9.1	Mecanismo de gelificación	44
1.10	Propiedades reológicas y microestructurales de geles de gelana	45
<b>CAPÍTULO 2: FINALIDAD DE LA INVESTIGACIÓN</b>	<b>49</b>	
2.1	Justificación	49
2.2	Objetivos	51
2.2.1	Objetivo General	51
2.2.2	Objetivos específicos	51

<b>CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>52</b>
<b>3.1 Materiales</b>	<b>52</b>
<b>3.2 Métodos</b>	<b>52</b>
3.2.1 Análisis bromatológicos y absorción atómica	52
3.2.2 Preparación de las soluciones y geles ácidos de leche	53
3.2.3 Acidificación con GDL	54
3.2.4 Cinética de pH	54
3.2.5 Pruebas reológicas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud	55
3.2.6 Determinación de temperatura de transición sol-gel de gelana	56
3.2.7 Preparación de gelana y LDP para su visualización microscópica	57
3.2.8 Microscopía de barrido confocal láser	58
3.2.9 Determinación de sinéresis	59
<b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>60</b>
4.1 Temperatura de transición sol-gel de galana	60
4.2 Evolución de las propiedades viscoelásticas de geles ácidos de leche durante la cinética de gelificación	64
4.3 Propiedades viscoelásticas de geles ácidos de leche	75
4.4 Sinéresis de geles ácidos de leche	83
4.5 Microestructura de geles ácidos de leche	87
<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS</b>	<b>95</b>
5.1 Conclusiones	95
5.2 Recomendaciones	96
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>97</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1-1** (a) Un bloque cambia de forma bajo un esfuerzo de corte. (b) El bloque deformado ha sido girado y desplazado mostrando el ángulo  $\Phi$ . La deformación por corte definida como  $x/h$ , es casi igual a  $\Phi$  en radianes (Fuente: Sears y col., 1999). 3
- Figura 1.1-2** Flujo laminar de un fluido viscoso (Fuente: Sears y col., 1999). 4
- Figura 1.2-1** Represtación esquemática de una prueba oscilatoria de pequeña amplitud practicada a una muestra confinada entre dos platos, el plato inferior oscila a una frecuencia  $\omega$ , manteniendo una amplitud de deformación ( $\gamma_0$ ). La respuesta del material a la deformación aplicada es el esfuerzo desfasado en  $\delta$  grados (Fuente: Rodríguez-Hernández y col., 2006). 7
- Figura 1.4-1** Evolución de los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y pérdida ( $G''$ ) con la frecuencia de oscilación en pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud, a) **solución macromolecular** de goma de algarrobo al 2% p/p (modificado de Doublier y Cuvelier 1996)  $G'$  (●) y  $G''$  (○), b) Gel débil de gelana 0.07% en presencia de 0.7 mM  $\text{CaCl}_2$ , c) Gel fuerte de gelana 0.07% en presencia de 7 mM  $\text{CaCl}_2$  (Fuente: Pérez-Campos, 2008). 14
- Figura 1.6-1** Modelo de enlace dual para la organización de la micela de caseína en la leche propuesto por Horne (1998). Barras rectangulares: segmentos hidrofóbicos; líneas negras: segmentos hidrofílicos. CN: caseína, CCP: fosfato de calcio coloidal (Fuente: Lucey, 2002). 24
- Figura 1.6-2** Estructura detallada de una micela de caseína inmovilizada. Microscopía electrónica de barrido (Microscopio Hitachi S-4800) (Fuente: Martin y col., 2006). 26
- Figura 1.6-3** Modelo propuesto para la micela de caseína integrada por subunidades más pequeñas o submicelas (Fuente: Aguilera y Stanley, 1999). 27
- Figura 1.7-1** Reacción de hidrólisis de la glucono-delta-lactona (Fuente: Badui, 2006). 29
- Figura 1.7-2** Rampa de pH durante la acidificación de la leche a 30° C. Círculos oscuros: con 1.3% de GDL. Círculos claros con 2% (p/p) cultivo láctico. La leche fue calentada a 85 °C por 30 minutos. (Fuente: Lucey y Singh, 2003). 30

**Figura 1.8-1 I.** Módulo de almacenamiento ( $G'$ ) en función del tiempo en geles de caseinato de sodio acidificados con GDL. a) y c) Dispersiones hechas sin NaCl, b) y d) Dispersiones con  $0.12 \text{ mol L}^{-1}$  de NaCl. a) y b) Dispersiones acidificadas con 0.376% de GDL. c) y d) Dispersiones acidificadas con 0.517% de GDL. **II.** Efecto del enfriamiento a  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 minutos ( $1\text{K min}^{-1}$ ) de geles de caseinato de sodio (64 horas después de adicionar el GDL) hechos por acidificación con GDL sin adición de NaCl. a) Módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y b) Tangente de delta ( $\text{Tan } \delta$ ). Temperaturas de gelificación en (I) y (II): cuadros blancos a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , diamantes y cuadros oscuros a  $30 \text{ }^\circ$  y  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  respectivamente. Fuente: (Lucey y col., 1997a).

33

**Figura 1.8-2** (I) Cambios de  $G'$  con el tiempo para los geles de leche ácida hechos por acidificación con GDL a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  para (a) Leche sin grasa (b) Leches con 3.5% de grasa donde: *rombos* leche sin calentar; *círculos*, *triángulos* y *cuadrados* leche calentada a 75, 80 o  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  respectivamente por 30 minutos. (II) Cambios de  $G'$  con la frecuencia para (a) Leches sin calentar con diferentes contenidos de grasa donde: *cuadrados*, *rombos* y *triángulos claros* contienen 0, 1.5 y 3.5% de grasa respectivamente. Y (b) Leche con 1.5% de grasa con diferentes tratamientos térmicos donde: *rombos oscuros* corresponde a leche no calentada, *círculos*, *triángulos* y *cuadrados oscuros* corresponden a leches calentadas a 75, 80 y  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  respectivamente por 30 minutos. (Fuente: Lucey y col., 1997a).

35

**Figura 1.8-3** Microscopías confocales de geles de leche ácida hechos de (a) leche descremada sin calentar, (b) leche descremada calentada, (c) leche sin calentar con 1.5% de grasa, (d) leche calentada con 1.5% de grasa, (e) leche calentada con 1.5% de grasa (alta magnificación), (f) leche calentada con 3.5% de grasa (glóbulos de grasa teñidos). El tratamiento térmico fue a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 minutos. En los geles (a) a (e) se usó un marcador de proteína y en estas micrografías la proteína aparece en color blanco mientras que los glóbulos de grasa y el agua aparecen en las zonas oscuras (no fluorescen). En la micrografía (f) se usó un marcador para los glóbulos de grasa y estos aparecen en color blanco. "F" poros grandes. Barra =  $10 \mu\text{m}$ . (Fuente: Lucey y col., 1998a).

40

**Figura 1.8-4** Microscopias confocales de barrido laser de dispersiones de micela de caseína en agua (a y d) y en 70% (b y e) y 200% (c y f) de una solución salina ultra-filtrada simulada de leche 2h posterior a la adición de GDL. La proteína fue etiquetada con Fast Green (FCF). Las imágenes a-c son secciones ópticas individuales, d-e son reconstrucciones ópticas tridimensionales de 25 secciones individuales con un total de profundidad Z de  $25 \mu\text{m}$  e inclinación de  $45^\circ$  con respecto al plano X. Note los agregados de proteína fusionados y las hebras de proteínas rotas (flecha) para la caseína dispersada en agua (a). Barra =  $10 \mu\text{m}$ . (Fuente: Auty y col., 2005).

41

**Figura 1.9-1** Estructura química de gelana nativa. (Fuente: Rodríguez-Hernández, 2004). 44

**Figura. 1.9-2** Modelo esquematizado del mecanismo de gelificación de gelana en presencia de iones monovalentes, a) gelificación de gelana en presencia de concentraciones iónicas totales relativamente bajas, b) gelificación de gelana en presencia de concentraciones iónicas totales altas (Fuente: Miyoshi y Nishinari, 1999). 45

**Figura 1.10-1** Temperaturas de transición sol-gel de gelana durante el proceso de enfriamiento. Los símbolos verdes, azules y rojos corresponden a la temperatura de cruce de los módulos  $G'$  y  $G''$  durante el enfriamiento de soluciones de gelana ( $0.52\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) en cizalla oscilatoria de pequeña amplitud a  $\omega = 1\text{ Hz}$ . Los símbolos rosas corresponden a la temperatura de transición sol-gel durante el enfriamiento ( $0.52\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) de las soluciones de gelana usando el método de tangente de delta. (Fuente: Pérez-Campos, 2008). 48

**Figura 4.1-1** Temperatura de transición sol-gel para gelana 0.05% con 3 mM de  $\text{CaCl}_2$ . a) Tangente de delta en función de la temperatura, el punto convergente indica la temperatura de transición (método de tangente de delta). b) Módulos viscoelásticos ( $G' =$  cuadrados y  $G'' =$  círculos) en función de la frecuencia, a distintas temperaturas cercanas a la temperatura de transición. Determinaciones realizadas dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. 63

**Figura 4.2-1** Evolución de los módulos de almacenamiento ( $G'$ ), de pérdida ( $G''$ ) y tangente del ángulo de desfase ( $\tan \delta = G''/G'$ ) con el tiempo durante la acidificación de la leche con 1% GDL. Determinaciones realizadas a  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ , frecuencia constante de oscilación de  $1\text{ rad/s}$  y deformación dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. Se grafican dos réplicas de cada sistema,  $G' =$  Gráficos en color rojo y guinda,  $G'' =$  Gráficos en azul marino y azul claro,  $\tan \delta =$  Gráficos en negro y verde, pH = diamantes unidos con línea punteada. 65

**Figura 4.2-2** Cinéticas de pH durante la acidificación y gelificación de leche rehidratada y descremada, en ausencia (LL, SG) y presencia de 0.05% gelana (SCa, SC). Las líneas indican el punto de gelificación para los tratamientos carentes de gelana. Determinaciones realizadas a  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ . LL (leche, 1% GDL), SG (Leche, 1% GDL, 3 mM  $\text{CaCl}_2$ ), SCa (leche, 1% GDL, 0.05% gelana), SC (leche, 1% GDL, 0.05% gelana, 3 mM  $\text{CaCl}_2$ ). 70

**Figura 4.3-1** Módulo de almacenamiento ( $G'$ ), módulo de pérdida ( $G''$ ) y  $\tan \delta$  ( $\equiv G''/G'$ ) en función de la frecuencia.  $G'$  cuadrados,  $G''$  círculos,  $\tan \delta$  triángulos invertidos. Se registran los valores promedios de dos determinaciones y su desviación estándar. 76

**Figura 4.3-2** Espectros de los módulos elásticos y  $\tan \delta$  en función de la frecuencia.  $G'$  cuadrados,  $G''$  círculos,  $\tan \delta$  triángulos invertidos. Se registran los valores promedios y su desviación estándar. 78

**Figura 4.3-3** Valores de  $\tan \delta$  en función de la frecuencia de geles ácidos de leche. LL (leche, 1% GDL), SG (Leche, 1% GDL, 3 mM  $\text{CaCl}_2$ ), SCa (leche, 1% GDL, 0.05% gelana), SC (leche, 1% GDL, 0.05% gelana, 3 mM  $\text{CaCl}_2$ ). Valores promedio con su desviación estándar. 81

**Figura 4.4-1** Cantidad de agua exudada a la superficie de los geles monitoreada cada 4 días durante 16 días. 84

**Figura 4.5-1** Microfotografías de geles de leche acidificada y de geles de gelana determinadas por microscopía confocal de barrido láser. Fila (a) sistema LL; Fila (b) Gelana 0.05%, con 3mM de  $\text{CaCl}_2$ . Las imágenes presentadas fueron observadas bajo un lente objetivo de 60X y bajo el mismo acercamiento (zoom= x1.0) a través del eje Z en intervalos de  $\approx 3 \mu\text{m}$ ; a temperatura ambiente ( $\approx 25^\circ \text{C}$ ). 89

**Figura 4.5-2** Microfotografías de geles de leche ácidos en presencia de gelana determinadas por microscopía confocal de barrido láser. Fila (a) sistema SC, Fila (b) sistema SCa, Fila (c) sistema SCa a 10X. Las imágenes de las Filas (a) y (b) fueron observadas en un lente objetivo de 60X y contienen microfotografías en intervalos de  $\approx 3 \mu\text{m}$  de izquierda a derecha a través del eje Z; la Fila (c) contiene microfotografías observadas en un lente objetivo de 10 X y a través del eje Z en intervalos de  $\approx 8 \mu\text{m}$ . Todas las imágenes se sometieron al mismo acercamiento (zoom= x1.0) y a la misma temperatura de observación ( $\approx 25^\circ \text{C}$ ). 91



**Figura 4.5-3** Imagen esquemática de las micelas de caseína cubiertas con moléculas de pectina adsorbidas para estabilizar estéricamente el sistema conforme el pH disminuye (Fuente: Tromp y col, 2004 y Ye, 2008).

92

**Figura 4.5-4 I.** Microscopía confocal de barrido láser de geles de caseinato inducidos por acidificación con glucono delta lactona (2% p/v) después de 6 horas de acidificación (pH=4.0) con diferentes concentraciones de pectina de bajo metoxilo (% p/v): (a) 0; (b) 0.1; (c) 0.4; (d) 0.8. Barra de escala 10  $\mu\text{m}$  (Fuente: Latia-Merino y col., 2004).  
**II.** Microestructura de agregados caseína- $\kappa$ -carragenina, las flechas indican los filamentos de  $\kappa$ -carragenina que unen partículas de caseína formando una red tridimensional en una mezcla formada por leche descremada reconstituida (10.5%) y  $\kappa$ -carragenina (0.025%). Técnica de microscopía electrónica de barrido, barra de escala=100 nm (Fuente: Ji y col., 2008).

92

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.5-1</b> Componentes estructurales de la leche y de sus derivados. (Fuente: Aguilera y Stanley, 1999).	17
<b>Cuadro 1.5-2</b> Fracciones proteínicas de la leche obtenidas por electroforesis (Fuente: Badui, 2006).	19
<b>Cuadro 1.5-3</b> Composición promedio de caseínas en muestra de leche cruda (Fuente: Holt, 1997).	20
<b>Cuadro 1.5-4</b> Las sales de la leche más importantes y su distribución en el suero y en las micelas de caseína. (Fuente: Walstra y col., 1999).	23
<b>Cuadro 1.6-1</b> Características promedio de las micelas de caseína (Fuente: Aguilera y Stanley, 1999).	26
<b>Cuadro 1.8-1</b> Efecto del tratamiento térmico y contenido de grasa en geles de leche ácida. (Fuente: Lucey y col., 1998a).	34
<b>Cuadro 1.8-2</b> Parámetros reológicos que indican reacomodos de interacciones dentro de redes de geles de leche (Fuente: Lucey, 2001).	37
<b>Cuadro 3.2-1</b> Composición porcentual promedio de la leche descremada en polvo (American Dairy®) utilizada en las pruebas (Resultados promedio de 3 determinaciones, entre paréntesis se muestra la desviación estándar).	52
<b>Cuadro 3.2-2</b> Nomenclatura y descripción de los sistemas experimentales.	53
<b>Cuadro 4.2-1</b> Principales valores de los parámetros viscoelásticos y de pH de cada sistema evaluado durante su cinética de gelificación.	66
<b>Cuadro 4.3-1</b> Valores de $n$ de la relación $G' \propto \omega^n$ en los distintos sistemas evaluados	77
<b>Cuadro 4.3-2</b> Valores promedio de tangente de delta de geles ácidos de leche.	78
<b>Cuadro 4.3-3</b> Comparación de medias de Duncan de $\tan \delta$ de los diferentes geles ácidos de leche a 10 °C.	80

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

		Unidades
A	Área	
F	Fuerza Tangente	N
FA	Fluoresceinamina	-
G*	Módulo complejo	[Pa]
G'	Módulo de almacenamiento	[Pa]
G''	Módulo de pérdida	[Pa]
L	Longitud	m
L <sub>0</sub>	Longitud inicial	m
MCBL	Microscopia confocal de barrido láser	-
meq	Miliequivalentes gramo	-
MFA	Microscopia de Fuerza Atómica	-
m	Pendiente de una línea recta	-
mM	Concentración milimolar	1x10 <sup>-3</sup> mol/L
n	Índice de flujo (modelo de Ostwal de Waele)	-
p/p	Relación peso-peso	-
ppm	Partes por millón	mg/kg
T	Temperatura	[° C]
t	Tiempo, tiempo de observación	s
T <sub>c</sub>	Temperatura de cruce de los módulos G', G''	°C
T <sub>ch</sub>	Temperatura de transición conformacional hebra-hélice	°C
T <sub>m</sub>	Temperatura de transición conformacional	°C
T <sub>sol-gel</sub>	Temperatura de transición sol-gel	°C
ZVL	Zona de viscoelasticidad lineal	-
γ <sub>0</sub>	Amplitud de la deformación de cizalla	-
γ	Deformación bajo condiciones de cizalla	-
γ̇	Velocidad de deformación	[s <sup>-1</sup> ]
η	Viscosidad no Newtoniana	[Pa·s]

$\sigma$	<i>Esfuerzo de cizalla</i>	[Pa]
$\delta$	<i>Ángulo de desfase entre el esfuerzo y la deformación en cizalla oscilatoria</i>	[°]
$\tan \delta$	$G''/G'$	-
$\eta_0$	<i>Viscosidad a cizalla tendiente a cero</i>	Pa·s
$\eta_\infty$	<i>Viscosidad a cizalla tendiente a infinito</i>	Pa·s
$\sigma_0$	<i>Esfuerzo de cedencia</i>	Pa
$\tau$	<i>Tiempo de relajación o característico del material</i>	s
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	<i>Fosfato de Calcio Coloidal</i>	-
GDL	<i>Glucono-<math>\delta</math>-Lactona</i>	
FG	<i>Fast Green</i>	
LDP	<i>Leche Descremada en Polvo</i>	

## RESUMEN

Los principales problemas que ocurren cuando la leche es gelificada son la exudación de agua hacia la superficie del gel y propiedades reológicas no deseables en los productos lácteos. La industria de los alimentos controla diversos factores de procesamiento (pretratamiento térmico de la leche, fortificación con proteína de leche y homogenización) para influir en la consistencia de los geles ácidos de leche y para reducir la sinéresis o exudación de suero durante la vida de anaquel de éstos. En este contexto muchas investigaciones se han desarrollado para evaluar polisacáridos que permitan contrarrestar estos problemas. Los polisacáridos utilizados en la mayoría de los estudios son carrageninas y pectinas, sin embargo, gelana desacilada es un polisacárido que a bajas concentraciones puede proveer de redes bien reticuladas capaces de atrapar el agua y los solutos presentes en la leche. Esta característica pudiera permitir conseguir texturas y consistencias estables de los geles lácteos acidificados con propiedades específicas y novedosas. En el presente trabajo se analizó el efecto de la adición de calcio en la gelificación ácida de leche descremada en presencia y ausencia de gelana desacilada, a través de reometría de cizalla oscilatoria y microscopía confocal de barrido láser, con el propósito de establecer relaciones estructura-funcionalidad que coadyuven en la mejora de la estabilidad fisicoquímica de sistemas lácteos acidificados.

Se evaluó el efecto de gelana y calcio en la estabilidad de geles de leche ácida formados por acidificación con Glucono- $\delta$ -lactona (GDL). Se realizaron pruebas de cizalla oscilatoria en régimen lineal, en donde se evaluó la evolución del módulo de almacenamiento ( $G'$ ), módulo de pérdida ( $G''$ ) y tangente de delta ( $\tan \delta = G''/G'$ ) durante la acidificación de la leche a 38 °C y al final de ésta. Se estudiaron 4 tratamientos los cuales contenían leche descremada en polvo rehidratada al 12% p/v de sólidos y GDL 1% p/v, los cuales se diferencian entre sí por la presencia o ausencia de gelana al 0.05% p/v y  $\text{CaCl}_2$  3 mM: **LL**  $\equiv$  Testigo: Leche-GDL, **SG**  $\equiv$  Leche-GDL- $\text{CaCl}_2$ , **SCa**  $\equiv$  Leche-GDL-Gelana y **SC**  $\equiv$  Leche-GDL-Gelana- $\text{CaCl}_2$ . La microestructura de los geles se visualizó por medio de microscopía confocal de barrido láser, usando etiquetado fluorescente para la molécula de gelana (fluoresceinamina) y para las proteínas de la leche (Fast Green). La estabilidad de los geles a la exudación de agua durante el almacenamiento se evaluó cuantificando el agua exudada a la superficie del gel durante 16 días. Pevio a los experimentos, se determinó la temperatura de transición sol-gel de gelana 0.05% con 3 mM de  $\text{CaCl}_2$  a través del método reológico conocido como "tangente de delta", el cual determinó una temperatura de transición de 31.44 °C.

Este dato permitió establecer la temperatura de gelificación de los geles de leche, la cual se fijó a 38 °C para garantizar el estado sol de gelana en los sistemas durante la acidificación de la leche.

La presencia de gelana en los geles ácidos de leche incrementó su carácter sólido determinado por  $G'$ , el cual incrementó de  $27.1 \pm 3.5$  y  $37.2 \pm 2.6$  Pa para LL y SG respectivamente, a  $69.9 \pm 1.3$  y  $61.6 \pm 3.4$  Pa para SCa y SC respectivamente después de  $\approx 3$  horas de gelificación.

Reológicamente, los sistemas continentes de gelana mostraron un carácter sólido-viscoelástico desde el inicio de la gelificación, mientras que en los carentes de gelana se observó una transición sol-gel a  $2911 \pm 65.76$  s y  $2013 \pm 33.94$  s para LL y SG, respectivamente. Aunque el sistema SCa mostró valores mayores de  $G'$  ( $69.9 \pm 1.3$  Pa) que el sistema SC ( $61.6 \pm 3.4$  Pa) al final de la gelificación, la retención de agua fue más favorable en éste último transcurridos 16 días desde su elaboración. El sistema SCa redujo la sinéresis espontánea en un 59% mientras que el sistema SC en un 68%. Los barridos de frecuencia (que se realizaron tanto a  $38$  °C como a  $10$  °C, al finalizar la gelificación) mostraron una marcada dependencia de  $G'$  con la frecuencia. Los geles en presencia de gelana son tendentes a ser geles fuertes mientras que los geles en ausencia del polisacárido son geles débiles. A  $38$  °C no existe diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) en las propiedades viscoelásticas de SCa y SC, mientras que a  $10$  °C el sistema SCa presentó valores de tangente de delta inferiores significativamente ( $P > 0.05$ ) a SC. En las microscopías se observaron zonas gelificadas aisladas entre sí, de leche y de gelana, siendo de mayor tamaño las primeras. La presencia del polisacárido es evidente en toda la red de leche, por lo que es posible que la gelana gelifique anticipadamente a la caseína formando una red que mantiene en suspensión a las caseínas agregadas por la gelificación. La adición de  $\text{CaCl}_2$  a los sistemas leche-gelana generó sistemas con mayor retención de agua.

# **19Capítulo 1: GENERALIDADES**

## **1.1 CONCEPTOS BÁSICOS DE REOLOGÍA**

El término Reología proviene del griego “panta rhei” que significa todo fluye. La reología se ha definido como la ciencia que estudia la deformación y el comportamiento al flujo de todo tipo de materiales; es decir, estudia la respuesta de los materiales a esfuerzos o deformaciones aplicadas. Para describir una prueba reológica se utilizan “ecuaciones constitutivas”, las cuales relacionan variables dinámicas (presión, esfuerzo, fuerza) con variables cinemáticas (deformación, velocidad de deformación). La reología se fundamenta en la física clásica y de mecánica de fluidos, donde los trabajos de materiales perfectos como el sólido elástico de Hooke y el líquido viscoso de Newton han sido la base para describir la respuesta de los materiales. Sin embargo, casi siempre los materiales presentan un comportamiento intermedio entre el líquido y el sólido perfecto, de ahí la necesidad de interpretar sus respuestas complejas cuando presentan a la vez, elasticidad y viscosidad (materiales viscoelásticos). Las propiedades reológicas son funciones materiales, lo cual nos garantiza que son parámetros no dependientes del instrumento usado para las determinaciones (Rodríguez-Hernández y col., 2006).

En el área de los alimentos, la reología tiene distintas aplicaciones, por ejemplo para correlacionar atributos de textura o consistencia con las respuestas reológicas obtenidas, para conocer la funcionalidad de biomoléculas alimenticias ante esfuerzos mecánicos, para el control de operaciones unitarias durante el procesamiento de alimentos, para diseñar o mejorar nuevos productos alimentarios, entre otras. En Reología de alimentos interesa comprender la relación entre las fuerzas aplicadas a un material alimenticio y las deformaciones que padece como consecuencia de

éstas. Para ello es necesario definir conceptos clave que permitan un entendimiento más completo respecto a las pruebas reológicas.

La **deformación** describe el cambio de forma de un material que resulta de la aplicación de una fuerza. El **esfuerzo** por su parte es una entidad física que caracteriza la intensidad de las fuerzas que causan la deformación. Si el esfuerzo y la deformación son pequeños, es común que sean directamente proporcionales y la constante de proporcionalidad se conoce como “módulo de elasticidad (E)”. Esta relación entre esfuerzo ( $\sigma$ ) y deformación ( $\gamma$ ) se denomina Ley de Hooke de la elasticidad (ecuación 1). Y no es realmente una ley general sino un resultado experimental válido sólo dentro de un intervalo limitado de esfuerzos y deformaciones (Sears y col., 1999).

$$\sigma = E\gamma \quad (1)$$

Por ello resulta importante en reometría alimentaria determinar el esfuerzo de ruptura del material y realizar las pruebas mecánicas en la zona de comportamiento elástico, donde el módulo de elasticidad es respuesta fiel y precisa de la proporcionalidad entre el esfuerzo y la deformación.

#### **a) Esfuerzo y deformación cortantes**

El **esfuerzo de corte** ( $\sigma$ ), también llamado de cizalla, se define como la fuerza (F) tangente a una superficie material, dividida entre el área sobre la que actúa (Sears y col., 1999) (ecuación 2).

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (2)$$

En la figura 1.1-1a se muestra una deformación por esfuerzo cortante. El contorno negro *abcd* representa un bloque de material sin esfuerzo aplicado. El área sombreada *a' b' c' d'* es el mismo bloque sometido a un esfuerzo de corte. En la figura 1.1-1a los centros del bloque con esfuerzo y sin esfuerzo aplicado coinciden. La deformación en la figura 1.1-1b es la misma, pero ésta se desplazó y giró para hacer coincidir los bordes *ad* (bordes sin esfuerzo) y *a'd'* (bordes esforzados). En un esfuerzo de corte las longitudes de las caras



siguen siendo casi constantes; todas las dimensiones paralelas a la diagonal  $ac$  aumentan en longitud, y las paralelas a  $bd$  disminuyen. Definimos la **deformación cortante** ( $\gamma$ ) o de cizalla como el cociente del desplazamiento “ $x$ ” de la esquina  $b$  y la dimensión transversal “ $h$ ”:

$$\gamma = \frac{x}{h} = \tan \theta \quad (3)$$

En situaciones reales  $x$  suele ser mucho menor que  $h$ ,  $\tan \theta$  es casi igual a  $\theta$  (en radianes) y la deformación es simplemente el ángulo  $\theta$  en radianes. Como todas las deformaciones, la de corte es adimensional; es un cociente de dos longitudes. Si las fuerzas son pequeñas de modo que se cumpla la ley de Hooke, la deformación por corte es proporcional al esfuerzo de corte. El módulo de elasticidad correspondiente se denomina “Módulo de cizalla ( $G$ )”.

$$G = \frac{\text{Esfuerzo de corte}}{\text{deformación n de corte}} = \frac{\sigma}{\gamma} = \frac{F/A}{x/h} = \frac{F}{A} \frac{h}{x} = \frac{F}{A} \frac{1}{\theta} \quad (4)$$

Con  $x$  y  $h$  definidos como en la figura 1.1-1 (Sears y col., 1999).

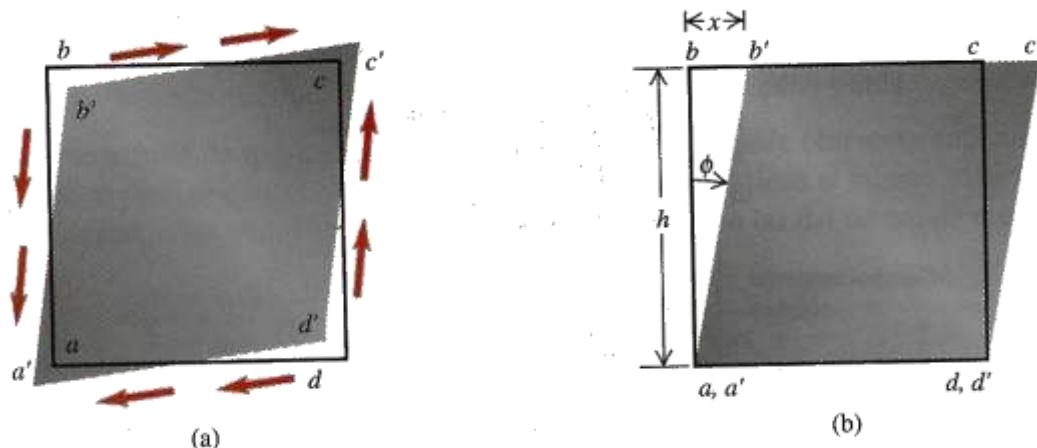


Figura 1.1-1 (a) Un bloque cambia de forma bajo un esfuerzo de corte. (b) El bloque deformado ha sido girado y desplazado mostrando el ángulo  $\Phi$ . La deformación por corte definida como  $x/h$ , es casi igual a  $\Phi$  en radianes (Fuente: Sears y col., 1999).

## b) Viscosidad y velocidad de cizalla

La **viscosidad** ( $\eta$ ) es una medida de la fricción interna en un fluido. Las fuerzas viscosas se oponen al movimiento de una porción de un fluido con relación a otra. El ejemplo más sencillo de flujo viscoso es el movimiento de un fluido entre dos placas paralelas (figura 1.1-2). La placa inferior es estacionaria y la superior se mueve con una velocidad constante. El fluido en contacto con cada superficie tiene la misma velocidad que la superficie. La rapidez de flujo de capas intermedias de fluido aumenta uniformemente de una superficie a la otra, como indican las flechas, así que las capas de fluido se deslizan suavemente unas sobre otras. El flujo es laminar. Una porción del fluido que tiene la forma  $abcd$  en cierto instante tiene la forma  $abd'c'$  un instante después y se distorsiona cada vez más al continuar el movimiento. Es decir, el fluido está en un estado de *deformación cortante* en continuo aumento. Para mantener este movimiento, se debe aplicar a la placa superior una fuerza constante "F" hacia la derecha para que siga moviéndose y una fuerza de igual magnitud hacia la izquierda a la placa inferior para mantenerla fija. Si "A" es el área de cada placa, la relación  $F/A$  es el esfuerzo cortante ejercido sobre el fluido. En un sólido la deformación por corte es proporcional al esfuerzo cortante.

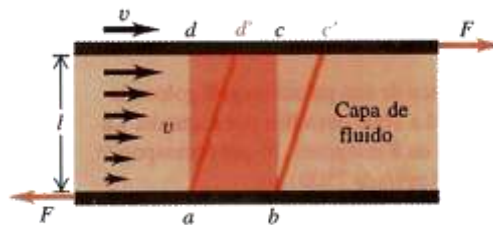


Figura 1.1-2 Flujo laminar de un fluido viscoso (Fuente: Sears y col., 1999).

En un fluido la deformación por corte aumenta continuamente y sin límite mientras se aplica el esfuerzo; el esfuerzo no depende de la deformación por corte, sino de su rapidez de cambio. La razón de cambio de la deformación, también llamada *velocidad de deformación* o **velocidad de cizalla** ( $\dot{\gamma}$ ), es un gradiente de velocidad y es igual a la razón de cambio de  $dd'$  (la rapidez "u" de la superficie móvil) dividida entre  $l$ , es decir,

$$\dot{\gamma} = \frac{u}{l} \quad (5)$$

La viscosidad del fluido ( $\eta$ ) se define como la relación entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación:

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}} \quad (6)$$

Las viscosidades de todos los fluidos dependen mucho de la temperatura, aumentando para los gases y disminuyendo para los líquidos a medida que aumenta la temperatura (Sears, y col., 1999). La viscosidad de un fluido también está en función de las masas moleculares de los solutos y el nivel de agregación molecular de éstos; es decir, un material puede ser muy viscoso por presentar moléculas muy grandes o porque forma agregados moleculares de tamaño grande (Bird y col., 2006).

### **c) Flujo de cizalla simple y viscosimétrico**

Un **flujo de cizalla simple** es aquel que se ajusta a lo siguiente (Bird y col., 2006):

- ✓ Las superficies de cizallamiento (capas de fluido), deben moverse de forma isométrica; es decir, la distancia entre cualquiera de sus partículas vecinas en la superficie o capa es constante.
- ✓ Las capas de fluido son paralelas a las fronteras sólidas.
- ✓ El volumen de cada elemento de fluido es constante
- ✓ El flujo es unidireccional
- ✓ La velocidad de cizalla es constante

Al flujo de cizalla simple con rapidez de cizalla independiente del tiempo (reológicamente estacionario) se le denomina **flujo viscosimétrico**. El desarrollo de flujos viscosimétricos es fundamental para la caracterización reológicamente de fluidos en equipos destinados para esto (viscosímetros, reómetros).

#### **d) Reómetros y pruebas reológicas**

Los reómetros son instrumentos capaces de determinar propiedades reológicas de los materiales. Los tipos más comunes son: rotacionales, capilares y extensionales. Los reómetros rotacionales son los más usados en la determinación de propiedades reológicas de alimentos y en bioprocesos en general. Estos pueden funcionar bajo control de esfuerzo “reómetro de esfuerzo controlado” o bajo control de deformación “reómetro de deformación controlada” (Rodríguez-Hernández y col., 2006).

Estos reómetros cuentan con diversas geometrías donde se deposita la muestra del material que es sometida ya sea a esfuerzos o deformaciones controladas. Así por ejemplo, la geometría de cilindros concéntricos es útil para caracterizar suspensiones y materiales que requieran tiempos largos de experimentación ya que minimiza la evaporación de la muestra. Los cilindros concéntricos de doble pared son eficaces para fluidos de viscosidad baja y la geometría de cono-plato es útil en materiales de viscosidad media a alta y su principal ventaja es que la velocidad de corte es constante en la muestra.

### **1.2 PRUEBAS DE CIZALLA OSCILATORIA DE PEQUEÑA AMPLITUD**

Las pruebas mecánico-dinámicas son utilizadas para estudiar o caracterizar el comportamiento viscoelástico de los materiales. Dentro de estas pruebas las más comunes son las de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud y permiten determinar si en el material viscoelástico predomina el carácter sólido o viscoso; y si este comportamiento es estable en función del tiempo (o frecuencia). En las pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud (figura 1.2-1) el material se somete a un esfuerzo o deformación oscilatoria sinusoidal a una frecuencia  $\omega$  (Hz, rad/s), si el comportamiento viscoelástico es lineal, la respuesta del material (deformación o esfuerzo) oscilará también sinusoidalmente pero estará fuera de fase con la perturbación aplicada en un

ángulo  $\delta$ . La diferencia de fase entre el esfuerzo y la deformación, así como la amplitud de la deformación resultante, se miden y se utilizan para determinar las funciones materiales o módulos de viscoelasticidad,  $G'$ ,  $G''$  y la relación entre ellos ( $\tan \delta = G''/G'$ ) (Rodríguez-Hernández y col., 2006).

$G'$  indica la cantidad de energía que es almacenada en el material en cada ciclo de deformación, la cual puede recuperarse al término de éste, por lo que este parámetro se denomina “módulo de almacenamiento” y describe el carácter elástico, “tendencia sólida” del material. Por su parte,  $G''$  hace referencia a la cantidad de energía disipada, no recuperable, en un ciclo de deformación, es el “módulo de pérdida” de la energía cuando los esfuerzos se relajan, describe el carácter viscoso y la tendencia fluida del material.

Para un sólido perfecto, donde el material es completamente elástico, toda la energía es almacenada y recuperada en cada ciclo,  $G''$  tendrá un valor de cero y el esfuerzo y deformación estarán en fase ( $\delta = 0$ ).

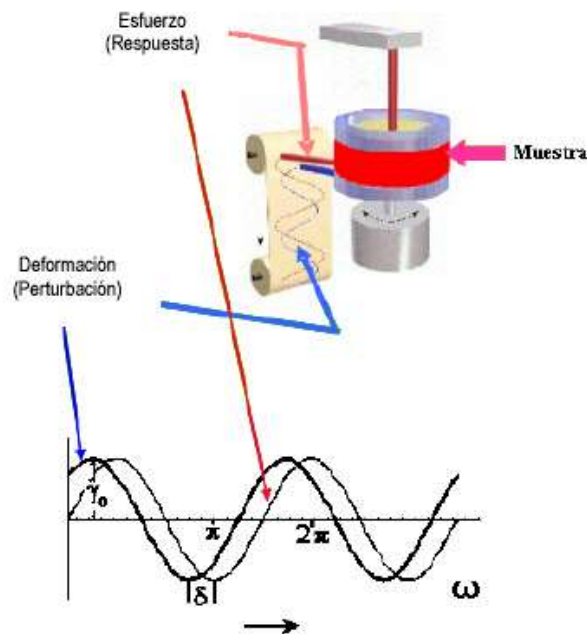


Figura 1.2-1 Representación esquemática de una prueba oscilatoria de pequeña amplitud practicada a una muestra confinada entre dos platos, el plato inferior oscila a una frecuencia  $\omega$ , manteniendo una amplitud de deformación ( $\gamma_0$ ). La respuesta del material a la deformación aplicada es el esfuerzo desfasado en  $\delta$  grados (Fuente: Rodríguez-Hernández y col., 2006).

Contrariamente, para un líquido perfecto, toda la energía se disipa,  $G'$  tendrá un valor de cero y el esfuerzo y la deformación estarán desfasados  $90^\circ$  (Rodríguez-Hernández, 1997).

En términos del esfuerzo aplicado y la deformación resultante en una muestra sometida a cizalla oscilatoria de pequeña amplitud, se definen los módulos dinámicos,  $G'$  y  $G''$ . El esfuerzo y deformación se pueden modelar a través de un movimiento armónico simple por las siguientes ecuaciones (Pérez-Campos, 2008):

$$\gamma = \gamma_0 \cos(\omega t) \quad (7)$$

La respuesta del material a esta perturbación sería:

$$\sigma = \sigma_0 \cos(\omega t + \delta) \quad (8)$$

A partir de estas ecuaciones se puede llegar a la deducción de funciones materiales de importancia para la caracterización de los materiales viscoelásticos. En este caso, el módulo de almacenamiento ( $G'$ ), el módulo de pérdida ( $G''$ ) y la tangente de delta ( $\tan \delta$ ). Dividiendo la ecuación 8 entre  $\gamma_0$  y aplicando la identidad trigonométrica:

$$\frac{\sigma}{\gamma_0} = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cos \delta \cdot \cos \omega t - \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \operatorname{sen} \delta \cdot \operatorname{sen} \omega t \quad (9)$$

En la ecuación 9 los términos que son independientes de la amplitud de la deformación aplicada y considerados propiedades del material son:

$$\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cos \delta \equiv G' \quad (10)$$

$$\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \operatorname{sen} \delta \equiv G'' \quad (11)$$

A partir de los módulos dinámicos,  $G'$  y  $G''$ , se obtiene  $\tan \delta$ :

$$\frac{G''}{G'} = \frac{\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cos \delta}{\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \sin \delta} = \tan \delta \quad (12)$$

Por lo tanto la función  $\tan \delta$  nos permitirá conocer la tendencia elástica o viscosa del material. Las pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud, se llevan a cabo bajo las siguientes condiciones (Rodríguez-Hernández, 2004):

- ✓ Efectos de inercia despreciables.
- ✓ Deformación relativa homogénea.
- ✓ Oscilación armónica simple.
- ✓ La amplitud del esfuerzo es proporcional a la amplitud de la deformación.
- ✓ El desfase ( $\delta$ ) es independiente de la amplitud del esfuerzo ( $\sigma_0$ ) o amplitud de la deformación ( $\gamma_0$ ).

Pérez-Campos (2008) cita algunas de sus aplicaciones:

- Evaluación de la estabilidad y fuerza del gel
- Seguimiento de la gelificación de polisacáridos
- Estudio de las transiciones vítreas
- Seguimiento de la desnaturalización y gelificación de las proteínas

Las pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud se dividen principalmente en:

- a) Barrido de temperatura
- b) Barrido de tiempo
- c) Barrido de frecuencia
- d) Barrido de deformación

En cada una de estas pruebas se evalúan los módulos dinámicos,  $G'$  y  $G''$ , en función de la temperatura, tiempo, frecuencia y deformación, respectivamente; manteniendo constante el resto de las variables de estudio. Los barridos de frecuencia permiten estudiar el comportamiento del material

a distintos tiempos de observación, desde tiempos largos (frecuencias de medición bajas) hasta tiempos más cortos (frecuencias altas), con la finalidad de interpretar la tendencia de su comportamiento viscoelástico a través de un espectro de observación más completo. El barrido de deformación proporciona los límites de la zona viscoelástica lineal, es decir la zona en donde los esfuerzos son proporcionales a las deformaciones resistidas por el material. Un barrido de tiempo permite conocer la formación de estructuras en tiempo real, la trayectoria y transición (si fuera el caso) desde que el material tiene cierta tendencia viscosa o elástica, hasta que adquiere la tendencia opuesta. El barrido de temperatura, también permite en tiempo real conocer la trayectoria del material a través de las alteraciones térmicas que en aumento o detrimento permitan la transición de fases (por ejemplo transición sol-gel). Estas pruebas son herramienta útil para interpretar y discernir entre soluciones macromoleculares o geles verdaderos y sus características viscoelásticas; mismas que pueden ser apoyadas por otras pruebas para realizar estudios más completos.

### **1.3 DESCRIPCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE GELES ALIMENTARIOS**

Aguilera y Stanley (1999) definen a un gel como “una red tridimensional formada por la asociación o enlaces cruzados de moléculas poliméricas largas, las cuales atrapan e inmovilizan al disolvente líquido formando una estructura rígida”. Aunque existen diferentes interpretaciones respecto a lo que es un gel, la definición propuesta por Aguilera nos permitirá comprender la naturaleza de las interacciones que ocurren en sistemas biopoliméricos complejos como los geles de leche. Es importante considerar que un gel difiere de otros sistemas dispersos en los fenómenos que alteran sus propiedades físicoquímicas, lo cual está en función de la estructura de las macromoléculas involucradas y las características de su ambiente dispersante. Esta idea nos permite percibir que existen diferentes tipos de



geles. Pérez-Campos (2008) cita una clasificación de geles biopoliméricos, con base al nivel de organización microestructural que tienen antes y durante la formación de la red:

1. Gelificación de cadenas desordenadas de polímeros: En estos sistemas la transición sol-gel ocurre al disminuir la temperatura, al cambiar la composición del disolvente o por la introducción de iones específicos. A este tipo de geles también se les ha denominado “redes de asociación”. Una característica importante de estos sistemas es que son homogéneos a nivel macromolecular (por ejemplo; geles de carragenina, pectinas, gelana, amilasa, entre otros).
2. Gelificación por agregación de partículas: Para estos sistemas la gelificación es propiciada por la interacción de partículas más densas y menos flexibles. Entre los ejemplos más claros destacan, la gelificación producida por la desnaturalización de las proteínas, la gelificación por medio de la agregación de proteínas inducida por efectos químicos o por la acción de una enzima (ejemplo; gelificación de las caseínas).

Pérez-Campos (2008), también cita que los geles formados por polisacáridos (como gelana) se encuentran en el grupo 1 y en todos los casos los entrecruzamientos de las cadenas se originan por interacciones moleculares de tipo Van der Waals (puentes de hidrógeno, atracciones dipolo-dipolo) aunque también las atracciones electrostáticas y las interacciones hidrofóbicas son importantes. Por otro lado, los geles de proteínas lácteas se encuentran en el grupo 2; será interesante analizar una estructura convergente con geles mixtos de proteína-polisacárido.

## 1.4 SOLUCIONES MACROMOLECULARES Y GELES DE POLISACÁRIDOS

La **gelificación de polisacáridos** se debe a la formación de una red tridimensional interconectada por enlaces físicos entre las cadenas del polímero.

Estos sistemas son capaces de atrapar más del 90% de su peso en agua o de la solución electrolítica en la que se encuentran. Los geles formados por polisacáridos suelen ser clasificados como geles fuertes o geles débiles de acuerdo con la apariencia física que presentan. Cuando no sucede la gelificación, los sistemas dispersos a base de polisacáridos se denominan **soluciones macromoleculares** (Pérez-Campos 2008). Reológicamente, es posible hacer una discriminación entre los tres sistemas mencionados, ya que frecuentemente la apreciación visual pudiera ser errónea, es decir sistemas muy viscosos sin formación de redes permanentes pudieran ser descritos como geles débiles, además de no ser posible marcar la frontera entre geles débiles y geles fuertes, ya que tal distinción está en función del tiempo de observación y de la magnitud de los esfuerzos a los que éstos se someten.

Una **solución macromolecular** puede ser interpretada por medio de su barrido de frecuencia. La figura 1.4-1a muestra la gran dependencia que tienen los módulos viscoelásticos con la frecuencia. A tiempos largos de observación (frecuencias bajas), el módulo de pérdida ( $G''$ ) es mayor que el módulo de almacenamiento ( $G'$ ), por consiguiente existe un predominio del carácter viscoso debido a que no existe una red polimérica.

Si la frecuencia aumenta, los módulos se cruzan y entonces  $G' > G''$ , a partir de entonces parece haber poca dependencia de los módulos con la frecuencia. Este comportamiento depende de las características de los

polisacáridos en solución y de forma más específica del número de enlaces de vida corta existentes entre las macromoléculas.

Los **geles fuertes** (figura 1.4-1c), no muestran dependencia con los cambios en los tiempos de observación, es decir, los módulos se mantienen constantes e independientes del valor de la frecuencia y  $G'$  siempre predomina sobre  $G''$ , siendo este predominio de al menos un orden de magnitud, lo cual genera un valor de  $\tan \delta \leq 0.1$  (Doublier y Cuvelier, 1996). La hipótesis general para los materiales que presentan este tipo de comportamiento, es la formación de una red tridimensional estable que le permite al gel ser “autosostenible”, es decir; la gravedad no es un factor suficiente para que el gel se deforme de manera considerable, provocando su fractura.

En cuanto a **geles débiles**, algunos autores proponen que éstos son sistemas con apariencia sólida que al ser sometidos a esfuerzos lo suficientemente grandes exhiben un comportamiento fluido (Doublier y Cuvelier, 1996). Otros estudios (Ross-Murphy, 1995) proponen que un gel fuerte, al igual que un gel débil, muestran comportamientos reológicos similares al ser sometidos a deformaciones pequeñas en intervalos cortos de frecuencia ( $10^{-3}$ - $10^2$  rad/s), es decir en ambos casos predomina  $G'$  sobre  $G''$ , pero en un gel débil la dependencia de estos módulos con la frecuencia es mayor. Otra característica importante es la amplitud de su zona de viscoelasticidad lineal (ZVL); para Ross-Murphy un gel fuerte tiene una ZVL corta en comparación con la presentada por un gel débil, además a estos últimos se les atribuye una mayor capacidad de recuperación después de haber sido fracturados, lo cual no se presenta en un gel fuerte (Ross-Murphy, 1995). En la figura 1.4-1 se muestra un espectro reológico característico de cada sistema.

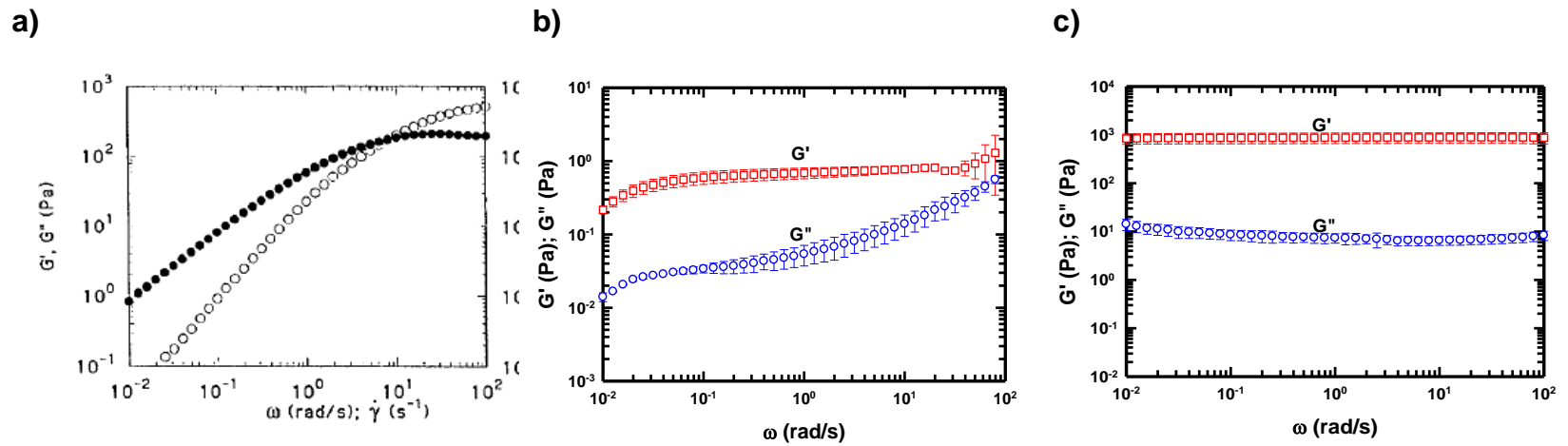


Figura 1.4-1 Evolución de los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y pérdida ( $G''$ ) con la frecuencia de oscilación en pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud, a) **solución macromolecular** de goma de algarrobo al 2% p/p (modificado de Doublier y Cuvelier 1996)  $G'$  (●) y  $G''$  (○), b) Gel débil de gelatina 0.07% en presencia de 0.7 mM  $\text{CaCl}_2$ , c) Gel fuerte de gelatina 0.07% en presencia de 7 mM  $\text{CaCl}_2$  (Fuente: Pérez-Campos, 2008).

## 1.5 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA LECHE

La leche es un líquido secretado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos tras el nacimiento de la cría. Es un líquido de composición compleja, blanco y opaco, de sabor dulce y reacción iónica (pH) próxima a la neutralidad. La función natural de la leche es la de ser el alimento exclusivo de los mamíferos jóvenes durante el periodo crítico de su existencia, tras el nacimiento, cuando el desarrollo es rápido y no puede ser sustituida por otros alimentos. La gran complejidad de la composición de la leche responde a esta necesidad (Alais, 2001).

Puesto que sus componentes se encuentran en la forma y en las proporciones adecuadas, es un alimento con alto valor nutritivo, razón por la cual el ser humano continúa consumiendo leche de vaca y de algunos otros mamíferos domesticados durante toda su vida. Su consumo como leche fluida y sus derivados se lleva a cabo desde la antigüedad. Es este el motivo que le ha permitido ser uno de los alimentos para el hombre más ampliamente estudiado.

### 1.5.1 Composición química y estado físico de la leche

En general, la leche está constituida por agua, grasa, proteínas, azúcares, vitaminas y minerales; además de otras sustancias que están presentes en menor concentración y que en conjunto forman un sistema físico-químico estable de más de 450 compuestos, esto se debe a que todos sus componentes están en equilibrio, estableciendo diversos estados de dispersión (Badui, 2006). En este contexto, la leche es una *emulsión* de materia grasa en forma globular, dentro de un líquido que muestra analogías con el plasma sanguíneo. Este líquido es así mismo una *suspensión* de materias proteicas en un suero constituido por una *solución* neutra que contiene, principalmente, lactosa y sales minerales además de una fracción

proteínica. De este modo, los diversos estados de dispersión de la leche, interactúan entre sí para formar un líquido en equilibrio y de composición uniforme.

En la leche existen cuatro tipos de componentes importantes: lípidos, lactosa, proteínas, sales. Los sólidos totales grasos y no grasos, representan del 11 al 15% de su composición y varían de acuerdo a muchos factores, tales como la raza y edad de la vaca, tipo y frecuencia de la alimentación, estado de lactación, temperatura ambiente, enfermedades padecidas por la vaca lechera, época del año, hora del día de la ordeña, entre otros. En función de la raza, de acuerdo con (Badui, 2006), entre el 85.6 al 88.1% de la composición de la leche es agua; la grasa varía del 3.4 al 5.1%, la proteína de 3.1 a 3.7%, la lactosa de 4.4 a 4.7% y las cenizas de 0.71 a 0.75%.

### **1.5.2 Importancia tecnológica de la leche**

Como ya ha sido mencionado los componentes de la leche existen en un estado de equilibrio dinámico, en el cual el estado coloidal es predominante. Ahora bien, la importancia de las propiedades tecnológicas de la leche deriva no tanto de su composición química sino de su estructura emergente a consecuencia de las interacciones entre sus distintos componentes.

Así, los principales productos lácteos son formados cuando los tres componentes estructurales básicos de la leche – micelas de caseína, glóbulos de grasa y proteínas del suero – alcanzan un “estado activo”, ya sea por modificaciones en la temperatura o fuerza iónica, principalmente, que permite las interrelaciones estructura-función en el medio acuoso (Aguilera y Stanley, 1999). En estas circunstancias, el conocimiento micro y ultra estructural de los componentes de la leche permite comprender los fenómenos dinámicos que dan lugar a su estado de equilibrio físico-químico y su posterior control y/o consecuente modificación (de ser necesario)

durante la elaboración de derivados lácteos. Garantizar que los derivados lácteos presenten al menos la misma calidad nutricia que la leche cruda y que además sean precisos a las demandas sensoriales del consumidor es tarea fundamental de los ingenieros y tecnólogos de alimentos.

### 1.5.3 Principales constituyentes de la leche

Las características fisicoquímicas de los principales componentes y elementos microestructurales encontrados en la leche fluida se muestran en el cuadro 1.5-1.

#### A) Grasa láctea y el glóbulo de grasa

La leche contiene entre un 96 y un 98% de triacilglicéridos, los otros lípidos que se encuentran en menor concentración desempeñan funciones importantes, dentro de los cuales destacan los diacilglicéridos, monoacilglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos libres, esteroides y sus ésteres.

Cuadro 1.5-1 Componentes estructurales de la leche y de sus derivados.

Elementos estructurales	Proteínas		Lípidos	Carbohidratos	Cenizas
	Micelas de Caseína	Globulares	Glóbulos grasos	Moléculas de lactosa	Minerales: calcio, fósforo, sodio, etc.
<b>Contenido(% p/p)</b>	2.6	0.6	3.8	4.6	0.65
<b>Estado fisicoquímico</b>	Dispersión fina	Solución coloidal	Emulsión	Solución verdadera, ¿cristales?	Solución verdadera y coloidal
<b>Dimensión de partícula</b>	10-300 nm	3-6 nm	0.1-10 µm	0.8 nm	0.4 nm
<b>Número /mL</b>	10 <sup>14</sup>	10 <sup>17</sup>	10 <sup>10</sup>	----	----
<b>Densidad a 20° C (g/mL)</b>	1.11	1.34	0.92	1.55	----

NOTA: Los valores numéricos son aproximados. (Fuente: Aguilera y Stanley, 1999).

Los triacilglicéridos presentan una enorme diversidad de ácidos grasos, ya que mientras que en la mayoría de los aceites usados en los alimentos (soya, cártamo, manteca de cerdo, etcétera) sólo se encuentran 8-10 de ellos, en la grasa láctea se han identificado más de 400, lo que le permite ser la fracción lipídica más compleja conocida hasta ahora. La peculiaridad de la grasa de la leche, también llamada grasa butírica, es su elevado contenido de ácidos grasos de cadena corta, en especial de ácido butírico que prácticamente sólo se encuentra en este alimento.

Los fosfolípidos representan el 1% del total de los lípidos de la leche, el cual corresponde a una concentración promedio de 0.35 g/L. A pesar de su baja concentración los fosfolípidos desempeñan un papel relevante, cumplen varias funciones biológicas y actúan como emulsionantes naturales de los glóbulos de grasa.

La grasa está presente en forma de glóbulos (0.1-10  $\mu\text{m}$  de diámetro) rodeados de una capa lipoproteínica compleja o “membrana” con alrededor de 10 nm de espesor. Los glóbulos grasos en la leche tienen el carácter de fase dispersa en una emulsión, cuya fase continua es el plasma de la leche.

## **B) Lactosa**

La lactosa es el principal carbohidrato de la leche, sin embargo, existen también trazas de otros carbohidratos como glucosa (6 mg/100mL), galactosa (2 mg/100mL), sacarosa, cerebrósidos y aminoazúcares derivados de la hexosamina (Badui, 2006). De la capacidad de la lactosa para formar cristales depende la estabilidad de algunos productos lácteos como los helados, las leches evaporadas y las condensadas azucaradas.

## **C) Proteínas**

La calidad de sus proteínas, califican a la leche como uno de los alimentos más completos y nutritivos para el ser humano. Alrededor del 95% del



nitrógeno en la leche está en forma de proteínas. De acuerdo con su estado de dispersión se dividen en dos grupos principales: las caseínas que representan aproximadamente el 80% y las proteínas lactoséricas con el 20% restante del total de proteínas presentes en la leche, además de algunas enzimas que se encuentran en concentraciones bajas. Las distintas fracciones proteínicas de la leche se muestran en el cuadro 1.5-2.

Las caseínas: (del latín *caseus*, queso) son por definición las fosfoglucoproteínas que precipitan de la leche descremada a pH 4.6 y 20° C, es decir, son proteínas que contienen tanto residuos de hidratos de carbono como de fosfatos; éstos últimos generalmente esterifican a los hidroxilos de las serinas.

Su contenido de nitrógeno es aproximadamente de 15.6%, excepto en el caso de la fracción kappa que es de 14.3%, ya que contiene una mayor cantidad de hidratos de carbono.

Cuadro 1.5-2 Fracciones proteínicas de la leche obtenidas por electroforesis

	Total de proteínas (%)	Masa molecular (g/g mol)	Número de aminoácidos	Punto isoeléctrico
<b>Caseínas</b>	80			
$\alpha_{s1}$	34	23,612	199	4.1
$\alpha_{s2}$	8	25,228	207	
$\beta$	25	23,980	209	4.5
$\kappa$	9	19,005	169	4.1
$\gamma$	4			5.8
<b>Seroproteínas</b>	20			
$\beta$ -lactoglobulina	9	18,263	162	5.3
$\alpha$ -lactalbúmina	4	14,174	123	5.1
Proteosa peptona	4	4,000-200,000		
Inmonoglobulina	2	150,000-1x10 <sup>6</sup>		4.5-8-3
Seroalbúmina	1	69,000		4.7

(Fuente: Badui, 2006).

Prácticamente todas las moléculas de caseína están asociadas entre sí integrando las micelas, pero existe una pequeña cantidad que se encuentra en solución. Existen cuatro fracciones principales que se diferencian por su movilidad electroforética:  $\alpha_s$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ ,  $\gamma$ . A su vez la  $\alpha_s$  está constituida por cuatro componentes (los dos primeros son los principales):  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\alpha_{s3}$ ,  $\alpha_{s4}$ , y la fracción gamma por:  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ . El cuadro 1.5-3 presenta la proporción promedio de caseínas en la leche.

Aunque las caseínas presentan características comunes, ciertas diferencias entre ellas determinan su funcionalidad en la leche, sobre todo para formar las submicelas y las micelas en suspensión. De acuerdo con Badui (2006) todas las caseínas tienen secciones con una hidrofobicidad alta que proviene de los aminoácidos aromáticos y alifáticos, además de una carga neta negativa de los ácidos aspártico y glutámico; éstos dos factores son los que determinan su estabilidad y al mismo tiempo su solubilidad.

Cuadro 1.5-3 Composición promedio de caseínas en muestra de leche cruda

Caseína	g caseína/ litro de leche descremada	mmol caseína/ litro de leche descremada	mmol caseína / litro de leche descremada
$\alpha_{s1}$ -	10.25	0.434	3.52
$\alpha_{s2}$ -	2.74	0.108	1.25
$\beta$ -	9.60	0.400	2.00
$\kappa$ -	3.45	0.176	0.19
$\gamma$ -	0.88	0.075	0
Total	29.92	-----	6.96

Fracciones mol calculadas del peso molecular: 23,600 ( $\alpha_{s1}$  -); 25,300 ( $\alpha_{s2}$  -); 24,000 ( $\beta$ -); 19,500 ( $\kappa$  -); 11,700 ( $\gamma$ -) aproximadamente. (Fuente: Holt, 1997).

La presencia de grupos fosfoserilos confiere a las caseínas una gran afinidad frente al  $Ca^{++}$ , el  $Mg^{++}$  y los oligoelementos, su aptitud para secuestrar los metales alcalinotérreos es tanto mayor cuanto más elevada es su fosforilación ( $\alpha_{s1} > \alpha_{s2} > \beta > \kappa$ ) (Brule y Lenoir, 1990).

En las caseínas  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  y  $\beta$ , que están fuertemente fosforiladas, se observa que los radicales fosfóricos están en su mayoría agrupados, lo que tiene por consecuencia el crear en la cadena peptídica la existencia de zonas con caracteres ácido e hidrofílico muy marcados. Las zonas de carga negativa confieren a las caseínas una de sus principales propiedades: la capacidad de fijación del calcio. De acuerdo con Walstra y col., (1999) la  $\alpha_{s1}$  -caseína, tiene la carga más alta y el más alto contenido de fosfato, mientras que la  $\alpha_{s2}$  -caseína presenta algunas variantes, contiene dos residuos de cisteína formando un puente —S—S—; y no tiene grupos de hidratos de carbono. La  $\beta$ -caseína es la más hidrofóbica y tiene un gran número de residuos de prolina. Por otro lado la  $\gamma$ -caseína es un producto de la degradación de la  $\beta$ -caseína.

La kappa-caseína es muy diferente a las otras caseínas, está presente en la leche como oligómeros de 5–11 moléculas, es soluble en presencia del calcio natural de la leche, tiene una sección muy hidrófoba (1-105) y otra hidrófila (106 -169), por lo que su mecanismo de acción es semejante al de los agentes emulsionantes que interaccionan en dos fases inmiscibles. Contiene residuos de galactosamina, galactosa, y uno o dos ácidos N-acetilneuroamínico (NANA ó ácido o-siálico).

La presencia de éstas fracciones glúcidas sobre el fragmento peptídico 106-169 acentúa el carácter hidrófilo de la parte -COOH terminal de la  $\kappa$ -caseína. La acción hidrolítica de la enzima renina sobre el enlace 105-106 provoca que pierda su capacidad estabilizadora (Walstra y col 1999).

Proteínas lactoséricas: Todas las proteínas del suero de leche se encuentran en forma disuelta y son globulares excepto las proteosas peptona. Las proteínas lactoséricas presentan una hidrofobicidad alta y cadenas peptídicas compactamente plegadas. La mayoría contiene una proporción apreciable de hélices alfa y su distribución de carga es un tanto homogénea.

Son solubles en un intervalo de pH muy amplio (incluso a pH ácidos), siempre y cuando no se desnaturalicen debido a que están muy hidratadas y no tienen tanta carga eléctrica externa, además de ser sensibles al calor (Badui, 2006). La desnaturalización de las proteínas lactoséricas no resulta en la floculación sino que precipitan sobre las micelas de caseína y permanecen dispersadas. Contienen la mayoría de los aminoácidos y presentan un mejor balance de éstos que las propias caseínas, por lo que su valor nutritivo es superior (Badui, 2006). *La proteosa peptona* es una fracción bastante diferente de las otras proteínas séricas. Está compuesta por un grupo heterogéneo de fosfoglucoproteínas provenientes de la hidrólisis de la  $\beta$ -caseína por la acción de la plasmina (Badui, 2006). A pH neutro, una parte considerable de la proteosas-peptona está presente en las micelas de caseína, por lo que el suero obtenido por elaboración de queso no las contiene todas.

#### **D) Sales**

Las sales permiten a la leche mantener su equilibrio dinámico puesto que influyen en la estabilidad de los diferentes estados dispersos que la componen: emulsión, suspensión coloidal y solución. Por esta razón no todas las sales están disueltas y no todas las sales disueltas están ionizadas. El cuadro 1.5-4 muestra las principales sales presentes en la leche. La leche está sobresaturada con respecto al fosfato de calcio y, por lo tanto una gran parte de éste, no está disuelto.

Las micelas contienen fosfato de calcio coloidal, además de magnesio, citrato, sodio y potasio, así como pequeñas cantidades de otros iones. La cantidad total es alrededor de 7g/100g de caseína seca. Parte de esta cantidad es considerada como contraiones, debido a que la caseína está cargada negativamente al pH de la leche y se encuentra asociada con los contraiones positivos que resguardan a la molécula. Los contraiones involucrados son el  $K^+$ ,  $Na^+$ , gran parte del  $Mg^{++}$  y  $Ca^{++}$ .

La leche tiene capacidad amortiguadora de pH especialmente por la presencia de algunos iones como el calcio.

Cuadro 1.5-4 Las sales de la leche más importantes y su distribución en el suero y en las micelas de caseína

Componente	Masa molar (Da)	Intervalo (mmol/kg)	Promedio (mg/100g)	Fracción en suero	En micelas (mmol/g caseína seca)
<i>Cationes</i>					
Na	23	17-28	48	0.95	0.04
K	39.1	31-43	143	0.94	0.08
Ca	40.1	26-32	117	0.32	0.77
Mg	24.3	4-6	11	0.66	0.06
Aminas		~1.3		~1	
<i>Aniones</i>					
Cl	35.5	22-34	110	1	
CO <sub>3</sub>	60	~2	10	~1?	
SO <sub>4</sub>	96.1	~1	10	1	
PO <sub>4</sub> <sup>1</sup>	95	19-23	203	0.53	0.39
Citrato	189	7-11	175	0.92	0.03
Ácidos carboxílicos		1-4		~1?	
Ésteres fosfóricos <sup>2</sup>		2-4		1	

<sup>1</sup>Sólo inorgánico

<sup>2</sup>Soluble

(Fuente: Walstra y col., 1999).

## 1.6 MICELA DE CASEÍNA

Horne en 1998 propuso el Modelo de Enlace Dual para explicar la organización de las caseínas en la leche; este modelo establece que las micelas de caseína son formadas como resultado de dos mecanismos estructurales: atracción hidrofóbica y enlaces por puentes de fosfato de calcio coloidal (Lucey, 2002). Además la κ-caseína, por contar con pocos residuos de fosfoserina y una fracción glúcida, actúa como delimitante del crecimiento de la micela. La figura 1.6-1 muestra la proyección esquemática

del modelo de Horne, donde la subestructura interna se asemeja a una red mineralizada, enmarañada o entretejida (uniones cruzadas) de cadenas de moléculas de caseína, o es el resultado de la polimerización de éstas (Aguilera y Stanley, 1999).

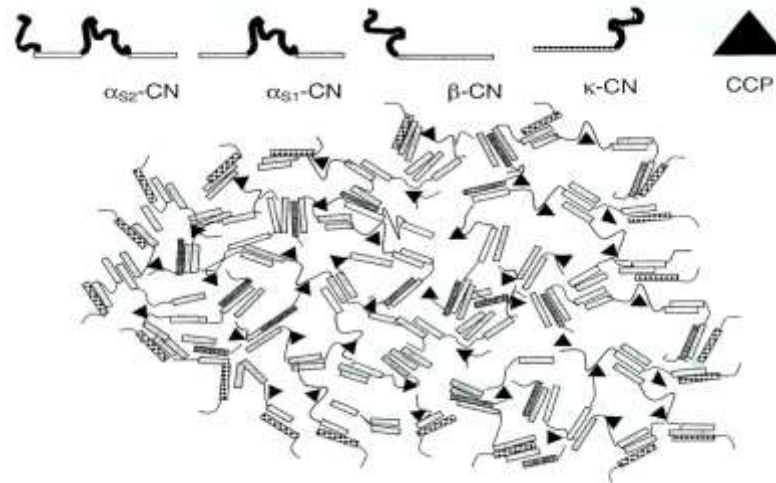


Figura 1.6-1 Modelo de enlace dual para la organización de la micela de caseína en la leche propuesto por Horne (1998). Barras rectangulares: segmentos hidrofóbicos; líneas negras: segmentos hidrofílicos. CN: caseína, CCP: fosfato de calcio coloidal (Fuente: Lucey, 2002).

Otro modelo de micela de caseína, menos reciente y ampliamente aceptado por muchos investigadores, sugiere la formación de la micela a partir de pequeñas subunidades o submicelas (Aguilera y Stanley, 1999). En este modelo las moléculas de caseína están organizadas en un nivel primario como agregados de 10-20 nm de diámetro y 250-2000 KDa llamados “submicelas”, las cuales contienen entre 15 y 25 moléculas de caseína.

Las moléculas de caseína son fuertemente hidrofóbicas y son mantenidas juntas en el interior de la submicela por uniones con sales y enlaces hidrofóbicos entrampados en el núcleo, mientras una región hidrofílica existe en la superficie. Las cadenas hidrofóbicas son más densas que aquellas en la superficie hidrofílica; las cuales están alargadas por su contacto con el agua.

El contenido de  $\kappa$ -caseína parece variar entre submicelas diferentes. Aquellas que contienen una proporción más alta de  $\kappa$ -caseína ocupan la porción exterior de la micela. Una vez que la superficie de una micela es cubierta con  $\kappa$ -caseína, las uniones de las submicelas cesan. Dos tercios de la cadena de  $\kappa$ -caseína, el extremo N-terminal, son hidrofóbicos e interaccionan con  $\alpha_{s1}$ -caseína dentro de la submicela. La tercera parte de  $\kappa$ -caseína, el extremo C-terminal, llamado también el caseino-macropéptido, es hidrofílica, y resalta como un “cabello” flexible dentro del suero, produciendo repulsiones estéricas y electrostáticas entre las micelas (Aguilera y Stanley, 1999).

Las micelas de caseína también contienen una porción de fosfato de calcio coloidal [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ], el cual representa alrededor del 8% del peso total. La microscopía electrónica de las micelas de caseína (figuras 1.6-2) sugiere que el fosfato de calcio coloidal está perfectamente dividido a través de la micela, y concuerda con que éste actúa como agente de unión entre las submicelas de caseína. Al pH de la leche, el fosfato de calcio coloidal es insoluble y está protegido de la precipitación por las caseínas. Durante la acidificación, el fosfato de calcio coloidal se disocia de las micelas hasta disolverse completamente a valores de pH  $\approx$  5.0. Éste también se comporta como un ión intercambiador y participante activo en el equilibrio con el suero. Las micelas de caseína están altamente hidratadas y contienen alrededor de 3.7g de agua/g de proteína, de la cual sólo 0.5g/g de proteína es agua ligada. Otras características importantes de las micelas de caseína se presentan en el cuadro 1.6-1.

Cuadro 1.6-1 Características promedio de las micelas de caseína

CARACTERÍSTICA	VALOR
Diámetro	130-160 nm
Superficie	$8 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$
Volumen	$2.1 \times 10^{-15} \text{ cm}^3$
Densidad hidratada	$1.0632 \text{ g /cm}^3$
Masa	$2.2 \times 10^{-15} \text{ g}$
Contenido de agua	63%
Hidratación	3.7 g H <sub>2</sub> O/g proteína
Voluminosidad	$4.4 \text{ cm}^3/\text{g}$
Peso molecular hidratado	$1.3 \times 10^9 \text{ Da}$
Peso molecular deshidratado	$5 \times 10^8 \text{ Da}$
No. cadenas péptidos (mol,wt: 30,000)	$10^4$
No. Partículas por mL de leche	$10^{14} - 10^{16}$
Superficie de partícula completa	$5 \times 10^4 \text{ cm}^2 / \text{ml de leche}$
Distancia libre intermedia	240 nm

(Fuente: Aguilera y Stanley, 1999).

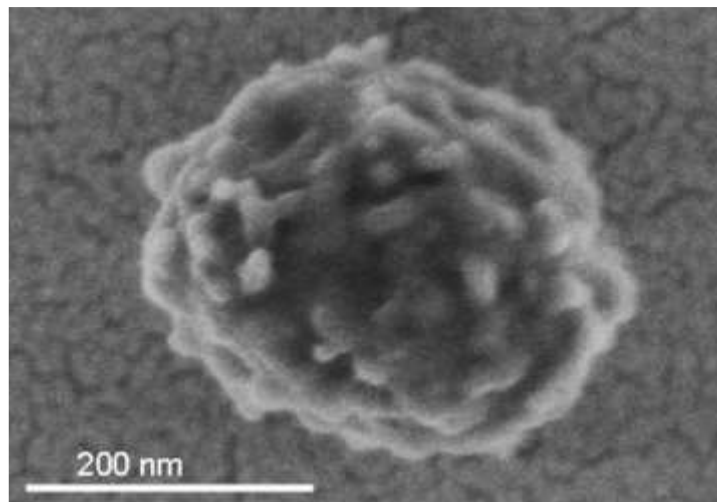


Figura 1.6-2 Estructura detallada de una micela de caseína inmobilizada. Microscopía electrónica de barrido (Microscopio Hitachi S-4800) (Fuente: Martin y col., 2006).

Las micelas de caseína existen en un estado de equilibrio dinámico con el suero, si sufren un rompimiento mecánico éstas se reasocian en minutos. La agregación es prevenida por repulsiones estéricas y electrostáticas de las fracciones de  $\kappa$ -caseína, la cual actúa como un “coloide protector”. Las micelas de caseína constituyen un sistema muy estable, particularmente contra tratamientos térmicos. En la figura 1.6-3 se esquematiza la formación de la micela a partir de la interacción de unidades pequeñas (submicelas).



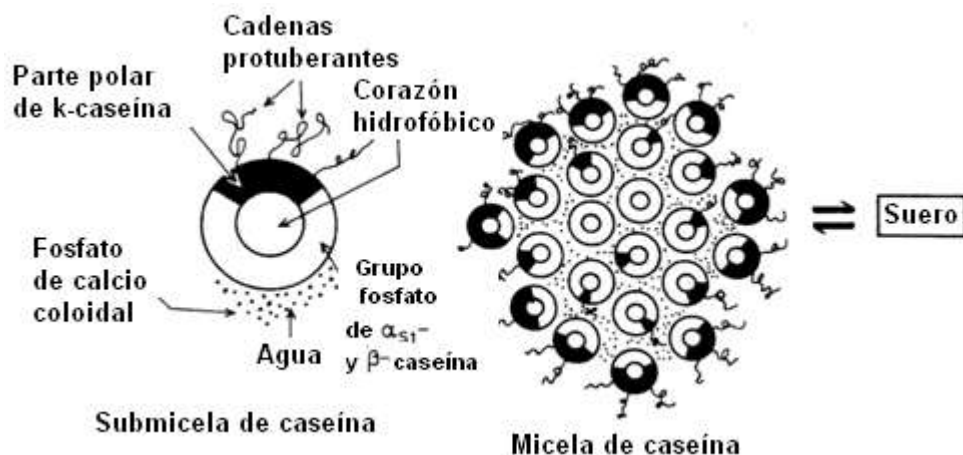


Figura 1.6-3 Modelo propuesto para la micela de caseína integrada por subunidades más pequeñas o submicelas (Fuente: Aguilera y Stanley, 1999).

## 1.7 FACTORES QUE CAUSAN LA DESESTABILIZACIÓN DE LA MICELA Y LA FORMACIÓN DE GELES LÁCTEOS

La imperante carga negativa, la estructuración micelar a partir de las interacciones hidrofóbicas y con fosfato de calcio, y la acción protectora de la  $\kappa$ -caseína, son los principales factores que mantienen a las micelas en equilibrio coloidal dentro del sistema fluido que presenta la leche a pH casi neutro. Sin embargo, desestabilizar la micela provoca diversos cambios en ella, siendo éste el principio para la elaboración de dos derivados lácteos ampliamente consumidos: las leches ácidas tipo yogurt y el queso. Esta desestabilización de las micelas puede conseguirse, por un lado, sólo si se acidifica el medio lo que equivale a incrementar la fuerza iónica en el sistema, y por otro lado, si además, se hidroliza la  $\kappa$ -caseína por vía enzimática (acción del cuajo); permitiendo en ambos casos reacomodos estructurales y consiguiendo por esta vía agregados que dan lugar a una red de matriz proteica. Los efectos son distintos en ambos casos, si se mantiene la integridad de la  $\kappa$ -caseína se consigue un “gel estable” que permite la captación de agua, pero si se propicia la rotura del ente protector, las caseínas colapsan y se agregan permitiendo la liberación del suero.

### **A) Formación de gel ácido en ausencia de renina**

La leche puede ser acidificada por distintos mecanismos. El descenso en el pH causa una disolución parcial del fosfato coloidal y una disminución de la carga negativa de las proteínas, lo cual va acompañado de una menor asociación con los contraiones que resguardan la carga eléctrica negativa de la micela. Además una disminución en el pH reduce la disociación de ácidos débiles, incrementa la concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y aumenta la fuerza iónica.

El fosfato de calcio coloidal es una unidad estructural dentro de las micelas actuando como un puente neutralizador entre dos grupos fosfoserilos cargados negativamente. La disolución de fosfato de calcio coloidal ocurre durante la acidificación especialmente a  $\text{pH} \leq 6.0$ , y por consiguiente se incrementa la repulsión electrostática entre los residuos de fosfoserina expuestos; se genera una reducción en la carga superficial de la micela, desde carga neta negativa hasta al punto isoeléctrico de la caseína ( $\text{pH} 4.6$ ). Por estas razones mientras el pH se aproxima al punto isoeléctrico, las cadenas largas de caseína experimentan reacomodos que les permiten movilizarse en el medio acuoso, se aproximan, y así comienzan a fusionarse por medio de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. La repulsión estérica permanece en las “vellosidades” de los macropéptidos (aunque estas pueden enroscarse como espirales mientras el pH baja). Los reacomodos de las partículas de caseína ocurren antes, durante y después de la formación del gel (sistema dinámico); mientras que la fusión de las mismas se presenta durante y después de la formación del gel (Lucey, 2004).

### **B) Gelificación ácida de la leche por acción de Glucono-delta-Lactona**

La leche puede ser acidificada por cultivos bacterianos, los cuales fermentan la lactosa a ácido láctico; por la adición directa de ácidos, tales como el HCl,

o por el uso de glucono- $\delta$ -lactona (GDL), el cual es un ester que hidroliza en solución a ácido glucónico (figura 1.7-1), un ácido débil que posteriormente se disocia (de Kruif, 1997). La velocidad de acidificación es diferente entre leches acidificadas con GDL y aquellas con cultivos bacterianos; el GDL es hidrolizado rápidamente a ácido glucónico (especialmente a altas temperaturas) mientras que tras la adición de bacterias lácticas, el pH cambia poco al inicio y decrece gradualmente con el tiempo.

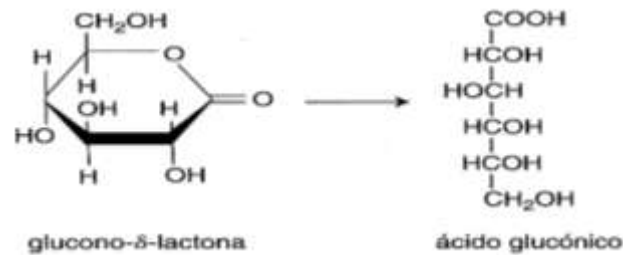


Figura 1.7-1 Reacción de hidrólisis de la glucono-delta-lactona (Fuente: Badui, 2006).

El pH final conseguido en geles inducidos por GDL es función de la concentración de éste en la leche, mientras que las bacterias ácido-lácticas pueden continuar la producción de ácido hasta un pH muy bajo (<4.1) que es detenido cuando éstas sufren inhibición por producto. La razón de cambio de pH durante la fermentación o la adición del acidulante es controlado por las propiedades amortiguadoras de la leche (Lucey y Singh, 2003). Durante la acidificación de ésta, los cambios físico-químicos suceden especialmente en el intervalo de pH de 5.5 a 5.0 (Lucey y Singh, 2003). Sin embargo, las propiedades reológicas y físicas de los geles hechos con GDL difieren de aquellos geles producidos por fermentación, quizás debido a las distintas velocidades de acidificación (figura 1.7-2) durante el periodo crítico de agregación de las lacto proteínas.

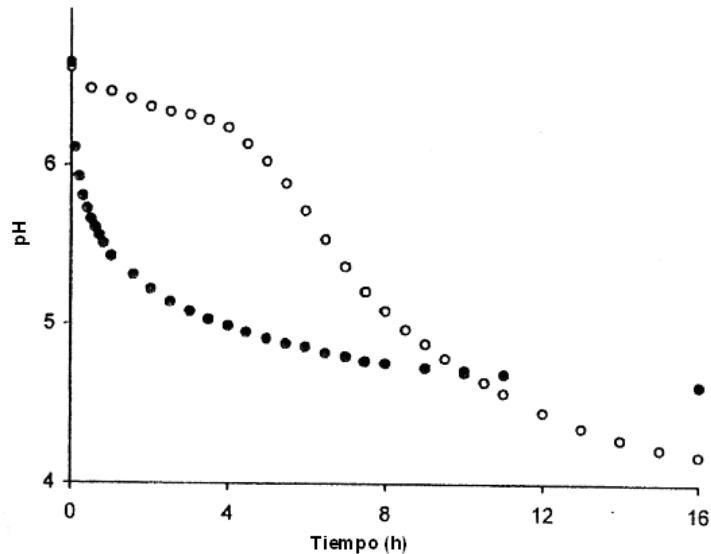


Figura 1.7-2 Rampa de pH durante la acidificación de la leche a 30° C. Círculos oscuros: con 1.3% de GDL. Círculos claros con 2% (p/p) cultivo láctico. La leche fue calentada a 85 °C por 30 minutos. (Fuente: Lucey y Singh, 2003).

## 1.8 PROPIEDADES REOLÓGICAS, MICROESTRUCTURALES Y SINÉRESIS DE LOS GELES ÁCIDOS DE LECHE CONSEGUIDOS POR ACIDIFICACIÓN CON GLUCONO- $\delta$ -LACTONA

Hemos dejado claro que la acidificación de la leche propicia la formación de una estructura gelificada, cuya principal característica es la capacidad de retener agua; en este contexto podemos deducir que un gel de leche ácida será más estable a medida que permita una mayor captación de agua evitando la exudación de la misma hacia la superficie del gel.

Los reacomodos fortuitos que experimentan los principales componentes estructurales de la leche cuando ésta se acidifica y por consiguiente, las características de su estructura emergente, son los responsables de la formación del gel y están determinados por diversos factores que influyen tal situación; desde la homogenización de la grasa y el tratamiento térmico previo a la acidificación, pasando por el contenido iónico del medio acuoso, la concentración de sólidos proteicos y grasos hasta las condiciones y medio

de acidificación de la leche (i.e. temperaturas de gelificación y concentración de acidulante o cultivos bacterianos). La estabilidad de los geles ácidos de leche puede ser evaluada a través de sus propiedades reológicas, mecánicas y microestructurales.

### **1.8.1 Propiedades reológicas de geles de leche acidificados con Glucono-delta-lactona**

La influencia del tratamiento térmico sobre las propiedades reológicas de los geles ácidos de leche ya ha sido descrita (Lucey y col., 1997a; Lucey y col., 1998a; Lucey 2001), se ha evaluado el efecto del tratamiento térmico de la leche previo a la gelificación, así como posteriores tratamientos térmicos una vez formado el gel. Lucey y col., (1997a) observaron que en soluciones de caseinato de sodio con y sin NaCl, bajo dos concentraciones de glucono-delta-lactona (GDL) y a diferentes temperaturas de gelificación (20, 30 y 40 °C), cuando estas fueron bajas (acidificación fría) resultaron en una formación más lenta del gel pero con valores más altos de  $G'$  (hasta 64 h después de la adición del acidulante).

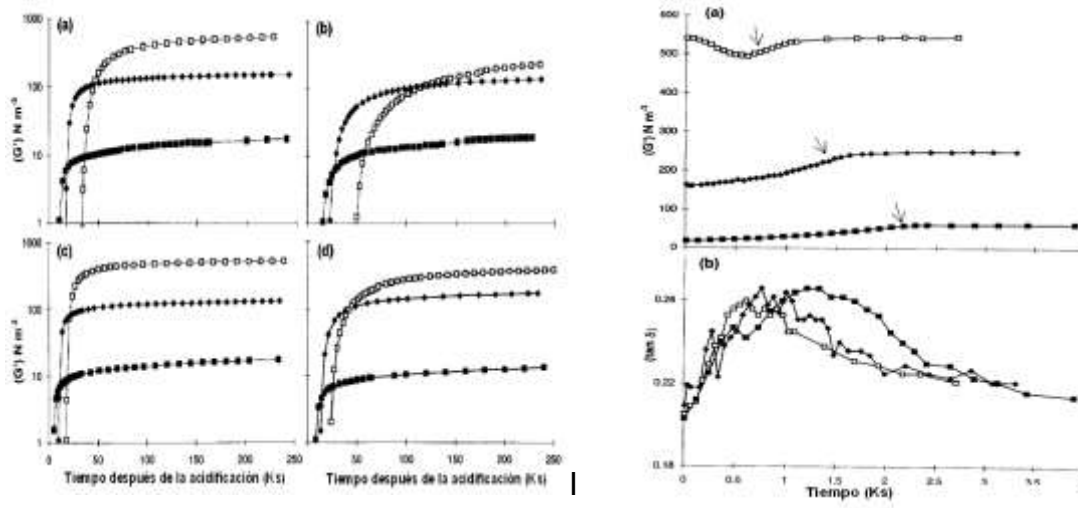
La adición de NaCl prolongó el tiempo de gelificación y los geles formados tuvieron valores menores de  $G'$ . Los geles formados a 20, 30 y 40 °C dieron valores de  $G'$  en el intervalo de 500-600, 100-200 y  $<20 \text{ Nm}^{-2}$ , respectivamente. Tangente de delta a 0.1 Hz ( $\cong G''/G'$ ) fue en general similar para todos los geles, variando de 0.20 a 0.25, con los valores más bajos encontrados principalmente para los geles hechos a 20 °C y los valores más altos para aquellos hechos a 40 °C como se observa en la Figura 1.8-1(I).

Estos mismos autores establecen que un enfriamiento posterior a la gelificación a 5 °C durante 30 minutos, resulta en un incremento de  $G'$  para los geles formados a 30 °C y 40 °C. Sin embargo, el valor de  $G'$  para los geles formados a 20 °C disminuyó inicialmente durante el enfriamiento,

restaurándose a medida que se mantiene la muestra a 5 °C. Por otra parte, tangente de delta se incrementó en todos los geles durante el enfriamiento inicial a 5 °C, para posteriormente disminuir hasta aproximadamente su valor original cuando los geles fueron mantenidos a esa temperatura (durante 30 minutos). Las figura 1.8-1(II)a y 1.8-1(II)b muestran los barridos de tiempo ( $G'$  versus tiempo y  $\tan \delta$  versus tiempo) de las muestras de caseinato de sodio acidificadas.

Roefs y van Vliet en 1990 encontraron que cuando los geles ácidos de leche descremada fueron enfriados a 4 °C y mantenidos a esa temperatura,  $G'$  incrementa drásticamente y regresa a su valor original cuando el gel se calienta 30 °C (Lucey y col., 1997a). Estos mismos autores observaron que los módulos dinámicos de geles de leche descremada formados por acidificación fría (20 °C) y subsecuente calentamiento (hasta 30 °C), incrementaron a medida que disminuyó la temperatura a la cual se evaluaron dichos módulos. Debe mencionarse que los geles estudiados por Roefs y van Vliet fueron sin duda geles débiles ( $G' \sim 10 \text{ Nm}^{-2}$ ).

Lucey y col., (1997a), Roefs y van Vliet, en 1990 coinciden en proponer que las interacciones hidrofóbicas en la micela de caseína no tienen un papel importante en el reforzamiento de los geles de leche formados por acidificación debido a que éstos muestran valores de  $G'$  mayores al disminuir la temperatura. Este fenómeno lo atribuyen al hinchamiento de las partículas de caseína cuando disminuye la temperatura, lo cual incrementa el área de contacto entre estas partículas. La disminución en los módulos dinámicos por la adición de NaCl a muestras de leche descremada acidificadas en frío y subsecuentemente calentadas, se presume se debe a que al incrementar la fuerza iónica los grupos cargados en las partículas de caseína se resguardan, debilitando las interacciones electrostáticas entre las partículas de caseína, lo cual resulta en una velocidad menor del incremento de  $G'$ .



II  
 Figura 1.8-1 I. Módulo de almacenamiento ( $G'$ ) en función del tiempo en geles de caseinato de sodio acidificados con GDL. a) y c) Dispersiones hechas sin NaCl, b) y d) Dispersiones con 0.12 mol L<sup>-1</sup> de NaCl. a) y b) Dispersiones acidificadas con 0.376% de GDL. c) y d) Dispersiones acidificadas con 0.517% de GDL. II. Efecto del enfriamiento a 5 °C por 30 minutos (1K min<sup>-1</sup>) de geles de caseinato de sodio (64 horas después de adicionar el GDL) hechos por acidificación con GDL sin adición de NaCl. a) Módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y b) Tangente de delta ( $\tan \delta$ ). Temperaturas de gelificación en (I) y (II): cuadros blancos a 20 °C, diamantes y cuadros oscuros a 30 ° y 40 °C respectivamente. (Fuente: Lucey y col., 1997a).

El efecto del tratamiento térmico previo a la gelificación de la leche ha sido abordado por Lucey y col. (1998a), Lucey y Singh (2003) quienes además analizaron los efectos del contenido de grasa. Los principales resultados se muestran el cuadro 1.8-1

Los autores observaron que las leches calentadas a temperaturas  $\geq 80$  °C presentaron valores mayores de  $G'$ , disminución del tiempo de gelificación y valores mayores del pH al cual ocurre la gelificación. En contraste, las leches no calentadas requirieron valores menores de pH a 5 para iniciar la gelificación y los valores de  $G'$  de estos geles fueron notablemente menores (ver figura 1.8-2(I) y (II)). Por otra parte el tiempo de gelificación en leches no calentadas incrementó ligeramente al aumentar el contenido de grasa mientras que en leches calentadas ocurre lo contrario. Por lo tanto, el

tratamiento térmico de la leche previo a su gelificación, tuvo un efecto más pronunciado sobre las propiedades reológicas de los geles ácidos que el contenido de grasa.

Cuadro 1.8-1 Efecto del tratamiento térmico y contenido de grasa en geles de leche ácida

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

(Fuente: Lucey y col., 1998a).



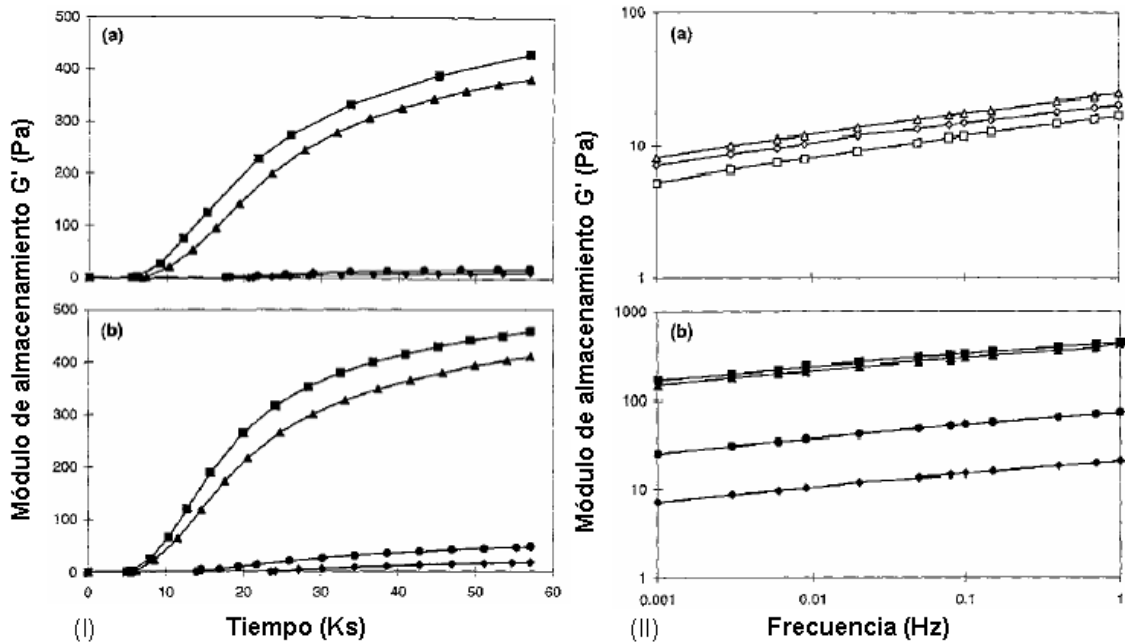


Figura 1.8-2 (I) Cambios de  $G'$  con el tiempo para los geles de leche ácida hechos por acidificación con GDL a 30 °C para (a) Leche sin grasa (b) Leches con 3.5% de grasa donde: *rombos* leche sin calentar; *círculos*, *triángulos* y *cuadrados* leche calentada a 75, 80 o 90 °C respectivamente por 30 minutos. (II) Cambios de  $G'$  con la frecuencia para (a) Leches sin calentar con diferentes contenidos de grasa donde: *cuadrados*, *rombos* y *triángulos claros* contienen 0, 1.5 y 3.5% de grasa respectivamente. Y (b) Leche con 1.5% de grasa con diferentes tratamientos térmicos donde: *rombos oscuros* corresponde a leche no calentada, *círculos*, *triángulos* y *cuadrados oscuros* corresponden a leches calentadas a 75, 80 y 90 °C respectivamente por 30 minutos. (Fuente: Lucey y col., 1997a).

El principal factor responsable de la formación de geles ácidos de leche no calentada es la reducción en la carga neta negativa sobre las partículas de caseína al acercarse el pH de la leche al valor del punto isoeléctrico de la caseína.

Lucey y col (1997b) sugirieron que en los geles ácidos elaborados a partir de leche no calentada, existe un rearrreglo extensivo de partículas durante la formación del gel, resultando en la formación de agrupaciones densas de partículas de caseína, los cuales se asocian para formar un gel. En estos densos agregados o "clusters" de caseína es difícil que se lleven a cabo entrecruzamientos entre partículas de caseína que contribuyan a la rigidez del gel, generando por lo tanto geles menos rígidos con valores de  $G'$  inferiores a los formados en leches calentadas. Lucey y col (1997a) han

reportado que las leches no calentadas forman geles ácidos débiles con valores de  $G' < 20 \text{ Pa}$  (a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ), en estos geles  $\tan \delta$  disminuye inicialmente a  $\approx 0.4$  y durante el envejecimiento  $\tan \delta$  disminuye a  $\sim 0.25$ .

El tratamiento térmico de la leche causa desnaturalización de las proteínas del suero, algunas de las cuales se adhieren a las micelas de caseína a través de interacciones con  $\kappa$ -caseína. Lucey y col., (1997a) propusieron que cuando la leche calentada es acidificada, las proteínas de suero desnaturalizadas y asociadas a las micelas de caseína favorecen la formación de agregados de caseína debido a que el descenso del pH disminuye las fuerzas repulsivas caseína-caseína. Por lo tanto, las proteínas desnaturalizadas del suero actúan como puentes entre las partículas de caseína, resultando en un incremento en el número y en la fuerza de los enlaces entre partículas de proteína. Las proteínas de suero desnaturalizadas tienen pH's isoelectricos ligeramente más altos que las caseínas. El pH isoelectrico de la principal proteína del suero,  $\beta$ -lactoglobulina, es  $\sim 5.3$ . Esto explica por qué la agregación y gelificación de leches calentadas se inicia a valores de pH mayores al punto isoelectrico de la caseína (i.e 4.6).

La homogenización de la leche también tiene un efecto positivo en las propiedades reológicas de geles ácidos de leche. La homogenización incrementa el área de superficie de los glóbulos de grasa, por lo tanto se incrementa el área de contacto de los glóbulos de grasa con partículas de caseína y proteína sérica desnaturalizada. Esta última puede actuar como puente entre las proteínas de suero adsorbidas en la superficie del glóbulo de grasa y/o los agregados de proteína micelar, dando lugar al incremento de  $G'$  en estos geles ( Lucey y col., 1998a). En el cuadro 1.8-2 se describen los principales parámetros de importancia para la evaluación de las propiedades reológicas de geles de leche.

Cuadro 1.8-2 Parámetros reológicos que indican reacomodos de interacciones dentro de redes de geles de leche

Término	Símbolo	Definición	Indicadores de rearreglos	Ejemplo
Módulo elástico o de almacenamiento	$G'$	Energía almacenada por ciclo de deformación durante una prueba oscilatoria. Se relaciona con la "rigidez" de la red.	Valores de $G'$ bajos en el gel final, una disminución de $G'$ durante la gelificación o como resultado de un cambio en las condiciones de prueba (ejemplo: incremento en la temperatura de medición) todo esto indica que la fuerza y número de los enlaces en la red pueden ser lo suficientemente bajos para ser fácilmente fracturados por esfuerzos en la red causados por la fusión que se lleva a cabo de partículas y/o hebras.	Geles combinados de leche elaborados con leche no calentada donde hay una disminución en $G'$ durante la gelificación.
Tangente de pérdida	$\tan \delta$	Razón del módulo viscoso sobre el elástico ( $= G''/ G'$ ) indica el carácter viscoelástico del material (i.e carácter más sólido o líquido)	Valores más altos favorecen la relajación de los enlaces, depende de la escala de tiempo de la deformación aplicada (frecuencia) y la escala de tiempo sobre la cual los procesos tales como la sinéresis ocurren. Si hay un incremento en $\tan \delta$ durante la gelificación hay una mayor posibilidad de reacomodos estructurales.	Geles ácidos elaborados con leche calentada donde la $\tan \delta$ incrementa poco después de que el gel es formado.
Esfuerzo de fractura (Pa)	$\sigma_{fractura}$	El valor del esfuerzo de corte al cual la red del gel comienza a averiarse. Este valor depende de la velocidad de corte (o velocidad de deformación)	Determina la susceptibilidad de las "hebras" del gel a fracturarse. Un valor bajo del esfuerzo de fractura indica un gel suave (blando) o débil. Son más importantes las propiedades de fractura de la red en el punto cuando los reacomodos de la red se presentan.	Geles ácidos "jóvenes".
Deformación de fractura (Pa)	$\gamma_{fractura}$	El valor de la deformación en el punto en el cual la red comienza a averiarse.	Determina la susceptibilidad de las "hebras" de la red del gel a la fractura. Valores bajos indican una textura quebradiza (frágil).	Geles ácidos hechos de leche calentada.

(Fuente: Lucey, 2001).

### **1.8.2 Microestructura de geles de leche ácida**

Existen diversos trabajos en donde se ha explorado la microestructura de geles de leche formados por acidificación (De Kruif 1997, Lucey y col. 1998a, Auty y col. 2005, Hans y col., 2004, Matia-Merino y col. 2004, Martin y Smith 2006). Estudios de microscopía electrónica en geles ácidos de leche, como el yogurt, han mostrado que estos geles consisten de redes particuladas gruesas de caseína en forma de agregados, cadenas y “hebras”. La red tiene poros o espacios intersticiales en los cuales la fase acuosa está confinada, el diámetro de estos poros varía considerablemente, con poros más grandes en geles hechos usando temperaturas de gelificación altas o leche con bajo contenido proteínico. Se han desarrollado diversos estudios de microscopía electrónica sobre la microestructura de geles formados por acidificación de leche sometida a tratamiento térmico (Davies y col., 1978; Parnell-Clunies y col., 1987; Mottar y col., 1989, citados en Lucey y Singh, 2003). Harwalkar y Kalab en 1980 (Lucey y Singh, 2003) basados en la observación de microfotografías electrónicas propusieron que los geles de yogurt hechos con leche no calentada tienen agregados de proteína más grandes que los geles hechos con leche tratada térmicamente, los cuales describieron como “altamente ramificados”.

La microscopía electrónica requiere una serie de pasos para preparar el espécimen a visualizar, muchos de éstos frecuentemente dañan la estructura original de geles biológicos como los de la leche. Actualmente, la microscopía confocal de barrido láser es una alternativa para visualizar microestructuras de alimentos con menor detrimento en ésta, ya que no precisa deshidratación, recubrimientos o uso de fijadores, ni seccionar la muestra. Esta técnica de microscopía hace uso de un haz de luz láser hacia un plano de la muestra, la cual debe emitir fluorescencia y ésta se registra por el equipo. Broker en 1995 menciona que la capacidad única de esta técnica de seccionar la muestra óptimamente con alta resolución espacial la

ha hecho muy útil en el estudio de microestructuras de productos alimentarios (van de Velde y col., 2003).

En particular la microscopia confocal de barrido láser se ha usado para determinar el grado de interconectividad en la red de geles ácidos de leche.

La microestructura de geles ácidos de leche usando GDL como acidulante (1.3% a 30 °C) ha sido estudiada principalmente por Lucey y colaboradores (Lucey y col., 1997b; Lucey y col., 1998b; Auty y col., 2005).

El efecto de la grasa y tratamiento térmico de la leche se evaluó en geles de leche homogenizada (0, 1.5 y 3.5% de grasa) y sometida a distintos tratamientos térmicos (75, 80 y 90 °C). Las microfotografías obtenidas en microscopía confocal muestran un “enramado” cuya interconectividad varía con las condiciones de gelificación y los tratamientos térmicos aplicados a la leche. La figura 1.8-3 muestra las micrografías de geles de leche acidificada con GDL, en éstas se observa el efecto del calentamiento de la leche y de la concentración de grasa en la conformación de la estructura de las redes de proteína (zonas claras en las fotografías a-e). Los autores describen que en geles ácidos de leche descremada no calentada se forma una estructura “tortuosa” (agrupaciones irregulares de partículas de proteína, (figura 1.8-3a), mientras que en los geles ácidos de leche descremada sometida a un proceso de calentamiento a 80 °C previo a la gelificación, se observó una microestructura ramificada con fronteras claramente definidas, que se describe como un “panal” (figura1.8-3b). Las micrografías confocales de geles ácidos hechos con diferentes contenidos de grasa se muestra en figuras 1.8-3c a 1.8-3f; mientras que las leches descremadas calentadas mostraron una estructura ramificada, tipo “panal”. En los geles ácidos de leche no descremada (1.5 y 3.5% grasa) los glóbulos de grasa parecieron estar dispersos en todo el volumen del gel formado (figuras 1.8-3c y d) y la microestructura fue bastante diferente de los geles de leche descremada (figuras 1.8-3a, b), no fueron visibles poros grandes, probablemente porque

los glóbulos de grasa obscurecieron los detalles más finos de los poros y hebras de proteína. En las figuras 1.8-3e y f se observa que los glóbulos de grasa parecen estar inmersos en la matriz del gel de proteína, lo cual de acuerdo con los autores, sugieren que éstos interactúan positivamente con la red como promotores de la estructura ya que los geles fueron elaborados con leche homogenizada en donde la membrana del glóbulo graso fue alterada y puede interactuar con la proteína presente en la leche. Este efecto no se observa en leche no homogenizada en donde los glóbulos de grasa actúan como rellenos inertes, es decir, interactuando negativamente o “rompientes” de la estructura puesto que la membrana del glóbulo de grasa está intacta y no puede interactuar con las partículas de caseínas.

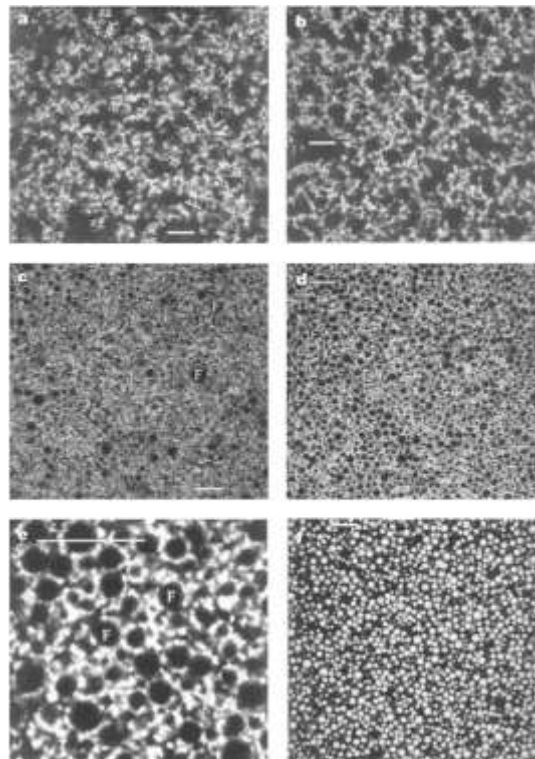


Figura 1.8-3 Microscopías confocales de geles de leche ácida hechos de (a) leche descremada sin calentar, (b) leche descremada calentada, (c) leche sin calentar con 1.5% de grasa, (d) leche calentada con 1.5% de grasa, (e) leche calentada con 1.5% de grasa (alta magnificación), (f) leche calentada con 3.5% de grasa (glóbulos de grasa teñidos). El tratamiento térmico fue a 80 °C por 30 minutos. En los geles (a) a (e) se usó un marcador de proteína y en estas micrografías la proteína aparece en color blanco mientras que los glóbulos de grasa y el agua aparecen en las zonas oscuras (no fluorescen). En la micrografía (f) se usó un marcador para los glóbulos de grasa y estos aparecen en color blanco. “F” poros grandes. Barra = 10µm. (Fuente: Lucey y col., 1998a).

En la figura 1.8-3f se observa la fluorescencia de la grasa (glóbulos) presente en el gel ácido de leche en donde parece evidente la homogeneidad de los glóbulos en estos sistemas.

Otros autores (Auty y col., 2005) estudiaron el efecto de la fuerza iónica en la microestructura de geles ácidos de caseína micelar, concluyendo que al incrementar la fuerza iónica de la fase continua, la caseína requiere mayores tiempos de gelificación y pH's más bajos para iniciar ésta, pero los geles formados son más homogéneos y los "poros" de la red son más pequeños (figura 1.8-4).

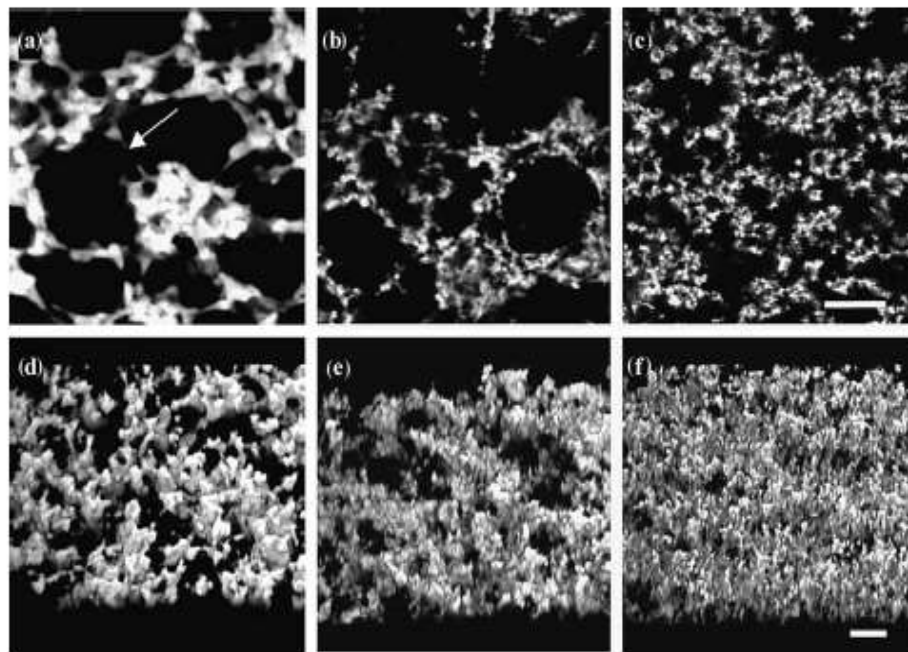


Figura 1.8-4 Microscopias confocales de barrido laser de dispersiones de micela de caseína en agua (a y d) y en 70% (b y e) y 200% (c y f) de una solución salina ultra-filtrada simulada de leche 2h posterior a la adición de GDL. La proteína fue etiquetada con Fast Green (FCF). Las imágenes a-c son secciones ópticas individuales, d-e son reconstrucciones ópticas tridimensionales de 25 secciones individuales con un total de profundidad Z de 25  $\mu\text{m}$  e inclinación de 45° con respecto al plano X. Note los agregados de proteína fusionados y las hebras de proteínas rotas (flecha) para la caseína dispersada en agua (a). Barra = 10  $\mu\text{m}$ . (Fuente: Auty y col., 2005).

### 1.8.3 Sinéresis de geles de leche acidificados con GDL

La sinéresis espontánea es definida como la exudación de agua resultante de la contracción del gel sin la aplicación de fuerzas externas, tales como presión mecánica (Lucey y col., 1997b). La sinéresis es parte esencial en la elaboración de quesos pero se considera uno de los defectos más importantes de geles ácidos de leche como el yogurt, productos lácteos fermentados y gelificados, postres lácteos, etcétera.

La susceptibilidad a la sinéresis de estos productos es ampliamente reconocida pero poco entendida. En estudios realizados por el grupo de investigación de Lucey (Lucey y col., 1997b; Lucey 2001) se concluye que las principales condiciones que llevan a la sinéresis en geles ácidos de leche son:

- Temperaturas altas de incubación (por ejemplo 45 °C comparado con 30 °C)
- Velocidad alta de acidificación (por ejemplo GDL en lugar de cultivos lácticos)
- Tratamiento térmico excesivo de la leche (por ejemplo  $\geq 80$  °C durante 30 minutos)
- Bajo contenido de sólidos totales (especialmente proteína pero también grasa si la leche es homogenizada)
- Producción baja de ácido (por ejemplo pH 4.9 en comparación con 4.6)
- Contenedores con paredes inclinadas (éstos causan esfuerzos adicionales sobre el gel, lo cual puede generar encogimiento de éste)
- Agitación durante la gelificación (disturbios cuando el gel es aún débil)
- Fusión continua de las partículas agregadas de la caseína (contracción de la red) durante el envejecimiento del gel.

En geles ácidos de leche tratada térmicamente la tendencia a exhibir separación de suero se ha relacionado con deformaciones bajas a la fractura



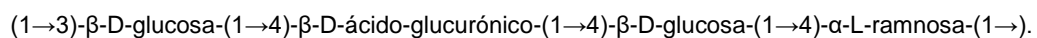
y a incrementos en  $\tan \delta$ , aún a frecuencias altas, durante los procesos de gelificación, ya que valores altos de este último parámetro indica que se favorece la relajación de enlaces en el gel.

## 1.9 GELANA

Gelana es un exopolisacárido producido por la bacteria *Sphingomonas elodea*. Este hidrocoloide ha sido objeto de muchos estudios por sus características y propiedades que han manifestado sus geles y soluciones. La gelana es un agente gelificante multifuncional aún a niveles de uso muy bajos (Rodríguez-Hernández, 2003) y por lo tanto se espera que sea muy eficiente en diversas aplicaciones.

Algunas características de la goma gelana son: propiedades de gelificación, compatibilidad con otros hidrocoloides originando una variedad de texturas de gel, alta sensibilidad a sales, facilidad de modificar los atributos de textura del gel (como dureza, elasticidad y cohesividad) modificando la concentración del polisacárido y la de los iones que favorecen la gelificación, buena estabilidad sobre un amplio intervalo de pH en el medio (3.5-8.0), factibilidad de obtener geles a concentraciones de polisacárido tan bajas como 0.05% (masa/masa) y de convertir sus geles de termo-reversibles a termo-irreversibles con solo modificar la concentración del polisacárido y la fuerza iónica (Rodríguez-Hernández, 2004).

La estructura primaria de gelana consiste de un tetrasacárido lineal formado por los azúcares:



La goma gelana nativa presenta en su estructura dos sustituyentes acilo: O-acetilo y O-L-glicerilo en cada tercera glucosa enlazada en el polímero, el

grupo acetilo fue asignado a la posición 6 de la glucosa y el glicerilo a la posición 2, predominando este último. Estos sustituyentes se pierden durante el proceso de extracción comercial, generando una gelana desacilada designada comúnmente como "goma gelana" para diferenciarla de la gelana nativa. La gelana nativa o en su forma acilada, proporciona geles suaves, elásticos, flexibles y traslúcidos; mientras que en su forma desacilada se generan geles duros, rígidos y quebradizos ideales para liberar sabores. La figura 1.9-1 muestra la estructura primaria lineal del polisacárido gelana nativa con los sustituyentes glicerilo y acetilo (Rodríguez-Hernández, 2003).

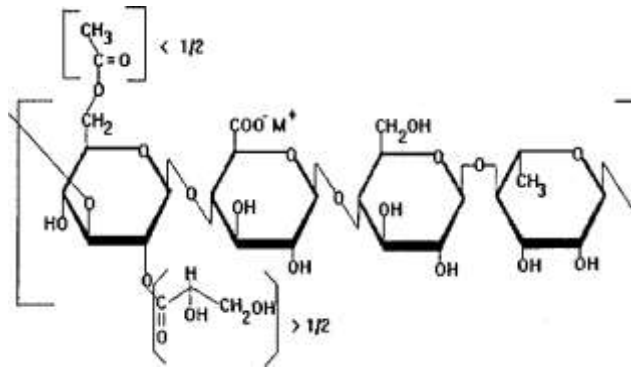


Figura 1.9-1 Estructura química de gelana nativa. (Fuente: Rodríguez-Hernández, 2004).

### 1.9.1 Mecanismo de gelificación

Se ha establecido que gelana en solución presenta cambios conformacionales desorden-orden: 2 cadenas de gelana  $\leftrightarrow$  doble hélice. Este cambio se efectúa a temperaturas superiores a la temperatura de gelificación ( $T_{sol-gel}$ ) y es conocido como transición conformacional ( $T_m$ ). La temperatura de transición conformacional depende principalmente de la concentración iónica total del medio y la naturaleza de los iones presentes. Se ha sugerido que el mecanismo de gelificación de gelana se lleva a cabo en dos etapas como se muestra en la figura 1.9-2. Un incremento de la concentración de cationes o la disminución de la temperatura promueve la

transición de cadena aleatoria a dobles hélices (primera etapa) y la asociación de dobles hélices rígidas para formar agregados o geles (segunda etapa). Este mecanismo es ampliamente aceptado tanto para contraiones monovalentes como divalentes e involucra la formación de hélices como prerequisite para la gelificación (Rodríguez-Hernández, 2004).

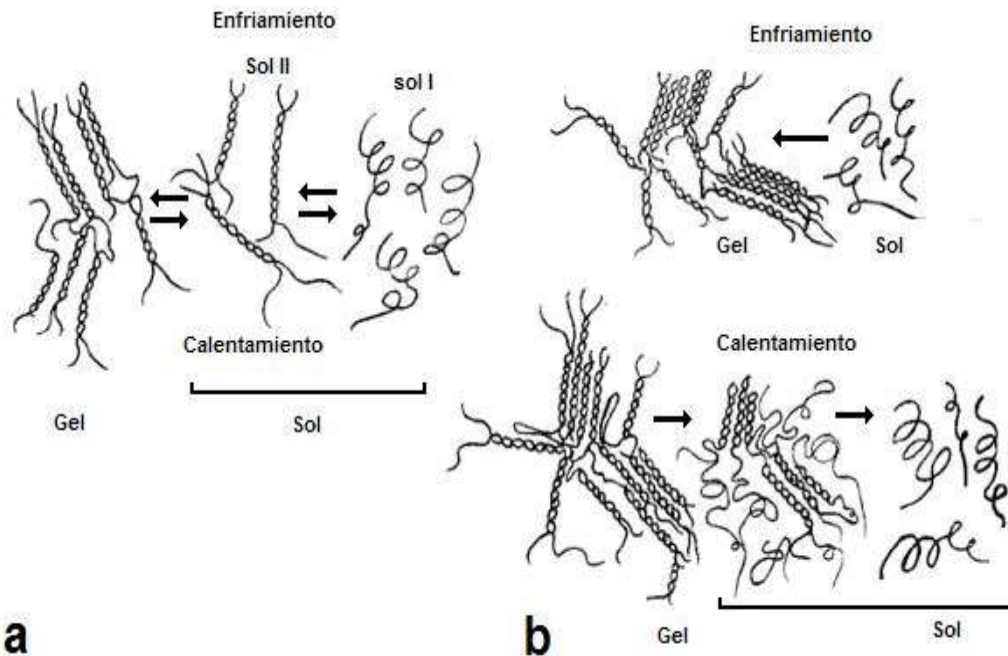


Figura. 1.9-2 Modelo esquematizado del mecanismo de gelificación de gelana en presencia de iones monovalentes, a) gelificación de gelana en presencia de concentraciones iónicas totales relativamente bajas, b) gelificación de gelana en presencia de concentraciones iónicas totales altas (Fuente: Miyoshi y Nishinari, 1999).

### 1.10 PROPIEDADES REOLÓGICAS Y MICROESTRUCTURALES DE GELES DE GELANA

El comportamiento reológico de geles y soluciones de gelana ha sido estudiado por diversos autores con la finalidad de generar mayor conocimiento acerca de su funcionalidad en sistemas alimenticios. Muchos de estos autores refieren que los geles formados por gelana tienen las características de ser fuertes, firmes, quebradizos y con poca elasticidad, por lo que este polisacárido frecuentemente se usa mezclado con otros hidrocoloides en la industria de alimentos. En los últimos años se han

realizado estudios usando concentraciones bajas de gelana. A través del estudio reológico-dinámico y microestructural de este polisacárido, Rodríguez-Hernández y colaboradores (2003) evidenciaron la formación de geles de gelana a concentraciones menores (0.005%-0.05% p/p) a las comúnmente probadas, usando una concentración fija de 10 mM  $\text{CaCl}_2$ .

En todos los sistemas estudiados por estos investigadores, los espectros mecánicos mostraron comportamientos tipo gel ( $G' \gg G''$ , y poca dependencia con la frecuencia) e incrementos progresivos de los módulos,  $G'$  y  $G''$ , a medida que se incrementaba la concentración de gelana. La microestructura de los geles, observada a través de microscopia confocal de barrido láser, confirmó la formación de redes continuas interconectadas a través de todo el volumen de la solución, incluso a concentraciones de 0.005% gelana, progresivamente más densas (con espacios intersticiales menores) a medida que se incrementó la concentración de gelana, a pesar de la apariencia fluida de estos sistemas. Los autores sugirieron que la formación de redes interconectadas “geles” de gelana sin incremento sustancial en la viscosidad del medio pudiera ser aprovechada en la estabilización de suspensiones alimentarias (i.e. bebidas lácteas, néctares, jarabes, jugos, aderezos, etc).

Estudios recientes (Pérez-Campos 2008, Pérez-Campos y col. 2009) mostraron que no obstante que gelana se identifica en el mercado de hidrocoloides como un agente gelificante, en medio acuoso puede generar una amplia gama de comportamientos viscoelásticos: geles fuertes, geles débiles, geles fluidos y soluciones macromoleculares, dependiendo de la concentración de calcio en el medio. Los resultados de este estudio evidenciaron que la concentración de gelana ejerce un efecto dominante en las propiedades viscoelásticas de sus soluciones o geles en regímenes diluidos ( $\text{gelana} \leq 0.05\%$ ), la relación  $\text{Ca}^{2+}/\text{gelana}$  determina las propiedades viscoelásticas de los geles de gelana sólo cuando la concentración de ésta es mayor o igual a 0.05% y se sugiere una concentración “crítica” de  $\text{CaCl}_2$

en las tres concentraciones de gelana examinadas (0.02, 0.05 y 0.07%) de tal forma que:

- a)  $\text{CaCl}_2 < 2 \text{ mM}$  → genera sistemas en donde el carácter elástico predomina progresivamente conforme se incrementan las contracciones del medio.
- b)  $\text{CaCl}_2 > 2 \text{ mM}$  → genera sistemas en donde el predominio del carácter elástico sobre el viscoso ( $\tan \delta$ ) se mantiene en la misma proporción, incluso al aumentar la concentración de gelana.

Estas observaciones sugieren el efecto detonante de calcio en la estructuración de gelana y que las concentraciones examinadas son suficientes para generar una red que se extienda en todo el volumen de la muestra. En este trabajo también se presenta un diagrama de transición *sol-gel* de gelana (figura 1.10-1), este diagrama es una herramienta para fijar la concentración de gelana o fuerza iónica para aplicaciones específicas en donde sea requerido el estado sol o gel de gelana a determinada temperatura de proceso.

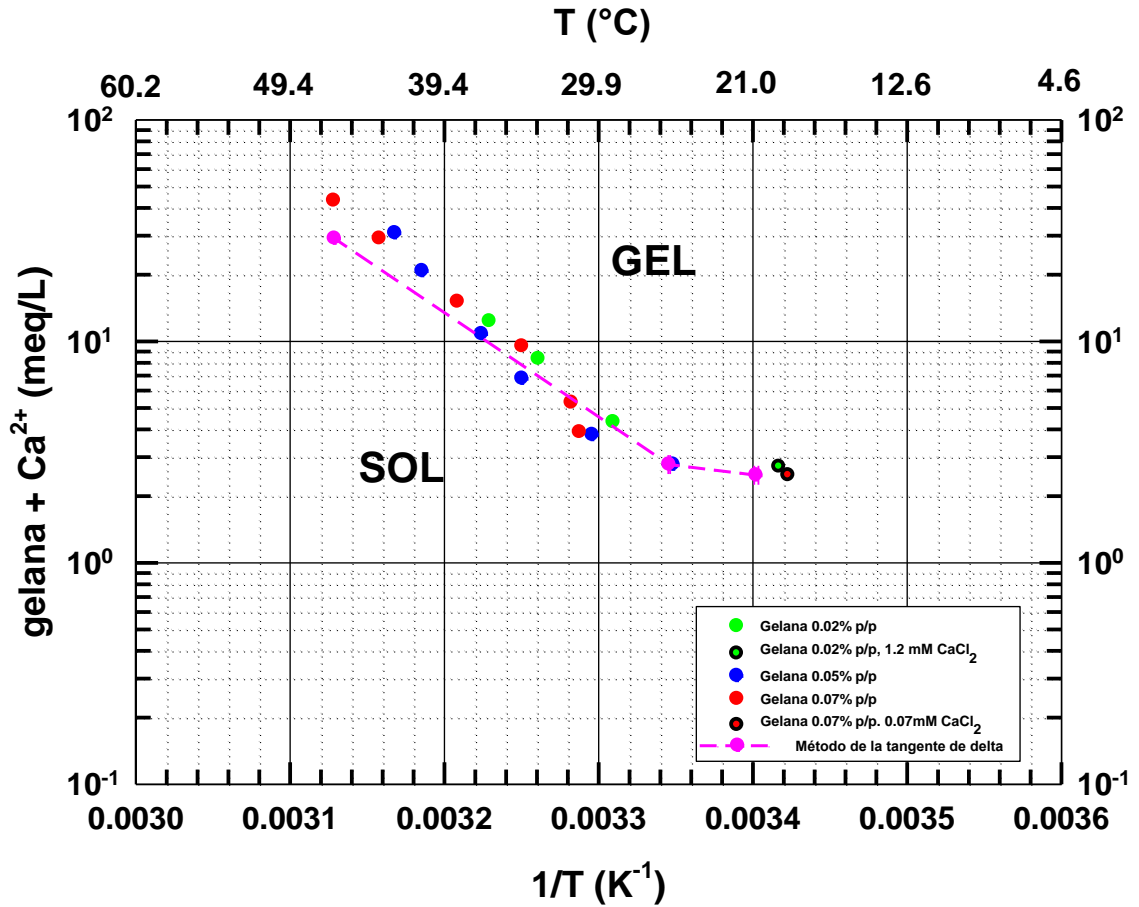


Figura 1.10-1 Temperaturas de transición sol-gel de gelatina durante el proceso de enfriamiento. Los símbolos verdes, azules y rojos corresponden a la temperatura de cruce de los módulos  $G'$  y  $G''$  durante el enfriamiento de soluciones de gelatina (0.52 °C/min) en cizalla oscilatoria de pequeña amplitud a  $\omega=1$  Hz. Los símbolos rosas corresponden a la temperatura de transición sol-gel durante el enfriamiento (0.52 °C/min) de las soluciones de gelatina usando el método de tangente de delta. (Fuente: Pérez-Campos, 2008).

# **Capítulo 2: FINALIDAD DE LA INVESTIGACIÓN**

## **2.1 JUSTIFICACIÓN**

Actualmente existe una gama amplia de productos lácteos acidificados, desde leches fermentadas hasta leches acidificadas directamente con jugos de frutas o ácidos. El pH de estos productos usualmente es menor a 5 y debido a la inestabilidad de la micela de caseína a estos valores de pH, es requerida la presencia de una agente estabilizante para evitar la agregación abrupta de proteínas y para mejorar la textura del producto. El uso de hidrocoloides puede resultar favorable cuando se aplican a sistemas lácteos gelificados, el efecto que tiene la creación de una red polimérica (polisacáridos gelificantes o formadores de redes) en la matriz gelificada de proteínas de la leche y cómo ésta influye en la estabilidad fisicoquímica del sistema gel-lácteo formado, puede ofrecer una alternativa tecnológica en la manufactura industrial de estos productos. Los principales problemas que ocurren cuando la leche es gelificada, es la exudación de agua hacia la superficie del gel o la presencia de una consistencia inadecuada, diversos factores del procesamiento (pretratamiento térmico de la leche, fortificación con proteína de leche y homogenización) son usados para influir en la consistencia de los geles ácidos y para reducir la sinéresis o pérdida de suero. En este contexto muchas investigaciones han sido centradas respecto al uso de polisacáridos aplicados a sistemas lácteos gelificados, que permitan contrarrestar estos problemas. Los polisacáridos utilizados en la mayoría de los estudios son carrageninas y pectinas, sin embargo, gelana desacilada es un polisacárido que a bajas concentraciones puede proveer de redes bien reticuladas capaces de atrapar el agua y los solutos presentes en

la leche. Esta característica pudiera permitir conseguir texturas y consistencias estables de los geles lácteos acidificados con características muy específicas y novedosas. El uso de soluciones y/o geles de gelana tiene las siguientes ventajas:

- La gelana tiene la capacidad de formar redes a concentraciones inferiores a las usadas con hidrocoloides similares (i.e. carrageninas, agar, gelatina), para lo cual es necesario proveer al polisacárido de cationes, preferentemente divalentes, para promover su gelificación. Por lo tanto se considera una ventaja el uso de gelana en sistemas lácteos, debido a concentración de iones presentes en la leche.
- La gelana en solución y a bajas concentraciones de polímero muestra viscosidades bajas y en presencia de calcio se generan geles fluidos, por lo tanto en sistemas en donde no se requiere incrementar significativamente la viscosidad, los geles fluidos de gelana pueden ser útiles para la suspensión de sólidos gruesos (i.e pulpa de fruta, cocoa).
- Incrementando la fuerza iónica del medio se logran geles progresivamente más fuertes que requieren temperaturas cada vez mayores para ser fundidos, e incluso se pueden formar geles termo-irreversibles. Esto es una ventaja en microgeles de gelana, ya que aún después de tratamientos térmicos como pasteurización, los microgeles de gelana se mantienen sin disolverse. Esta propiedad no se observa con otros hidrocoloides.
- Las propiedades reológicas de las soluciones o geles de gelana son estables en un intervalo amplio de pH (i.e. 3.5 a 8). Esto es una ventaja en la estabilización de bebidas lácteas fermentadas.

## HIPÓTESIS



La acidificación de las proteínas de la leche en presencia de gelana, generará sistemas estables debido a la formación de geles particulados (agregados de proteína) reforzados por medio de redes de gelana que se entrecruzarán a través de puentes de calcio, cuya concentración se incrementará en el medio continuo a medida que el pH del sistema desciende (i.e durante la acidificación de la leche).

## **2.2 OBJETIVOS**

### **2.2.1 Objetivo General**

Examinar el efecto de la adición de calcio en la gelificación ácida de la leche en presencia y ausencia de gelana, a través de reometría de cizalla oscilatoria y microscopía confocal de barrido láser, con el propósito de establecer relaciones estructura-funcionalidad que coadyuven en la mejora de la estabilidad fisicoquímica de sistemas lácteos acidificados.

### **2.2.2 Objetivos Específicos**

1. Determinar el efecto de la adición de calcio en la co-gelificación de gelana-proteínas de la leche, a través del análisis de la evolución de los módulos viscoelásticos durante la gelificación ácida de la leche y de las propiedades viscoelásticas de los geles formados.
2. Examinar el efecto de la adición de calcio y co-gelificación de gelana en la microestructura de geles ácidos de leche, visualizada a través de microscopía confocal de barrido láser.
3. Evaluar el efecto de la co-gelificación de gelana en la sinéresis espontánea de geles ácidos de leche.

# **Capítulo 3: MATERIALES Y MÉTODOS**

## **3.1 MATERIALES**

Para preparar los geles ácidos de leche se utilizó leche descremada en polvo (LDP) (American Dairy®), glucono- $\delta$ -lactona (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>, mínimo de pureza 99%; Sigma-Aldrich, G-4750) y gelana desacidada comercial (Kelcogel®, CPKelco, Lote 4E0783A), esta última con 7.5% de humedad y contenido de minerales (% p/p base seca): 0.2925 Ca<sup>++</sup>, 0.4723 Na<sup>+</sup>, 3.9604 K<sup>+</sup>, 0.1037 Mg<sup>++</sup>.

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 Análisis bromatológicos y absorción atómica**

La leche descremada fue analizada en proteína, grasa y humedad (cuadro 3.2-1), así como en contenido de calcio, magnesio, sodio y potasio (análisis realizados por la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM).

Cuadro 3.2-1 Composición porcentual promedio de la leche descremada en polvo (American Dairy®) utilizada en las pruebas (Resultados promedio de 3 determinaciones, entre paréntesis se muestra la desviación estándar).

Componentes	Contenido	
	(% p/p)	ppm
Grasa <sup>1</sup>	0	-
Proteína <sup>2</sup>	33.73 (0.26)	-
Humedad <sup>3</sup>	3.8 (0.2)	-
Calcio <sup>4</sup>	0.9060 (0.17)	9060.284
Sodio <sup>4</sup>	0.4638 (0.10)	4638.093
Potasio <sup>4</sup>	1.3380 (0.24)	13379.827
Magnesio <sup>4</sup>	0.1121 (0.02)	1121.264

<sup>1</sup>Método butirométrico de Teichert (Casado-Cimiano, 1991).

<sup>2</sup>Método Kjendahl. Se consideró que el 5% del nitrógeno determinado pertenecía a nitrógeno no proteico. Factor utilizado 6.38. (AOAC, 1998).

<sup>3</sup>Desecación a 100 °C durante 48 h.

<sup>4</sup>Absorción atómica (Procedimiento técnico PT-USAI-FQ-AA-003, realizado por USAI-FQ-UNAM).

### 3.2.2 Preparación de las soluciones y geles ácidos de leche

Se prepararon soluciones peso/volumen ( $\Xi$ p/v) de LDP al 12%, mismas que se acidificaron con 1% p/v de glucono- $\delta$ -lactona (GDL) en presencia y ausencia de gelana (0.05%) y CaCl<sub>2</sub> (3 mM). La matriz experimental se muestra en el cuadro 3.2-2.

Cuadro 3.2-2 Nomenclatura y descripción de los sistemas experimentales.

TRATAMIENTO	Leche (12%)	GDL(1%)	CaCl <sub>2</sub> (3 mM)	Gelana (0.05%)
LL	*			
SG	*		*	
SCa	*			*
SC	*		*	*

Diseño experimental d bloques al azar

### **A. Sistema LL**

Se pesaron 200 mL de agua desionizada en un vaso de precipitado de 500 mL con ayuda de una balanza semiautomática. Por otro lado se pesaron 24 g de LDP en una balanza analítica. La LDP se adicionó al volumen de agua previamente pesado y se mezcló mientras se calentaba la solución obtenida hasta 90° C en una parrilla eléctrica con agitación magnética a 400-500 rpm. Una vez alcanzada la temperatura, ésta se mantuvo durante 10 minutos para garantizar mezclado homogéneo.

### **B. Sistema SC**

Para las soluciones que contenían al polisacárido, primero se disolvió (mediante calentamiento y agitación magnética constante en una parrilla eléctrica) 0.1g de gelana en 200 mL de agua destilada previamente pesada. Cuando se consiguió la total disolución de gelana (T=90°C) la solución presentaba una apariencia transparente, en este momento se adicionaron 6.5 mL de una solución *stock* de CaCl<sub>2</sub> 92.3 mM para conseguir una concentración final de CaCl<sub>2</sub> de 3 mM. Bajo agitación magnética y manteniendo la temperatura a 90°C, se adicionaron 24 g de LDP como se expone en el inciso A.

### **C. Sistema SG**

Se preparó la muestra como se describe en el inciso A con la variante de adicionar el CaCl<sub>2</sub> una vez alcanzada la temperatura de calentamiento (90° C).

### **D. Sistema SCa**

Se preparó la muestra como se expone en el inciso B con la variante de no adicionar CaCl<sub>2</sub>.

### **3.2.3 Acidificación con GDL**

Previo a las determinaciones reológicas, una vez transcurridos los 10 minutos del calentamiento a 90° C, cada sistema fue enfriado en un baño de agua fría con agitación magnética hasta 38° C, entonces se adicionó la GDL al 1% p/v y se mezcló mediante agitación magnética, procurando no exceder 1 minuto la agitación. Rápidamente se tomaron 7.5 mL de muestra que fueron colocados en la geometría del reómetro precalentada a 38 °C para iniciar los experimentos reológicos. El resto de la muestra fue usado para llevar a cabo la cinética de pH.

### **3.2.4 Cinética de pH**

Se evaluó el pH de los sistemas lácteos formulados en función del tiempo durante 3 horas, tomando lecturas cada 15 minutos en un potenciómetro de la marca Thermo Orion modelo 420. La temperatura de la muestra se mantuvo constante a 38°C±2 usando un baño de agua con recirculación. Estas determinaciones se realizaron en paralelo a la cinética de gelificación (barrido de tiempo) en el reómetro.

### **3.2.5 Pruebas reológicas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud**

Para las pruebas reológicas se utilizó un reómetro de esfuerzo controlado, TA INSTRUMENTS, modelo AR2000 con geometría de cilindros concéntricos de doble pared (CCDP) (espacio anular interno: 0.38 mm, espacio anular externo: 0.31 mm y longitud del cilindro 59.50 mm). Esta geometría fue seleccionada debido a que las soluciones, previo a la gelificación, tienen una viscosidad muy baja, sólo medible con esta geometría.

#### **I. Barrido de tiempo**

Se evaluó la evolución de los módulos  $G'$  y  $G''$  a través del tiempo durante 3 horas a 38° C y 1Hz de frecuencia. La prueba se inició con el torque mínimo accesible por el equipo (10  $\mu$ N), incrementándose paulatinamente para mantener una deformación menor al 1% con señales de torque estable. Fue necesario aumentar

el torque a medida que pasaba el tiempo para obtener deformaciones inferiores al 1%. En esta prueba se evaluaron las propiedades viscoelásticas a medida que tiene lugar la gelificación ácida de la leche.

#### II. Barrido de frecuencia

Una vez concluido el barrido de tiempo se realizó un primer barrido de frecuencia a 38° C, desde 0.1 hasta 100 rad/s. Al finalizar este espectro la muestra fue enfriada a 10° C, entonces se llevó a cabo una segunda prueba de frecuencia a esta temperatura, también desde 0.1 hasta 100 rad/s. En ambos casos el torque se fijó de tal forma que se generaran deformaciones en la muestra inferiores al 1%.

#### III. Barrido de esfuerzo

Al finalizar los barridos de tiempo y frecuencia se efectuó un barrido de esfuerzo para constatar que las pruebas llevadas a cabo previamente se realizaron dentro de la zona viscoelástica lineal.

### **3.2.6 Determinación de temperatura de transición sol-gel de gelana**

La temperatura de transición sol-gel de gelana durante el enfriamiento de ésta se obtuvo a través del método de ángulo de fase crítico o método de tangente de delta, como habitualmente se le conoce. Este método se fundamenta en determinar la temperatura de transición sol-gel ( $T_{\text{sol-gel}}$ ) como aquella en donde los módulos  $G' = G''$ , es decir  $\tan \delta = 1$ , y este valor es independiente de la frecuencia, ya que la temperatura de transición sol-gel es una propiedad intrínseca del material. En el presente estudio se evaluó la eficacia de este método en gelana 0.05% y 0.07% con distintas concentraciones de calcio (pruebas preliminares que no se reportan).

Para la determinación de  $T_{\text{sol-gel}}$  se realizaron barridos de frecuencia en las inmediaciones de la transición sol-gel, para lo cual se consideraron los resultados de cinética de gelificación reportados por Pérez-Campos (2008) (figura 1.10-1).

Los datos de tangente de delta en función de la temperatura y la frecuencia se usaron para elaborar el gráfico  $\tan \delta$  versus temperatura (en distintos valores de frecuencia) y obtener el punto de cruce en donde  $\tan \delta$  es independiente de la frecuencia.

A partir del análisis de los resultados se determinó usar gelana 0.05% en presencia de 3 mM CaCl<sub>2</sub>, la temperatura de transición sol-gel de este sistema ( $T_{gel}=31.48$  °C) permite analizar los geles ácidos de leche cuando la gelana presente en ellos se encuentra en estado sol (durante la acidificación de ésta,  $T=38$  °C) y en estado gel ( $T<38$  °C).

### **3.2.7 Preparación de gelana y leche descremada para microscopía confocal de barrido láser**

#### **Etiquetado fluorescente de gelana**

Para la visualización de los geles de leche ácida-gelana a través de microscopía confocal de barrido láser, fue necesario inducir la fluorescencia de las macromoléculas del sistema (i.e. proteína de la leche y gelana) usando la técnica de etiquetado fluorescente. Para el caso de gelana, se siguió la metodología descrita por Pérez-Campos (2008), la cual consiste en unir covalentemente fluoresceinamina a la molécula de gelana, dando lugar a compuestos tiocarbonilos o derivados de tiourea (compuestos amarillo-naranja; De Belder y Wik, 1975). La técnica consistió en dispersar 2 g de gelana en 300 mL de agua desionizada con agitación magnética a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron 75 mL de dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich 471267) manteniendo una agitación lenta. El valor de pH de esta dispersión se mantuvo entre 5 y 7. Posteriormente se adicionaron 28.1 mg de fluoresceinamina (Isómero I, Sigma-Aldrich 201626) previamente disuelta en un pequeño volumen de dimetilsulfóxido, 28.1  $\mu$ L de ciclohexilisocianida (Sigma-Aldrich 133302) y 28.1  $\mu$ L de acetaldehído (Sigma-Aldrich 402788).

La mezcla reactiva se mantuvo en agitación magnética a temperatura ambiente durante 5 h, posteriormente se precipitó el polímero etiquetado con 2 volúmenes de acetona fría. Al polímero precipitado se le realizaron varios lavados con acetona usando un filtro de vidrio poroso (tamaño de poro 60  $\mu$ m) hasta obtener efluentes cristalinos. Éste se secó a temperatura ambiente en un desecador convencional de laboratorio durante 16 h aproximadamente. Una vez seco, se dispersó en 100 mL

de agua desionizada a temperatura ambiente y se dializó contra agua desionizada (membrana con corte molecular de 12,000-14,000 Da) hasta no detectar un color amarillo en el agua de diálisis. Concluida la diálisis, el polímero se secó en un horno a 40 °C. Los resultados de reología dinámica en la gelana etiquetada no evidenciaron degradación importante en la molécula por la reacción de etiquetado (Pérez-Campos, 2008).

### **Etiquetado fluorescente de la proteína de leche**

La leche en polvo descremada fue etiquetada de acuerdo a la metodología propuesta por Tan y col (2007); a 50 g de leche en polvo hidratada al 12% de sólidos totales se le adicionaron 200 µL de una solución 1% de FG (Fast Green–Sigma-Aldrich F7252). La reacción no es covalente por lo que sólo fue necesario mezclar el fluoróforo con la proteína de la leche.

### **3.2.8 Microscopía de barrido confocal laser**

Una vez preparadas las soluciones como se describe en el etiquetado de LDP las muestras se enfriaron a 38° C y se adicionó GDL como se describe en la sección 3.2.3, inmediatamente después se colocó una alícuota en un portaobjetos limpio y precalentado a 38 °C, se cubrió la muestra con cubreobjetos y se sellaron con barniz para reducir su deshidratación, esto se realizó rápidamente para evitar perturbar la gelificación de la muestras al manipular los portaobjetos. Las muestras colocadas en el portaobjetos se incubaron a 38 °C durante 3 horas en una incubadora marca RIOSSA modelo 50.51 serie EOMI. Transcurrido el tiempo, las muestras fueron mantenidas en refrigeración previo a la observación al microscopio (24 h aproximadamente).

Las observaciones al microscopio se llevaron a cabo en la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Se utilizó un microscopio invertido motorizado marca Olympus, modelo IX81, en el modo de fluorescencia con objetivos invertidos en aceite (10X, 60X y 100X). Se usó un haz de luz láser de 488



nm para excitar la fluoresceinamina ligada a la molécula de gelana y un haz de luz láser de 633 nm para excitar el *Fast Green* acoplado a la proteína de la leche. Las determinaciones fueron realizadas a temperatura ambiente (15-20 °C) en muestras previamente gelificadas.

### 3.2.9 Determinación de sinéresis

Para esta determinación se prepararon los tratamientos establecidos en el cuadro 3.2-2 (LL, SG, SCa, SC) tal y como se describe en la sección 3.2.2 de este capítulo, las soluciones se enfriaron a  $\approx 38$  °C y se les adiciono 1% de GDL a cada una, se agitaron y rápidamente fueron pesados 20 mL de cada sistema en matraces erlenmeyer de 50 mL secados previamente hasta peso constante. Los matraces se taparon con papel aluminio y se mantuvieron en un baño a 38 °C durante 3 horas. Concluido el tiempo, los matraces se colocaron en refrigeración (5-7 °C) en una superficie plana, evitando movimientos bruscos en ellos que pudieran perturbar el gel formado.

Se realizó la prueba de sinéresis en los geles ácidos formados, monitoreando su expulsión espontánea de agua durante 16 días, muestreando cada 4 días. En este trabajo se definió como sinéresis el porcentaje de suero exudado hacia la superficie de los geles de manera espontánea, sin la aplicación de ninguna fuerza externa más allá de la gravedad. Los matraces conteniendo la muestra se drenaron usando una pipeta Pasteur y papel absorbente para limpiar las paredes del matraz, evitando la fractura del gel. La muestra drenada se pesó y el porcentaje de sinéresis se determinó usando la ecuación (13). Las determinaciones se realizaron por duplicado.

$$\%sinéresis = \frac{Ms - Msd}{Ms} \times 100 \quad (13)$$

Donde:

$M_s$ : masa del sistema (g)

$M_{sd}$ : masa del sistema drenado (g)

# Capítulo 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 4.1 TEMPERATURA DE TRANSICIÓN SOL-GEL DE GELANA

En la figura 4.1-1 se muestra la determinación de la temperatura de transición sol-gel ( $T_{\text{sol-gel}}$ ) de gelana 0.05% con 3 mM de  $\text{CaCl}_2$ , realizada a través del método de tangente de delta ( $\tan \delta$ ) y los barridos de frecuencia de temperaturas próximas a la temperatura de transición  $T_{\text{sol-gel}}$ . Para facilitar el análisis de resultados se muestra sólo una de las dos determinaciones realizadas para este sistema. En la figura 4.1-1a se observa que el valor de  $\tan \delta$  al cual convergen las distintas frecuencias examinadas en las pruebas reológicas oscilatorias es ligeramente inferior a 1, no se obtuvo el valor teórico  $\tan \delta=1$  (i.e  $G'=G''$ ) en la temperatura de transición sol-gel, debido a que este sistema gelifica rápidamente en presencia de calcio y la transición quizá se pueda observar disminuyendo la velocidad de enfriamiento en las muestras (en estas determinaciones los barridos de temperatura se hicieron cada  $0.2^\circ\text{C}$  y el software del equipo no permite disminuir la velocidad de enfriamiento). No obstante, se considera que el método de tangente de delta funciona para estos sistemas como se demostró en trabajos anteriores (Pérez-Campos, 2008). Por lo tanto, gelana 0.05% en presencia de 3 mM de  $\text{CaCl}_2$  gelifica, durante el proceso de enfriamiento a  $31.44 \pm 0.04^\circ\text{C}$ , lo cual se confirma al observar los espectros mecánicos dinámicos de este sistema (figura 4.1-1b), a  $32^\circ\text{C}$  se observa una evidente dependencia de los módulos con la frecuencia, predominando  $G''$  sobre  $G'$ .

Al disminuir la temperatura a  $31.6^\circ\text{C}$  es evidente una menor dependencia de ambos módulos con la frecuencia predominando aún  $G''$  sobre  $G'$ , es decir el sistema tiene un comportamiento viscoelástico tipo *solución macromolecular* con tendencia a formar interacciones cadena-cadena “*entanglements*” de vida muy corta (frecuencias altas de experimentación,  $>3 \text{ rad/s}$ ). En contraste, a  $31.4^\circ\text{C}$  se observa

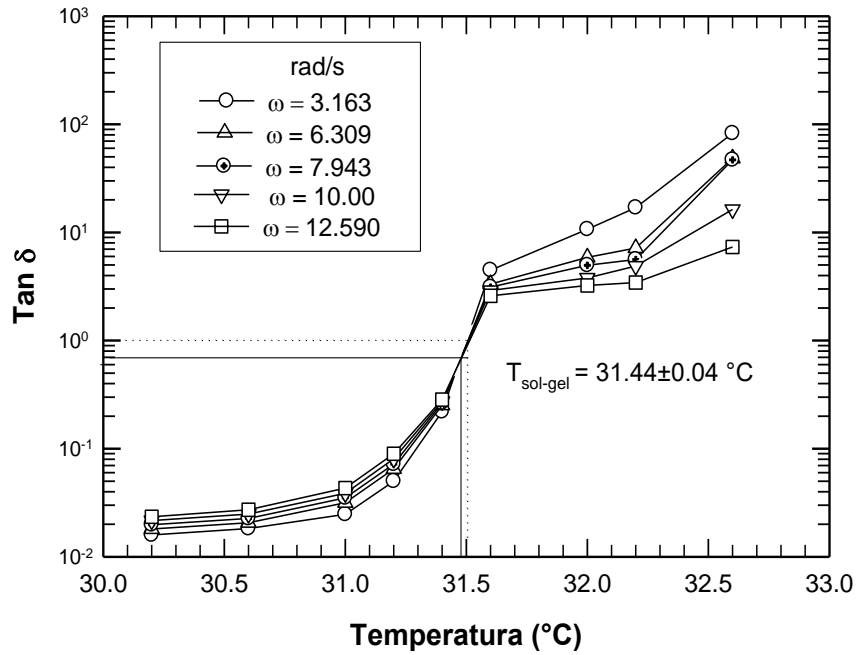
que los módulos presentan menor dependencia con la frecuencia y predomina  $G'$  sobre  $G''$  en todo el intervalo de frecuencia examinado. Si se ha determinado como temperatura de transición sol-gel de este sistema  $31.44\text{ }^{\circ}\text{C}$  (figura 4.1-1a), es de esperarse que a  $31.4\text{ }^{\circ}\text{C}$  los módulos viscoelásticos sean menos dependientes de la frecuencia, predominando  $G'$  sobre  $G''$ , es decir a esta temperatura el sistema se comporta como un gel débil. A  $31\text{ }^{\circ}\text{C}$  el carácter elástico predomina sobre el viscoso en todo el barrido de frecuencia ( $G' > G''$ ) y su dependencia con la frecuencia de medición o el tiempo de observación es menor, efecto que ocurre desde  $31.2^{\circ}\text{C}$  (gráfico no mostrado), esto es evidencia de que a partir de  $31\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y hacia temperaturas inferiores, el sistema formado por gelana  $0.05\%$  y  $3\text{ mM CaCl}_2$  presenta un comportamiento reológico tipo gel suave con valores de  $4.5 < G' < 6\text{ Pa}$  y una ligera tendencia a fluir cuando se somete a frecuencias altas de oscilación ( $G''$  se aproxima al valor de  $G'$ ).

La determinación de la temperatura de transición sol-gel del sistema formado por  $0.05\%$  gelana y  $3\text{ mM CaCl}_2$ , permite constatar que a temperaturas mayores a ésta, por ejemplo  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ , el sistema se encuentra en estado sol. En el presente trabajo se examinó la acidificación de la leche a  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ , temperatura en la cual el polisacárido gelana se encuentra en estado sol bajo las condiciones de concentración y fuerza iónica arriba descritas. A esa temperatura se observaría cómo se modifica la reología de la leche durante su acidificación, generada por la reacción de hidrólisis de GDL en presencia de un polisacárido disperso no gelificado (gelana) que requiere calcio para entrecruzar sus cadenas y formar una red. Es decir, conforme disminuye el pH del sistema, se espera que el calcio micelar de la leche (fosfocaseinato de calcio) migre de la micela en forma de calcio iónico, de tal forma que conforme avanza la gelificación de la leche existe mayor proporción de iones calcio disponibles para reforzar la matriz gelificada de caseína y posiblemente para promover la gelificación de gelana.

Una vez concluida la gelificación de la proteína de la leche, la temperatura de los geles ácidos de leche se disminuyó a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  para examinar el efecto de la

gelificación de gelana en el sistema global, en el caso de que ésta no hubiese gelificado a 38 °C durante el proceso de acidificación de la leche. Los resultados de estas determinaciones se discuten en secciones siguientes.

a)



b)

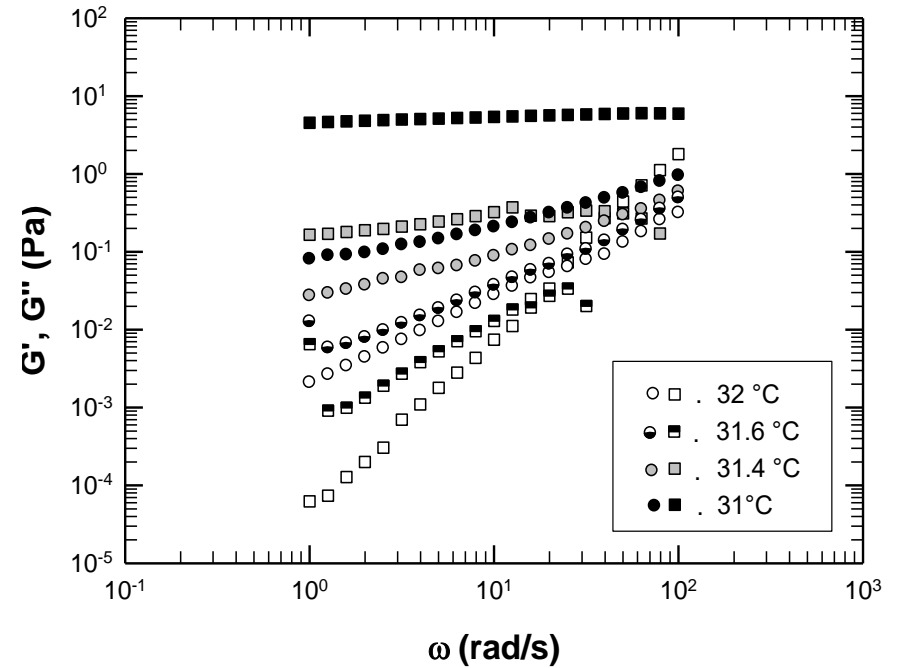


Figura 4.1-1 Temperatura de transición sol-gel para gelana 0.05% con 3 mM de  $\text{CaCl}_2$ . a) Tangente de delta en función de la temperatura, el punto convergente indica la temperatura de transición (método de tangente de delta). b) Módulos viscoelásticos ( $G'$  = cuadrados y  $G''$  = círculos) en función de la frecuencia, a distintas temperaturas cercanas a la temperatura de transición. Determinaciones realizadas dentro de la zona de viscoelasticidad lineal.

## 4.2 EVOLUCIÓN DE LAS PROPIEDADES VISCOELÁSTICAS DE GELES ÁCIDOS DE LECHE DURANTE LA CINÉTICA DE GELIFICACIÓN

En la figura 4.2-1 se presenta la evolución con el tiempo de los módulos viscoelásticos,  $G'$  y  $G''$ , así como tangente del ángulo de desfase ( $\tan \delta$ ) y pH durante la cinética de gelificación de leche acidificada con GDL. En los sistemas LL y SG que carecen del polisacárido gelana, la trayectoria de los módulos es muy parecida, comenzando en ambos casos con valores de  $G''$  mayores a  $G'$ , presentando un incremento acelerado de ambos módulos hasta que se sobrepone el carácter elástico ante el viscoso. Sin embargo en SG el cruce de los módulos se presenta poco antes que en LL, la diferencia es de aproximadamente 15 minutos. El punto en que los módulos se cruzan ( $G'=G''$ ) se considera en este trabajo como el punto de gelificación, a ese tiempo el sistema LL presenta un valor de pH más bajo ( $5.44 \pm 0.05$ ) que el sistema SG ( $5.78 \pm 0.04$ ), al parecer la presencia de  $\text{CaCl}_2$  es la principal responsable de esta diferencia. En ambos sistemas carentes de gelana se observa que los módulos tienden a un estado estacionario, con valores finales de  $G'$  y  $G''$  en el mismo orden de magnitud pero ligeramente superiores en el sistema SG. El incremento de la fuerza iónica en SG permite conseguir geles ácidos de leche con valores de pH más alto, tiempo de gelificación más corto y valores ligeramente mayores del módulo de almacenamiento.

Por otra parte, la evolución de los módulos viscoelásticos con el tiempo en los tratamientos en presencia de gelana (SCa, SC) también fueron muy parecidos entre sí, comenzando en ambos casos con valores mayores de  $G'$  respecto a los de  $G''$ , seguido de una zona muy ruidosa entre réplicas, donde los valores de los módulos varían mucho, incluso los de  $\tan \delta$  en SCa. Puesto que no es posible notar un tiempo de gelificación, si puede señalarse un tiempo de estabilización, cuando los valores de los módulos  $G'$  comienzan a parecerse entre réplicas e inicia el estado estacionario. En ambos sistemas esto ocurre casi al mismo tiempo, alrededor de los 4800 segundos (80-81 min) y los valores finales de  $G'$  fueron ligeramente mayores en SCa.

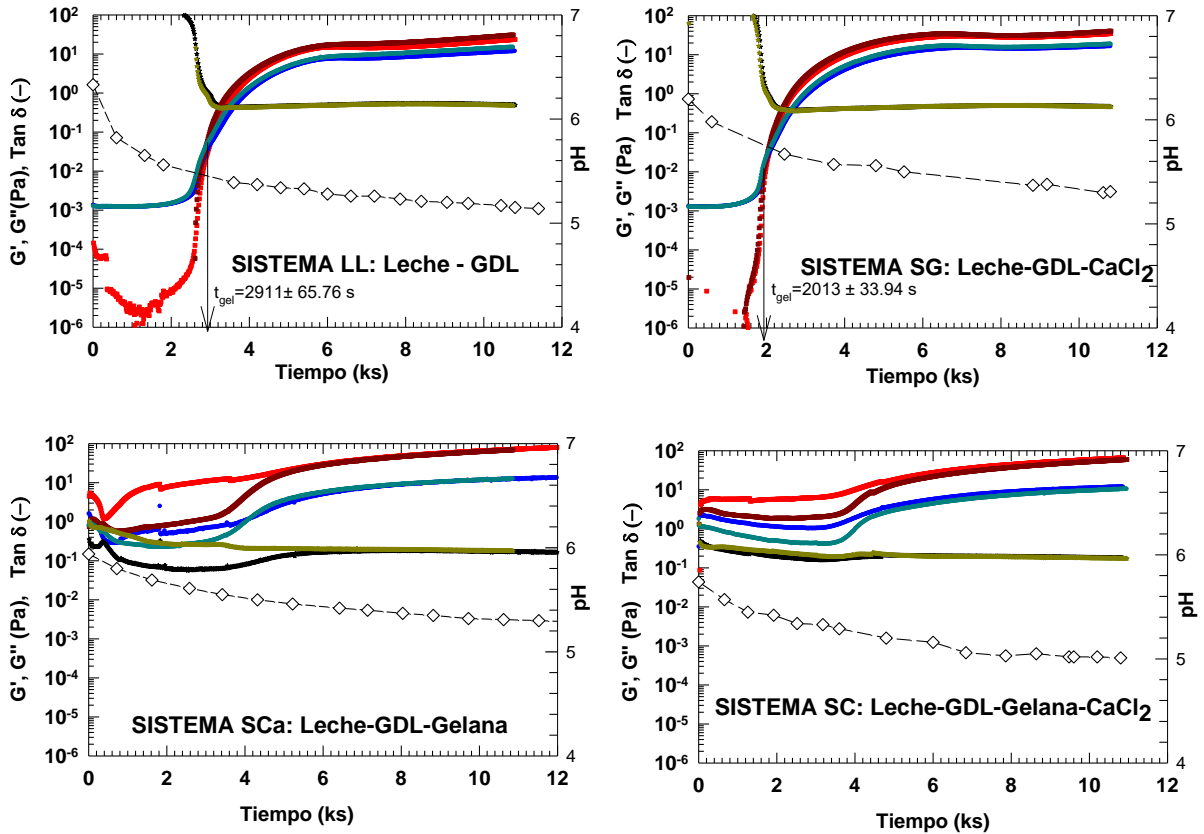


Figura 4.2-1 Evolución de los módulos de almacenamiento ( $G'$ ), de pérdida ( $G''$ ) y tangente del ángulo de desfase ( $\tan \delta = G''/G'$ ) con el tiempo durante la acidificación de la leche con 1% GDL. Determinaciones realizadas a 38 °C, frecuencia constante de oscilación de 1 rad/s y deformación dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. Se grafican dos réplicas de cada sistema,  $G'$  = Gráficos en color rojo y guinda,  $G''$  = Gráficos en azul marino y azul claro,  $\tan \delta$  = Gráficos en negro y verde, pH = diamantes unidos con línea punteada.

El cuadro 4.2-1 muestra los valores más relevantes de  $G'$ ,  $G''$ ,  $\tan \delta$  y pH para cada sistema durante la cinética de gelificación. De éste surgen las siguientes observaciones:

- Al final de las cinéticas de gelificación se obtienen módulos de almacenamiento ( $G'$ ) mayores en los sistemas que contienen gelana con respecto a los que no la contienen.
- El tiempo de gelificación y su respectivo valor de pH, así como la magnitud final de  $G'$  para los sistemas sin gelana, parecen estar influenciados por la presencia de  $\text{CaCl}_2$ .

- El pH de estabilización y magnitud final de  $G'$  en los sistemas con gelana también parecen ser alterados por la presencia de  $\text{CaCl}_2$ . El pH inicial de los sistemas en presencia de gelana es más bajo.
- Los valores de pH alcanzados al final son dependientes de la presencia de gelana y/o  $\text{CaCl}_2$ , variando entre 5.3 y 5.0. Valores mayores de pH generan geles con mayores valores de  $G'$  tanto en los sistemas con gelana como en los carentes de ésta.

Cuadro 4.2-1 Principales valores de los parámetros viscoelásticos y de pH de cada sistema evaluado durante su cinética de gelificación.

Sistema	Tiempo inicial	Tiempo de gelificación	Tiempo de estabilización	Tiempo final
<b>LL</b>	1980 s	2911±65.76 s		10800 s
$G'$ (Pa)	0	0.0404±0.001		27.1000±3.530
$G''$ (Pa)	1.4485x10 <sup>-3</sup> ±2x10 <sup>-5</sup>	0.0393±0.001		13.1750±1.545
Tan $\delta$	89.7335±0.45	0.9724±0.012		0.4871±0.007
pH	6.33 (t=0 s)	5.43		5.15
<b>SG</b>	1980 s	2013±33.94 s		10800 s
$G'$ (Pa)	0.0200±0.004	0.0251±0.001		37.2950±2.665
$G''$ (Pa)	0.0210±0.003	0.0243±9x10 <sup>-5</sup>		17.3200±1.120
Tan $\delta$	1.0695±0.079	0.9666±0.024		0.4646±0.003
pH	6.2 (t=0 s)	5.75		5.31
<b>SCa</b>	1980 s		4860 s	10800 s
$G'$ (Pa)	4.3071±3.481		17.0700±1.890	69.9050±1.355
$G''$ (Pa)	0.3546±0.131		2.7520±0.351	12.0750±0.135
Tan $\delta$	0.1668±0.104		0.1656±0.039	0.1729±0.005
pH	5.94 (t=0 s)		5.46	5.31
<b>SC</b>	1980 s		4800 s	10800 s
$G'$ (Pa)	3.7910±1.929		14.2550±2.245	61.6400±3.440
$G''$ (Pa)	0.7903±0.310		3.0465±0.430	10.9600±0.760
Tan $\delta$	0.2252±0.033		0.2143±0.004	0.1777±0.002
pH	5.74 (t=0 s)		5.2	5.01

NOTA: El tiempo de inicio de las determinaciones se fijó a 33 minutos después de la colocación de la muestra debido a que la señal de torca del equipo es muy inestable en tiempos menores. En los sistemas SCa y SC la gelificación se observa desde el tiempo inicial, por lo tanto se reporta el tiempo de estabilización (tiempo a partir del cual la razón de cambio de  $G'$  y  $G''$  es mínima). Valores promedio de 2 determinaciones y su desviación estándar.

De acuerdo con Auty y col. (2005) el comportamiento viscoelástico de los geles macroestructurales está relacionado con la naturaleza de las macromoléculas que lo integran y los reacomodos configuracionales entre ellas, así como al tipo y



número de enlaces intermoleculares involucrados. Los principales factores que influyen en las propiedades viscoelásticas de los geles de caseína incluyen la concentración de caseína, pH, temperatura y fuerza iónica. En esta investigación todos los sistemas fueron sometidos al mismo tratamiento térmico previo, durante y posterior a la adición de GDL, la concentración de caseína se mantuvo constante, mientras que las variaciones en el pH tanto inicial como final y durante la formación del gel fueron consecuencia de la acción de GDL para cada tratamiento y del incremento en la fuerza iónica. Por lo tanto las diferencias viscoelásticas que se observan entre los sistemas, están relacionadas con los cambios en la fuerza iónica a consecuencia de la presencia o ausencia de gelana y  $\text{CaCl}_2$ .

La gelificación de la leche y gelana es un proceso que requiere un cambio del estado coloidal del sistema, donde el agente disperso se vuelve el agente dispersante. Cuando el agua es el agente dispersante, su gran energía cinética le permite imperar sobre las partículas de mayor tamaño, pero el equilibrio salino que existe en la leche fluida y la capacidad hidrofílica de gelana favorecen la acción dispersante del agua. Reducir la energía cinética del agua permite su control por parte de las partículas dispersadas en ella, la cual puede ser conseguida ya sea por una disminución de la temperatura o por un aumento en la fuerza iónica del medio. La fuerza iónica que favorece el intercambio iónico propicia la formación de enlaces entre el agua y los iones agregados o entre éstos y las partículas coloidales y el agua. La formación de enlaces transforma la energía cinética en energía almacenada, puesto que el aumento de las fuerzas de atracción se opone al movimiento. Es así que cuando se aumenta la concentración de iones al medio la gelana y la leche gelifican más rápido.

Como se ha mencionado antes son dos condiciones fundamentales que permiten la coagulación de las caseínas (además de los efectos termodinámicos en los que no se profundiza en esta investigación); la reducción de la carga eléctrica negativa que rodea a las micelas y la solubilización del fosfato de calcio coloidal. Estos dos

efectos son propiciados a raíz del aumento en la fuerza iónica, que se genera por la hidrólisis del GDL. Sin embargo la fuerza iónica inicial de la leche es fundamental para conseguir la gelificación de ésta a tiempos más cortos. Auty y col. (2005) reportan en sus estudios que existe una relación directa entre la fuerza iónica y las variaciones de pH desde el inicio de la acidificación. Estos autores encontraron que en los geles de caseína micelar (5% p/p) acidificados con GDL a 40 °C y ajustados a un pH inicial de 7, aquéllos preparados en agua desionizada comparados a los hechos en soluciones ultrafiltradas de leche libres de lactosa y conteniendo 40, 70, 100 o 200% de las sales normalmente presentes en la leche; el pH en el punto de gelificación es más bajo mientras mayor sea la concentración de sales, y los resultados indican que el pH al cual la gelificación inicia puede variar de ~6.6 a 4.77, dependiendo de la concentración inicial de sal en la fase continua.

Lucey y col. (1997a), encontraron que en soluciones de caseinato de sodio (3% p/p), la adición de NaCl (0.12M), redujo el pH inicial de la solución e incrementó ligeramente el pH final del gel, independientemente de la temperatura de gelificación (20, 30 ó 40° C) y concentración de GDL (0.517% ó 0.376%). La adición de NaCl prolongó el tiempo requerido para la formación del gel y resultó en un ritmo inicial más lento del incremento de G'. Estos geles no recibieron ningún tratamiento térmico previo. El pH de gelificación fue más bajo, ~5.0, en los geles con NaCl adicionado, comparados con los geles sin NaCl, pH ~ 5.1. Un valor similar de pH (~5.0) fue reportado por Roefs y van Vliet (1990) y por Kym y Kinsella (1989) para la gelificación de la leche no sometida a tratamiento térmico previo y donde la temperatura de acidificación no afectó el pH de gelificación.

La figura 4.2-2 muestra la cinética de evolución de pH durante la gelificación de los sistemas estudiados en este trabajo, los cuales presentan valores iniciales de pH más bajos a medida que se incrementa la fuerza iónica. Este comportamiento coincide con lo observado por Lucey et al (1997a), al comparar los sistemas carentes de gelatina la adición de CaCl<sub>2</sub> parece amortiguar el efecto del GDL y se obtienen valores finales de pH más altos en SG que en LL. Sin embargo, nuestros

resultados no coinciden con los obtenidos por Auty (2005) en el sentido de que al aumentar la fuerza iónica de la fase continua, el pH al inicio de la gelificación es más bajo. Tampoco coinciden con Lucey y col (1997a) en que los valores finales de  $G'$  de los geles de leche ácida sean más bajos a fuerza iónica más alta; al menos no entre los sistemas carentes de gelatina (LL y SG). Cabe resaltar que en los experimentos de estos investigadores las dispersiones de leche no recibieron tratamiento térmico previo a su gelificación.

Lucey y col. (1998b) observaron que el tratamiento térmico en la leche reduce el tiempo de gelificación e incrementa el pH en el punto de gelificación durante la formación de geles de leche ácida. Esto se atribuye a que el tratamiento térmico de la leche causa desnaturalización de las proteínas del suero, generando agregados que actúan como puentes entre las partículas de caseína, resultando en un incremento en el número y fuerza de los enlaces proteína-proteína en geles ácidos de leche. Las proteínas de suero desnaturalizadas tienen valores de pH en el punto isoeléctrico (pI) más altos que las caseínas. El punto isoeléctrico de la principal proteína del suero,  $\beta$ - lactoglobulina, es  $\sim 5.3$ . Así, se esperaría que la agregación de caseínas en la leche comience a un pH más alto que en la leche sin calentar. En los trabajos de Lucey y col. (1998b) se reporta que en geles ácidos de leche elaborados con leche sin ningún tratamiento térmico previo se determinó un pH de gelificación de  $\sim 4.9$ , mientras que en la leche calentada a temperaturas  $\geq 80$  °C por 30 minutos se observó la gelificación a  $\text{pH} \geq 5.3$ .

Lucey y Singh (2003) han reportado que la razón de cambio de pH en la leche durante la fermentación o la adición del acidulante es controlada por las propiedades amortiguadoras de la leche y que durante la acidificación de ésta los principales cambios físico-químicos que conllevan a la gelificación suceden especialmente en el intervalo de pH de 5.5 a 5.0. Estos cambios físico-químicos son los principales responsables de las características viscoelásticas de los geles ácidos de leche. En el sistema SG parecen ocurrir poco antes de 5.5, alrededor de 5.8, quizá 3 mM de  $\text{CaCl}_2$  además de ser una cantidad suficiente para amortiguar

la caída de pH es una cantidad basta para acelerar los cambios físico-químicos de las micelas de caseína.

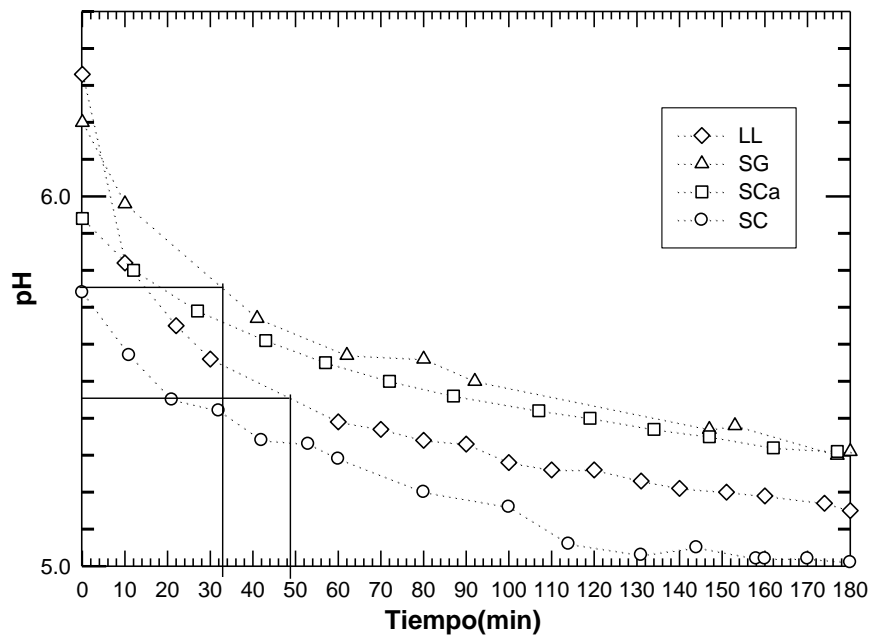


Figura 4.2-2 Cinéticas de pH durante la acidificación y gelificación de leche rehidratada y descremada, en ausencia (LL, SG) y presencia de 0.05% gelana (SCa, SC). Las líneas indican el punto de gelificación para los tratamientos carentes de gelana. Determinaciones realizadas a 38 °C. LL (leche, 1% GDL), SG (Leche, 1% GDL, 3 mM CaCl<sub>2</sub>), SCa (leche, 1% GDL, 0.05% gelana), SC (leche, 1% GDL, 0.05% gelana, 3 mM CaCl<sub>2</sub>).

Walstra y col. (1999), han reportado que el pseudo-equilibrio de las micelas de la leche y sus alrededores depende de factores como la temperatura, pH y actividad del ión calcio ( $\alpha_{Ca^{2+}}$ ), resultando, según sea el caso, un proceso continuo de agregación y desintegración de micelas.

Por otro lado también mencionan que un exceso de iones Ca<sup>2+</sup> mejora las posibilidades de formación de puentes de calcio, con lo que se disminuye la carga de las micelas e incrementa la sobresaturación con respecto al fosfato de calcio en el suero lácteo; esto último causaría la formación de fosfato coloidal adicional, lo cual podría causar la fusión de las micelas. En otras palabras, si una gran cantidad de fosfato de calcio coloidal es depositado en la micela, la repulsión estérica se supera, induciendo a la agregación de éstas. Estos mismos autores mencionan que en la leche no toda la caseína está formando micelas, sino que existe una

porción que se encuentra como caseínas y submicelas libres en el suero de leche. Bajo este esquema, es posible especular que 3 mM de  $\text{CaCl}_2$  en el sistema SG examinado en el presente trabajo, fue suficiente para conseguir un incremento de los puentes de calcio entre las caseínas de la leche y lograr con esto una gelificación en menor tiempo con relación al sistema LL. A la temperatura de gelificación ( $38^\circ \text{C}$ ) evaluada en este estudio, posiblemente se generen uniones por puentes de calcio entre las caseínas y submicelas libres (e incluso entre las micelas ya formadas) y conseguir una mayor formación o agregación de micelas de caseína a pH más alto. Posiblemente, mientras se reduce el pH de la leche, la actividad del ion  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta aún más y el fosfato de calcio disuelto tenderá a formar fosfato de calcio coloidal por causa del exceso presente en la leche, dando lugar a una agregación micelar cada vez más acentuada. Aunque experimentalmente no cuantificamos la actividad de ion calcio, podemos intuir que la formación de un mayor número de puentes de calcio entre las proteínas lácteas es el factor responsable de obtener valores más altos de  $G'$  en el sistema SG que en el sistema LL, ya que el primero presenta un excedente de calcio.

La relación entre la concentración de caseína de las dispersiones y la concentración salina del medio acuoso es importante, dado que esta relación determina los niveles de disociación de la caseína o la cinética de pérdida de la carga neta micelar. Auty y col. (2005), reportan que el pK es un buen parámetro que relaciona la estabilización-desestabilización estérica efectiva de las caseínas. Estos autores afirman que el proceso de gelificación de las proteínas de la leche por efecto de la acidificación con glucono-delta-lactona (GDL) puede describirse en dos etapas, las cuales parecen estar influenciadas por la capacidad amortiguadora del fosfato de calcio micelar/coloidal y la fuerza iónica de la fase acuosa. En la primera etapa ocurre la hidrólisis del GDL para producir 10-12  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}^+$  libre (pH 5.0-4.9). En la segunda etapa existe una hidrólisis posterior del GDL para finalmente producir 30  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}^+$  libre (pH 4.6). Si el punto de gelificación ocurre a concentraciones de  $\text{H}^+$  libre  $< 3.5 \mu\text{mol}$  ( $> \text{pH } 5.5$ ), la disolución subsiguiente del fosfato de calcio coloidal debe incrementar la concentración

iónica de la fase acuosa y acentuar el efecto de neutralización de carga debido a la continua acidificación. Dado que la concentración de GDL en los sistemas evaluados en este estudio no fue suficiente para alcanzar un pH de 4.6 durante 3 horas a 38 °C y considerando que el pH de gelificación en el sistema SG es 5.75, se puede conjeturar que durante el segundo periodo de hidrólisis del GDL, la disolución subsiguiente del fosfato de calcio coloidal induce a una concentración iónica del medio acuoso más alta que favorece el efecto de neutralización de carga ante los iones  $H^+$  progresivamente cedidos al medio. De este modo, puede ser posible a su vez, que la mayor cantidad de iones  $Ca^{2+}$  y  $Cl^-$  cedidos al medio acuoso a partir de 3 mM de  $CaCl_2$  favorezca el efecto de neutralización de carga; esta acción amortiguadora permite conseguir un pH final (5.31) mayor que cuando no se agrega  $CaCl_2$  (5.15, sistema LL. Ver cuadro 4.2-1). Walstra y col (1999) describen que durante la adicional disminución del pH de la leche ( $pH < 5.25$ ), la carga negativa de la micela de caseína incrementa otra vez, debido a la disociación del fosfato de calcio coloidal y eventualmente disminuye otra vez, debido a su asociación con los iones hidrógeno liberados. A pH todavía más bajo la caseína llega a presentar carga positiva. Hasta el momento podemos deducir que la presencia de  $CaCl_2$ -3 mM en la leche es suficiente para generar un aumento en la agregación de las proteínas de la leche durante su acidificación por efecto de “puenteo” con calcio, y además, es una cantidad suficiente para reducir el tiempo de gelificación y obtener valores mayores de  $G'$ .

Al comparar entre si los sistemas en presencia de gelana: SCa, SC; el efecto de la fuerza iónica parece ajustarse mejor a las observaciones de Lucey y Auty anteriormente mencionadas, donde los valores más altos de  $G'$  se obtienen a fuerza iónica más baja. La concentración iónica total en la leche y la naturaleza de los iones presentes determina la temperatura conformacional y de transición sol-gel de gelana. Concentraciones altas de gelana o la presencia de iones divalentes en soluciones de gelana dan lugar a que la transición conformacional (hebra aleatoria-cadena ordenada) y la transición sol-gel ocurran simultáneamente o en un intervalo de temperatura muy corto (Miyoshi y Nishinari, 1999). De acuerdo a

los resultados obtenidos por Pérez-Campos (2008), la temperatura de transición sol-gel de gelana se incrementa al aumentar la concentración iónica total del medio acuoso. Esto explica porqué en los geles ácidos de leche en presencia de gelana el módulo elástico es más alto que el módulo viscoso desde el inicio de la acidificación (figura 4.2-1). La carga iónica de la leche promueve la asociación cadena-cadena en gelana aún cuando la temperatura es 38 °C, a medida que el pH de la leche disminuye por el efecto de la hidrólisis de GDL, se incrementa la concentración de calcio disuelto en la fase acuosa, favoreciendo tanto el entrecruzamiento gelana-gelana como la asociación de micelas de caseína a través de puentes de calcio. Los resultados de este trabajo muestran que el polisacárido gelana es capaz de gelificar en la fase acuosa de la leche cuando ésta se acidifica, y mantener una gelificación estable hasta valores de pH ~5.0. Los geles de gelana son estables sobre un amplio intervalo de pH del medio: 3.5 a 8 (Rodríguez-Hernandez, 2004; Sosa-Herrera, 2008).

En general las cinéticas de gelificación de la leche en presencia de gelana presentaron valores de pH más bajos que los sistemas carentes de este polisacárido; mientras el GDL dona iones  $H^+$  al medio se acentúa el intercambio iónico entre los compuestos iónicos presentes, estos intercambios en presencia de gelana parecen favorecer, en general, la reducción del pH.

La gelana puede interactuar con iones monovalentes y divalentes pero su preferencia iónica depende principalmente del potencial iónico del catión hidratado (Pérez-Campos, 2008). En este contexto, es posible que la gelana prefiera enlazarse o formar puentes salinos ( $COO^-$ -catión $^+$ - agua-catión $^+$ - $COO^-$ , en el caso de cationes monovalentes; y  $COO^-$ -catión $^{++}$ -  $COO^-$  con cationes divalentes) con  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  e  $H^+$  ya presentes en el medio acuoso de la leche, antes que con los iones  $H^+$  que están siendo donados al medio durante la hidrólisis de GDL; por lo que al disminuir progresivamente el pH de la leche, la concentración de iones  $H^+$  en solución se en relación a la concentración de otros iones disueltos,

puesto que éstos últimos presentan mayor actividad iónica con gelana y la leche; lo cual permite obtener valores de pH menores de los sistemas con gelana.

Cuando gelana está ausente, como es el caso de los sistemas LL y SG, los iones  $H^+$  cedidos por el GDL interactúan con los grupos ácidos y básicos de las caseínas, reduciendo la carga neta de las micelas de caseína mientras el pH disminuye y la actividad del ion calcio aumenta al asociarse también con los grupos aniónicos de las proteínas. El calcio sustituye al fosfato de calcio hasta cierto grado. De ese modo, mientras se incorporan iones hidrógeno al medio, una gran parte de ellos se relaciona directamente con proteínas e iones calcio.

Anteriormente se dedujo que en el sistema SG, 3 mM de  $CaCl_2$  fueron suficientes para amortiguar los cambios de pH durante la acidificación. En los sistemas con gelana la presencia de 3 mM de  $CaCl_2$  parece inducir el efecto contrario. La gelana es un polisacárido aniónico que presenta una alta afinidad por el calcio al igual que las caseínas hidrofóbicas, 3 mM de  $CaCl_2$  parece ser suficiente para acentuar los puentes gelana-calcio. En ausencia de 3 mM de  $CaCl_2$  el carácter aniónico de gelana es mayor, por lo que probablemente amortigue la acidez del medio mientras sus uniones con calcio pudiesen disminuir; esto permite menor reacomodo macromolecular y como consecuencia un carácter rígido más acentuado al finalizar la gelificación ( $G'$  se incrementa). Mientras que en el sistema completo SC, los reacomodos macromoleculares son más persistentes hasta el final de la gelificación de tal forma que el carácter rígido se reduce ligeramente ( $G'$  disminuye) en comparación con el sistema SCa, aunque los valores están en el mismo orden de magnitud y el tiempo de estabilización entre los dos sistemas con gelana es prácticamente el mismo, lo cual indica que estos reacomodos macromoleculares adicionales en SC pudieran no ser significativos en cuanto a fortaleza del gel y reducción de sinéresis se refiere (resultados que se discutirán posteriormente).



Auty y col. (2005) afirman que aunque la caseína es la proteína dominante en la leche bovina, su habilidad para formar geles fuertes durante la acidificación de la leche a su punto isoeléctrico (pH 4.6) es limitada. Se ha reportado (Lucey y col. 1997) que el valor final de  $G'$  para geles ácidos de caseinato de sodio acidificados con GDL a 40 °C, sin ser sometidos a un tratamiento térmico previo a la gelificación, oscila entre valores menores a los 20 Pa. Nuestros resultados muestran que en geles de leche descremada, acidificados a 38 °C y con un tratamiento térmico previo a la gelificación (de 90 °C durante 10 minutos),  $G'$  oscila entre  $27\pm 3.5$  Pa (sistema LL) y  $37\pm 2.7$  Pa (sistema SG). No obstante, en presencia de gelana este valor se incrementa a  $61.6\pm 3.4$  (en SC) y  $69.9\pm 1.4$  (en SCa) Pa. La fortaleza y estabilidad de los geles generados pueden ser evaluadas a partir de la dependencia de sus módulos viscoelásticos con la frecuencia de oscilación o tiempo de observación (espectro mecánico dinámico), como se muestra en las figuras de la siguiente sección. Estos gráficos dan evidencia del comportamiento viscoelástico de nuestros sistemas y su caracterización como geles fuertes o débiles.

### **4.3 PROPIEDADES VISCOELÁSTICAS DE GELES ÁCIDOS DE LECHE**

En la figura 4.3-1 se presentan los espectros mecánicos dinámicos de geles ácidos de leche carentes de gelana. Se observa el comportamiento viscoelástico de los geles una vez concluida la acidificación ( $T=38$  °C) y cuando éstos se enfrían a 10 °C. En ambos casos se observa que  $G' > G''$ , lo cual indica un carácter sólido que predomina sobre el carácter viscoso, como se espera en un sistema gelificado.

Es evidente también una dependencia de ambos módulos viscoelásticos con la frecuencia, misma que se observa aún a 10 °C. Esta dependencia indica que la estructura del gel no es estable con el tiempo, al aumentar el tiempo de observación (frecuencias bajas de oscilación) el carácter sólido disminuye. Este

tipo de sistemas se denominan “geles débiles” o “geles suaves”, y se caracterizan por tener valores de tangente de delta (parámetro que indica el cociente: carácter viscoso/carácter elástico) superiores a 0.1 (Doublier y Cuvelier, 1996). En los 4 sistemas estudiados se observó una dependencia ligera de  $G'$  con la frecuencia (cuadro 4.3-1), la cual disminuyó al enfriar los sistemas, adicional a esto se obtuvieron valores de  $\tan \delta$  inferiores en los sistemas evaluados a  $10^\circ\text{C}$  con respecto a  $38^\circ\text{C}$  (cuadro 4.3-2). Comparando los valores de  $\tan \delta$  y la dependencia de  $G'$  con la frecuencia en los sistemas LL y SG, se observa que la adición de  $\text{CaCl}_2$  fortalece ligeramente los geles.

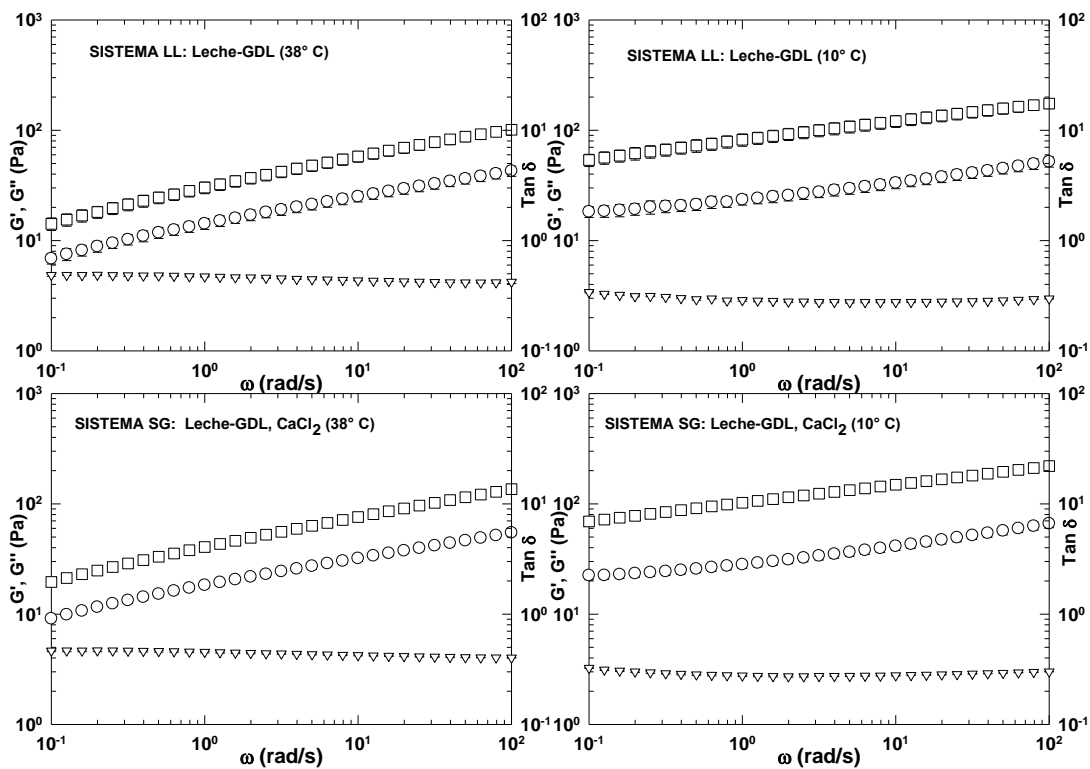


Figura 4.3-1 Módulo de almacenamiento ( $G'$ ), módulo de pérdida ( $G''$ ) y  $\tan \delta$  ( $\equiv G''/G'$ ) en función de la frecuencia.  $G'$  cuadrados,  $G''$  círculos,  $\tan \delta$  triángulos invertidos. Se registran los valores promedios de dos determinaciones y su desviación estándar.

Cuadro 4.3-1 Valores de n de la relación  $G' \propto \omega^n$  en los distintos sistemas evaluados

<b>G' vs <math>\omega^n</math></b>				
	<b>LL</b>	<b>SG</b>	<b>SCa</b>	<b>SC</b>
<b>n (38° C)</b>	0.2837 ( $r^2=0.9970$ )	0.2770 ( $r^2=0.9980$ )	0.1121 ( $r^2=0.9982$ )	0.1160 ( $r^2=0.9981$ )
<b>n (10° C)</b>	0.1703 ( $r^2=0.9999$ )	0.1659 ( $r^2=0.9999$ )	0.0700 ( $r^2=0.9927$ )	0.0751 ( $r^2=0.9918$ )

NOTA: n= pendiente de  $G'$  en función de la frecuencia en gráficas log-log (figuras 4.3-1, 4.3-2).

La figura 4.3-2 muestra el comportamiento viscoelástico de los geles que contienen gelatina. En comparación con los espectros de la figura 4.3-1, estos presentan una menor dependencia de los módulos con los tiempos de observación (cuadro 4.3-2) y una mayor separación entre las tendencias elástica y viscosa, es decir los valores de  $\tan \delta$  disminuyen. En el sistema SCa a 10 °C y frecuencias bajas se observan valores  $\tan \delta \approx 0.1$ ; sin embargo, este parámetro aumenta ligeramente al aumentar la frecuencia de oscilación (valores promedio de  $\tan \delta$ : 0.11 a 0.17), lo cual indica que el gel tiende a fluir o a relajar sus esfuerzos cuando se somete a frecuencias altas de oscilación o bien a tiempos cortos de observación. Es importante mencionar que en este sistema se obtuvieron los valores más altos de  $G'$ . Con respecto al sistema SC a 10° C, aunque se observa el mismo comportamiento viscoelástico que en el sistema SCa, los valores de  $\tan \delta$  son ligeramente superiores (valores promedio de  $\tan \delta$ : 0.13 a 0.20) y existe una dependencia ligeramente mayor con el tiempo de observación (cuadro 4.3-2). Esto evidencia que SCa y SC son sistemas reológicamente similares, cuya diferencia en  $G'$  y  $\tan \delta$  puede ser estadísticamente significativa.

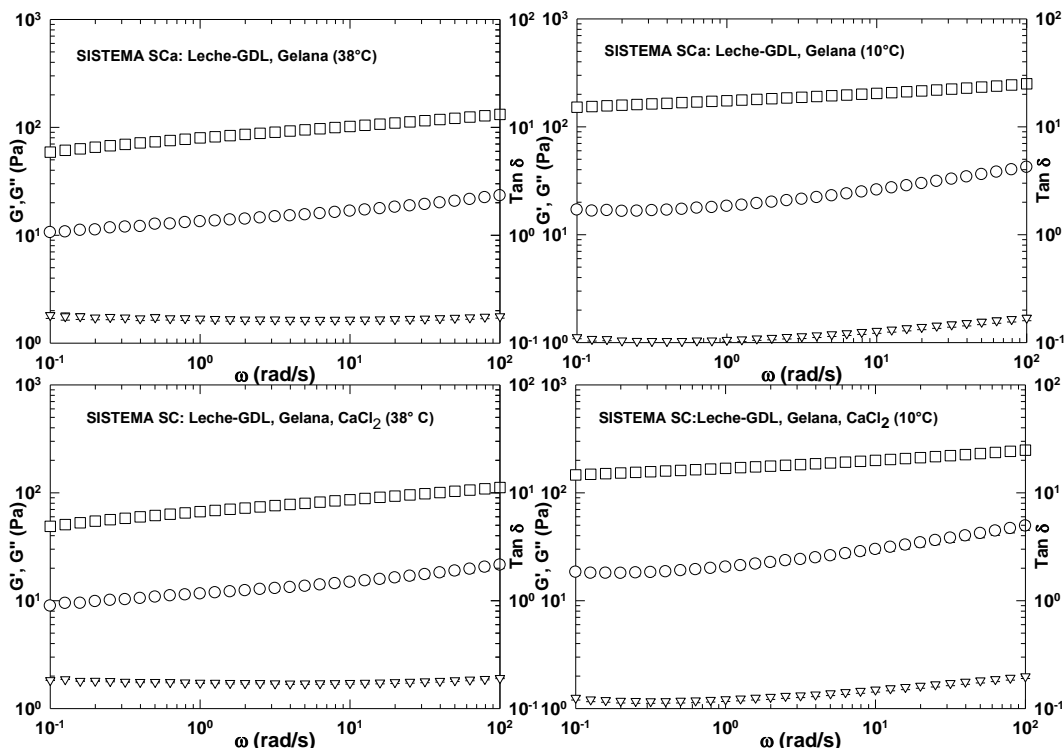


Figura 4.3-2 Espectros de los módulos elásticos y Tan  $\delta$  en función de la frecuencia.  $G'$  cuadrados,  $G''$  círculos, Tan  $\delta$  triángulos invertidos. Se registran los valores promedios y su desviación estándar.

Cuadro 4.3-2 Valores promedio de tangente de delta de geles ácidos de leche.

	<b>LL</b>		<b>SG</b>	
	$\omega=0.1$ rad/s	$\omega=100$ rad/s	$\omega=0.1$ rad/s	$\omega=100$ rad/s
38° C	0.49±0.01	0.30±0.01	0.47±0.008	0.40±0.001
10° C	0.34±0.005	0.42±0.002	0.32±0.003	0.30±0.0002
	<b>SCa</b>		<b>SC</b>	
	$\omega=0.1$ (rad/s)	$\omega=100$ (rad/s)	$\omega=0.1$ (rad/s)	$\omega=100$ (rad/s)
38° C	0.18±0.01	0.18±0.007	0.18±0.001	0.19±0.001
10° C	0.11±0.003	0.17±0.01	0.13±0.005	0.20±0.008

De acuerdo a lo discutido anteriormente, es congruente suponer que en los sistemas con gelana la adición de 3 mM de  $\text{CaCl}_2$  genera iones en exceso, que posiblemente debiliten a la red en lugar de fortalecerla como se esperaría. Existen trabajos de investigación en donde se ha concluido que el exceso de iones calcio genera un descenso en los valores de  $G'$  en geles de gelana debido a una sobresaturación de los sitios aniónicos del polisacárido generando un efecto

competitivo por el agua entre los cationes y los sitios hidrófilos de gelana (Miyoshi y col. 1994; Tang y col. 1996; Miyoshi y Nishinari, 1999). En los geles ácidos de leche este efecto competitivo podría incrementarse por la presencia de caseína que requiere calcio para agregarse; algunos estudios han reportado que en mezclas gelana-caseinato las moléculas de este último son más efectivas para competir por el calcio, interfiriendo en la asociación de las moléculas de gelana (Sosa-Herrera, 2008).

En general, no podemos considerar a los geles en presencia de gelana como “geles fuertes”, pero sí con mayor rigidez comparados con aquellos que carecen del hidrocoloide, tanto a la temperatura de gelificación (38 °C) como a temperatura baja (10° C). Los geles en presencia de gelana son tendentes a ser “geles fuertes” mientras que los geles en ausencia del polisacárido son “geles suaves”. El análisis de varianza realizado en  $G'$  a diferentes frecuencias evidenció que existe diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) entre los sistemas carentes de gelana y aquellos que la contienen. Este mismo análisis indicó que no existe diferencia significativa entre los sistemas SCa y SC a la misma temperatura, es decir la adición de 3 mM de  $\text{CaCl}_2$  a los geles leche-gelana no afecta la rigidez del sistema ( $G'$ ). A través de los resultados de sinéresis se evaluará si la presencia de gelana y de  $\text{CaCl}_2$  afecta la exudación de agua en los geles formados.

En la figura 4.3-3 se presentan los valores promedio de  $\tan \delta$  de los 4 sistemas evaluados. Se realizó un análisis de varianza con comparación de medias de tratamientos de Duncan y un nivel de significación de 5% (cuadro 4-4), el cual demostró que en el intervalo de frecuencia de 0.1 a 100 rad/s existe diferencia significativa de  $\tan \delta$  entre los sistemas con gelana (SCa y SC) a 10 °C.

Por lo tanto a esta temperatura el sistema SCa es un gel más fuerte ( $G'$  mayor) y más elástico ( $\tan \delta$  menor) que el sistema SC, esto probablemente se deba a un exceso de  $\text{CaCl}_2$  que impiden una asociación ordenada de las cadenas de gelana durante el enfriamiento del gel.

Cuadro 4.3-3 Comparación de medias de Duncan de  $\tan \delta$  de los diferentes geles ácidos de leche a 10 °C.

$\omega$ (rad/s)	LL	SG	SCa	SC
0.1000	0.3402 <sup>a</sup>	0.3241 <sup>b</sup>	0.1120 <sup>d</sup>	0.1254 <sup>c</sup>
0.3982	0.2994 <sup>a</sup>	0.2861 <sup>b</sup>	0.1030 <sup>d</sup>	0.1168 <sup>c</sup>
5.0110	0.2747 <sup>a</sup>	0.2742 <sup>a</sup>	0.1190 <sup>b</sup>	0.1382 <sup>c</sup>
100.00	0.2974 <sup>a</sup>	0.3008 <sup>a</sup>	0.1693 <sup>b</sup>	0.1983 <sup>c</sup>

Letras iguales en el mismo renglón no son significativamente diferentes ( $P > 0.05$ ).

De acuerdo a la temperatura de transición sol-gel determinada para gelana (figura 4.1-1) es probable que en los sistemas que contienen gelana, la gelificación de ésta se inicie a 38 °C por la carga iónica imperante en la leche, pero al disminuir la temperatura de los sistemas, adicional a la acidificación y liberación de calcio (aspectos discutido anteriormente), se promueve la asociación cadena-cadena de gelana generando geles más elásticos. Sin embargo, durante el enfriamiento los “reacomodos” estructurales de los sistemas leche-gelana se favorecen generando sistemas con diferentes propiedades elásticas, como se observa en la figura 4-4. Probablemente cuando se dispersa gelana en  $\text{CaCl}_2$  desde el inicio de la elaboración de las mezclas gelana-leche, se generen interacciones gelana-agua y gelana-calcio más eficientes que cuando la gelana se dispersa sólo en leche. Esto da lugar a geles leche-gelana con mayores reacomodos estructurales que propician redes de gelana más organizadas que mantienen inmovilizadas a las partículas de caseína, evitando su contracción durante el envejecimiento del gel y por lo tanto disminuyendo la exudación de agua del sistema, lo cual se evaluará en las determinaciones de sinéresis.

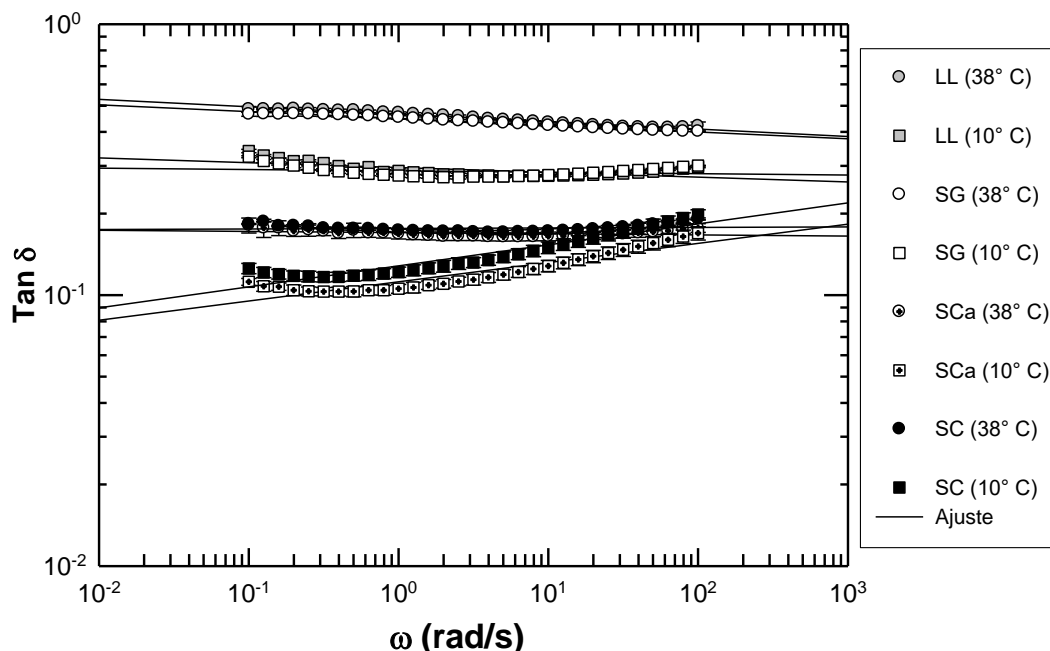


Figura 4.3-3 Valores de Tan  $\delta$  en función de la frecuencia de geles ácidos de leche. LL (leche, 1% GDL), SG (Leche, 1% GDL, 3 mM  $\text{CaCl}_2$ ), SCa (leche, 1% GDL, 0.05% gelana), SC (leche, 1% GDL, 0.05% gelana, 3 mM  $\text{CaCl}_2$ ). Valores promedio con su desviación estándar.

Algunos autores han observado un ligero incremento de tangente de delta a partir de frecuencias de 1 Hz en geles de leche acidificada a 40 °C (Lucey y col. 1997), lo cual lo han interpretado como un incremento en el número de “reacomodos” de la red de caseína. La formación de geles ácidos de leche implica una dinámica de formación de interacciones intermoleculares que resultan en una estructura emergente diferente a la de la leche fluida. Estas estructuras emergentes una vez formadas (e incluso durante su formación) pueden “reacomodarse” y presentar cambios importantes en lo que a fortaleza y contracción del gel se refiere, lo cual está directamente relacionado con la sinéresis de los geles. Las estructuras emergentes serán discutidas posteriormente a partir de su visualización microscópica, por el momento, es importante conocer la naturaleza de esos reacomodos y sus consecuencias.

Lucey y col. (1997, 1998, 2001), mencionan que en geles ácidos de leche la presión endógena (la cual causa sinéresis espontánea) es debida a la tendencia de la red de caseína a reacomodarse después de su formación.

Estos autores mencionan que una sinéresis ligera puede ser causada por la continua fusión de los agregados de caseína, es decir un incremento progresivo en el número de zonas de unión, lo cual propicia contracción de las hebras de la red de caseína. En general los “reacomodos” son movimientos que implican transformación de la energía de enlace entre los iones y moléculas involucradas; que a su vez resulta en consecuencias de fortalecimiento-contracción de la red, permitiendo en la mayoría de los geles ácidos de leche, la exudación de agua. Estos movimientos en la red se distinguen cuando tan  $\delta$  aumenta después de haber conseguido valores pequeños, es decir, cuando el carácter viscoso se recupera ligeramente. Hay algunas consideraciones que Lucey y col. (2001) han sugerido, para generalizar los casos en los que puede presentarse contracción y sinéresis en geles ácidos de leche, éstas se resumen en el cuadro 1.8-2. Estas consideraciones son el resultado de investigar los efectos del tratamiento térmico, temperatura de gelificación, pH, concentración de sales y GDL, que reciben soluciones de caseinato de sodio y leche en polvo reconstituida para formar geles ácidos.

Retomando la discusión de los resultados, la disminución de la temperatura desde 38 °C hasta 10 °C en los geles ácidos de leche que contienen gelana, fue suficiente para causar un aumento en tan  $\delta$  a frecuencias altas, debido a un mayor número de reacomodos en la red de gel. Estos reacomodos favorecen el fortalecimiento de los geles, debido a que la disminución de la temperatura genera un aumento en el hinchamiento de las partículas de caseína, dando lugar a una deformación de estas partículas, haciendo zonas de unión más grandes entre ellas o incrementando la tortuosidad de las hebras en la red. Las zonas de unión más grandes propician valores de G' mayores, mientras una tortuosidad más grande probablemente causaría poca diferencia (Lucey y col.1997). Esto significa que al reducir la energía cinética de las partículas de agua por disminución de la temperatura, pueden ser mejor retenidas y causar un aumento en el volumen de las caseínas mientras se favorece la tortuosidad de la red, causando un mayor efecto de inmovilización de agua.



Sin embargo, este efecto puede ser contraproducente si se genera una presión endógena. Es probable que la generación de sinéresis espontánea por presión endógena depende de la capacidad de asociación de las macromoléculas (caseína, gelana) con el agua. Es decir, si predominan asociaciones hidrofóbicas entre caseínas generando que éstas disminuyan su voluminosidad, se favorecerá la sinéresis, mientras que si predominan las asociaciones hidrofílicas se favorece la retención de agua contrarrestando la presión endógena de la red y por lo tanto disminuyendo la sinéresis espontánea. En la figura 4.3-3 se observa que en el sistema SC la magnitud de  $\tan \delta$  a 10 °C fue mayor que en el sistema SCa, lo cual denota mayores “reacomodos” macromoleculares y por lo tanto su capacidad de retención de agua del gel debe ser mayor. Esta capacidad se reflejará en la estabilidad del gel ante la exudación de agua (sinéresis).

#### **4.4 SINÉRESIS DE GELES ÁCIDOS DE LECHE**

En la figura 4.4-1 se muestran los datos de sinéresis espontánea de los geles ácidos de leche durante 16 días. No se observó ninguna tendencia, ni ascendente ni descendente, en todos los sistemas a lo largo de la evaluación. Es difícil determinar el efecto de gelana y  $\text{CaCl}_2$  en la sinéresis de los geles. Sin embargo, se puede afirmar que los sistemas en presencia del polisacárido fueron más estables a través del tiempo, pues presentaron porcentajes de sinéresis con menor dispersión y los valores más bajos en el día 16; mientras que la sinéresis de los sistemas carentes del polisacárido fue superior y con mayor dispersión.

Es importante mencionar que durante las determinaciones de sinéresis, se pudo percatar que los geles sin el hidrocoloide sufrieron contracción y se despegaban de las paredes del matraz al momento de retirar la cantidad de agua superficial (por ejemplo, el sistema SG al día 12) por lo que para las siguientes mediciones se procuró retirar la mayor cantidad de agua posible sin despegarlo de las paredes del matraz, aunque una pequeña cantidad de agua parecía estar atrapada entre el

matraz y el gel. Es probable que este error experimental haya sido la causa de observar valores tan dispersos en estos sistemas.

Por otro lado, los geles que contenían gelana aparentaron ser más rígidos y con mayor adherencia a las paredes del matraz, incluso su estabilidad sin fracturarse al invertir el matraz fue evidente. El sistema completo por ejemplo, presentó mayor resistencia a la fractura en el día 16 que el sistema LL. Además este sistema (SC) siempre presentó los porcentajes de sinéresis más bajos.

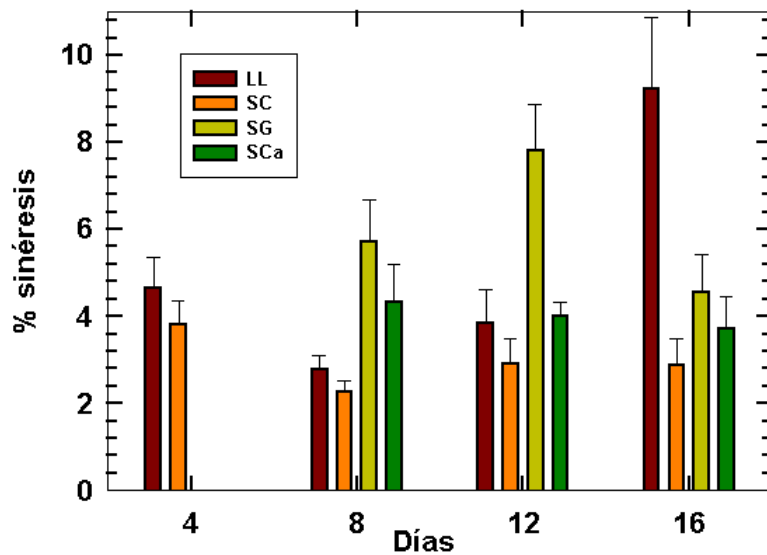


Figura 4.4-1 Cantidad de agua exudada a la superficie de los geles monitoreada cada 4 días durante 16 días.

En general se puede concluir que al término del periodo de observación (16 días):

- La presencia de gelana y  $\text{CaCl}_2$ -3 mM, reduce la sinéresis de los geles de leche ácida hasta en un 68%.
- La presencia de  $\text{CaCl}_2$ -3 mM reduce la sinéresis del gel en el sistema SG hasta en un 50%.
- La presencia de gelana en ausencia de  $\text{CaCl}_2$ -3 mM reduce la exudación de agua en un 59%, por lo que la presencia de gelana es más determinante que la de  $\text{CaCl}_2$ -3 mM en los geles de leche ácida.

Evidentemente, los sistemas que presentaron mayores reacomodos hidrofílicos (sistemas en presencia del polisacárido), generaron geles con los porcentajes de sinéresis más bajos, y al día 16 el reposo de los geles permitió una mayor exudación de agua en el sistema con interacciones más hidrofóbicas (LL). Dado que se esperaba encontrar un mayor porcentaje de sinéresis en SC que en SCa, por su mayor  $\tan \delta$  (ver figura 4.3-3), al día 16 se puede constatar que la presencia de 3 mM de  $\text{CaCl}_2$  permite ligeros reacomodos a favor de una mejor retención de agua, lo cual significa que esta pequeña diferencia en la fuerza iónica no es excesiva como se consideraba. No obstante, la presencia de 3 mM de  $\text{CaCl}_2$  en ausencia de gelatina (sistema SG) también genera buenos resultados ante la sinéresis en el día 16, por lo que es importante resaltar que un aumento en los puentes de Ca-proteína fortalecen la red y contrarrestan la presión endógena generada por los enlaces hidrofóbicos en los geles de leche ácida. Sin embargo, la presencia de gelatina en ausencia de  $\text{CaCl}_2$ -3 mM (sistema SCa) es más determinante que la de  $\text{CaCl}_2$  (sistema SG) como ya fue mencionado.

Se ha reportado que la cantidad de agua exudada en los geles de leche también es función del recipiente en el cual gelifican (Lucey y col.1997), determinándose mayor proporción de sinéresis en geles de leche elaborados en cajas petri comparando con los elaborados en matraces volumétricos, lo cual se atribuye a una mayor área superficial gelificada donde el suero escapa más fácilmente desde los poros de la superficie del gel. Sin embargo, también se ha observado que las paredes inclinadas de los matraces volumétricos favorecen la exudación de suero hacia la superficie, puesto que éstas ejercen una mayor presión al gel (Lucey y col. 2001). En los sistemas gelificados estudiados en este trabajo, las paredes ligeramente inclinadas de los matraces utilizados deben también influir en la separación del suero de los geles, permitiendo una mayor contracción del gel en las zonas cercanas a éstas. Por lo tanto, estas consideraciones se deben tomar en cuenta para el diseño de empaque de los geles ácidos de leche. Es decir se debe contemplar envases con diámetros pequeños y poca inclinación en sus paredes.

En concreto, para que la sinéresis de geles ácidos de leche ocurra debe existir una combinación de diversos factores (Lucey, 2001; Lucey 2004):

- Alta temperatura de incubación (por ejemplo, 45 °C comparado con 30 °C)
- Rápida proporción de acidificación (por ejemplo, glucono- $\delta$ -lactona en lugar de cultivos iniciadores)
- Bajo contenido total de sólidos (especialmente proteínas pero también grasa, si la leche es homogenizada)
- Leche no homogenizada, sobre todo si se trata de leche entera o enriquecida con grasa butírica y otros agentes estabilizantes o sólidos adicionados.
- Baja producción de ácido (por ejemplo, pH 4.9 comparado con 4.6)
- Geles elaborados con leche sin calentar.
- Contenedores con paredes inclinadas
- Agitación durante la gelificación (por ejemplo, movimiento mientras el gel es débil aún)

La tendencia a la sinéresis de los geles ácidos de leche se manifiesta en un valor bajo de  $G'$  (<20 Pa) o un esfuerzo de fractura bajo, un incremento en la tangente de delta durante la gelificación, apariencia de poros grandes en la red gelificada (Lucey 2001).

Los geles ácidos de leche de este trabajo presentaron módulos de almacenamiento mayores a 20 Pa y los valores de sinéresis oscilan entre el 2 y el 10% p/v. Se puede sugerir que el tratamiento térmico previo a la leche (90 °C durante 10 minutos), el contenido de sólidos (12% p/v leche descremada en polvo) y contenido de GDL, otorgan a los geles buena estabilidad a la sinéresis, la cual se mejora si se adiciona gelana desacidada 0.05% con 3 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Al respecto, se puede añadir que todo aquello que propicie una contracción de la red en geles de leche ácida, a medida que las interacciones de la misma sean más hidrofóbicas, resultará en mayor sinéresis.

#### 4.5 MICROESTRUCTURA DE GELES ÁCIDOS DE LECHE

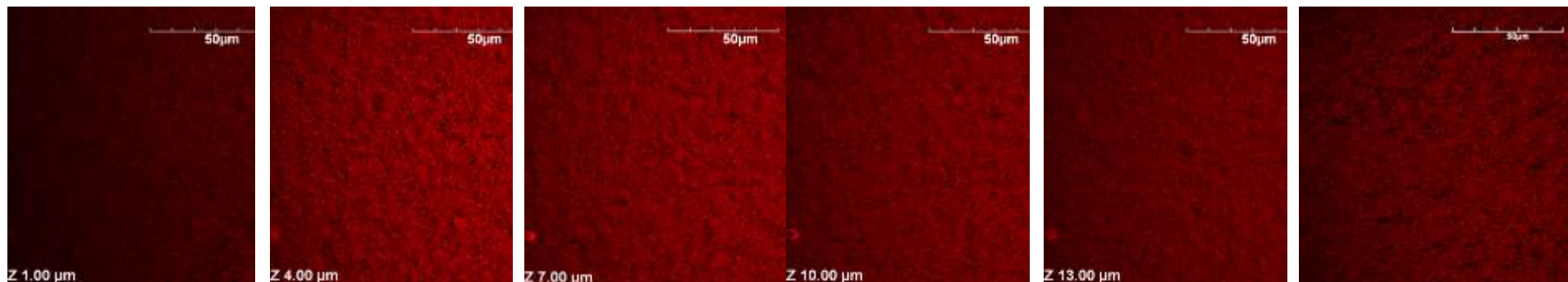
La figura 4.5-1 muestra las microfotografías de gelana 0.05%-3 mM CaCl<sub>2</sub> y geles de leche 12% con 1% de GDL, determinadas por microscopía confocal láser de barrido. Se realizaron observaciones en distintos planos focales a lo largo del eje z, abarcando ≈15 μm, para determinar la organización estructural de las macromoléculas en tres dimensiones.

A escala microscópica, con la técnica usada, no es posible notar las diferencias entre los dos tipos de geles obtenidos, los coloides hidrofílicos de gelana y los hidrofóbicos de los geles de leche. En ambos casos se observa una red continua, aunque en los geles de leche se percibe menor uniformidad que en los geles de gelana, puesto que es posible observar una red “burda” con espacios intersticiales (zonas oscuras) menos uniformes a través del gel. La gelana es polisacárido lineal que forma zonas de unión a través de interacciones COO<sup>-</sup> Cation<sup>++</sup> ·OOC entre cadena-cadena de polisacárido (Sanderson, 1990). La presencia de calcio en las proporciones usadas en este trabajo promueven esta asociación generando redes fuertes que inmovilizan totalmente al agua dando lugar a un comportamiento reológico de gel fuerte como se ha reportado anteriormente para gelana 0.05% con 3 mM CaCl<sub>2</sub> (Pérez-Campos, 2008), lo cual concuerda con la microfotografía de la figura 4.5-1.

Por otra parte, la leche, un coloide hidrofóbico, sólo presenta fuerzas débiles de atracción entre el agua y la superficie de las partículas coloidales. Al interaccionar con el agua, las partículas de caseína que forman geles tipo “agregados robustos” (no propiamente micelas esféricas), requieren mayor volumen en el cual pueden existir diversas cantidades de agua ocasionando poros o espacios intersticiales con tamaños y distribución no homogéneos. El robustecimiento de la red de leche ácida puede ser también consecuencia de las interacciones proteínas sérica-caseína, mismas que se propician por el tratamiento térmico previo de las dispersiones.

En general, la distribución espacial de las moléculas coloidales que conforman al gel (fase dispersora) y su interacción con el agua (fase dispersa) determinan la estructura emergente. Moléculas lineales e interacción hidrofílica resultan en una red de gel uniforme y continua; moléculas robustas e hidrofóbicas, generan geles con una distribución no homogénea de partículas y poros entre ellas.

### Fila (a)



### Fila (b)

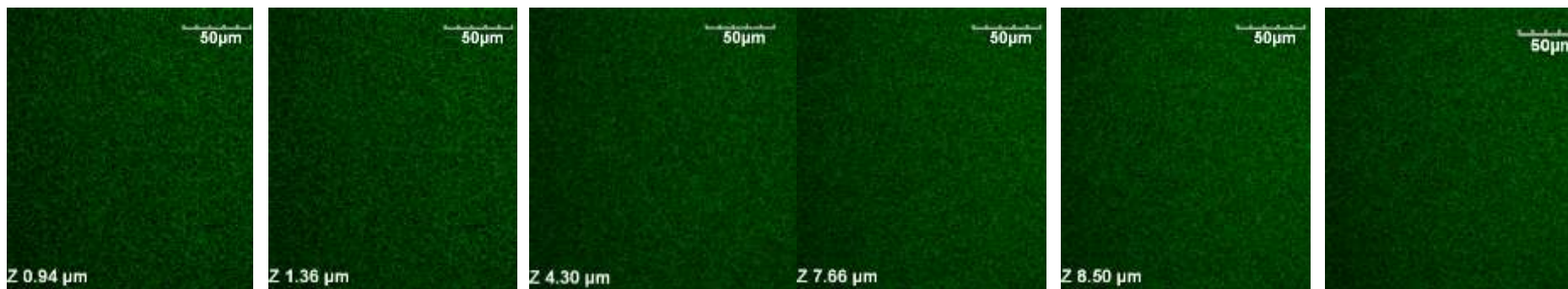


Figura 4.5-1 Microfotografías de geles de leche acidificada y de geles de gelana determinadas por microscopía confocal de barrido láser. Fila (a) sistema LL; Fila (b) Gelana 0.05%, con 3mM de CaCl<sub>2</sub>. Las imágenes presentadas fueron observadas bajo un lente objetivo de 60X y bajo el mismo acercamiento (zoom= x1.0) a través del eje Z en intervalos de ≈3 μm; a temperatura ambiente (≈25° C).

Lucey y col. (1997b, 2001) relacionan el esfuerzo de fractura de los geles ácidos de leche, la capacidad de hinchamiento de las partículas de caseína, “*voluminosidad*” y el tamaño de los espacios intersticiales con la capacidad de los geles de leche para exhibir sinéresis. El efecto de hinchamiento se ve favorecido cuando la temperatura disminuye. La capacidad de hinchamiento de las caseínas, submicelas o micelas depende de la cantidad de agua relacionada directamente con ellas (agua ligada), en específico con la  $\kappa$ -caseína. Una capacidad de hinchamiento alta consigue tamaños de espacios intersticiales pequeños (zonas de contacto más grandes) y por lo tanto mejor retención del agua. Sin embargo, si los reacomodos del gel de leche favorecen a los enlaces hidrofóbicos (mayor presión endógena), o la temperatura aumenta, una gran cantidad de agua puede ser exudada hacia la superficie del gel (sinéresis espontánea).

En la figura 4.5-2 se muestran las microfotografías de geles de leche en presencia de gelana. En 4.5-2 (fila a) se exhibe la red de gel del sistema SC y en las filas b y c de la misma figura, el sistema SCa. En ambos sistemas puede observarse la gelificación de gelana (zonas verdes) y caseína (zonas rojas) coexistiendo en dominios ricos en cada biopolímero. En el sistema SC es evidente una red de caseína más burda que envuelve a las zonas gelificadas de gelana a medida que nuestra observación se desplaza a lo largo del eje z en el mismo plano focal (fila a). Por otra parte, en el sistema SCa la red de gelana parece estar entremezclada con la red de caseína, la cual la cubre a medida que observamos el sistema a lo largo del eje z. Esto último es más evidente en las microfotografías tomadas con lente 10X (fila c). Parece existir una red de gelana que cogelifica para estabilizar la red de partículas de caseína. No se han encontrado estudios de la gelificación de la leche en presencia de gelana. Los estudios existentes de geles ácidos de leche con polisacáridos como  $\kappa$ -carragenina y pectinas han concluido que existe una capa de polisacárido que se adsorbe en la superficie de la micela, mientras que el resto de polisacárido gelifica estabilizando el gel mixto (figura 4.5-3).



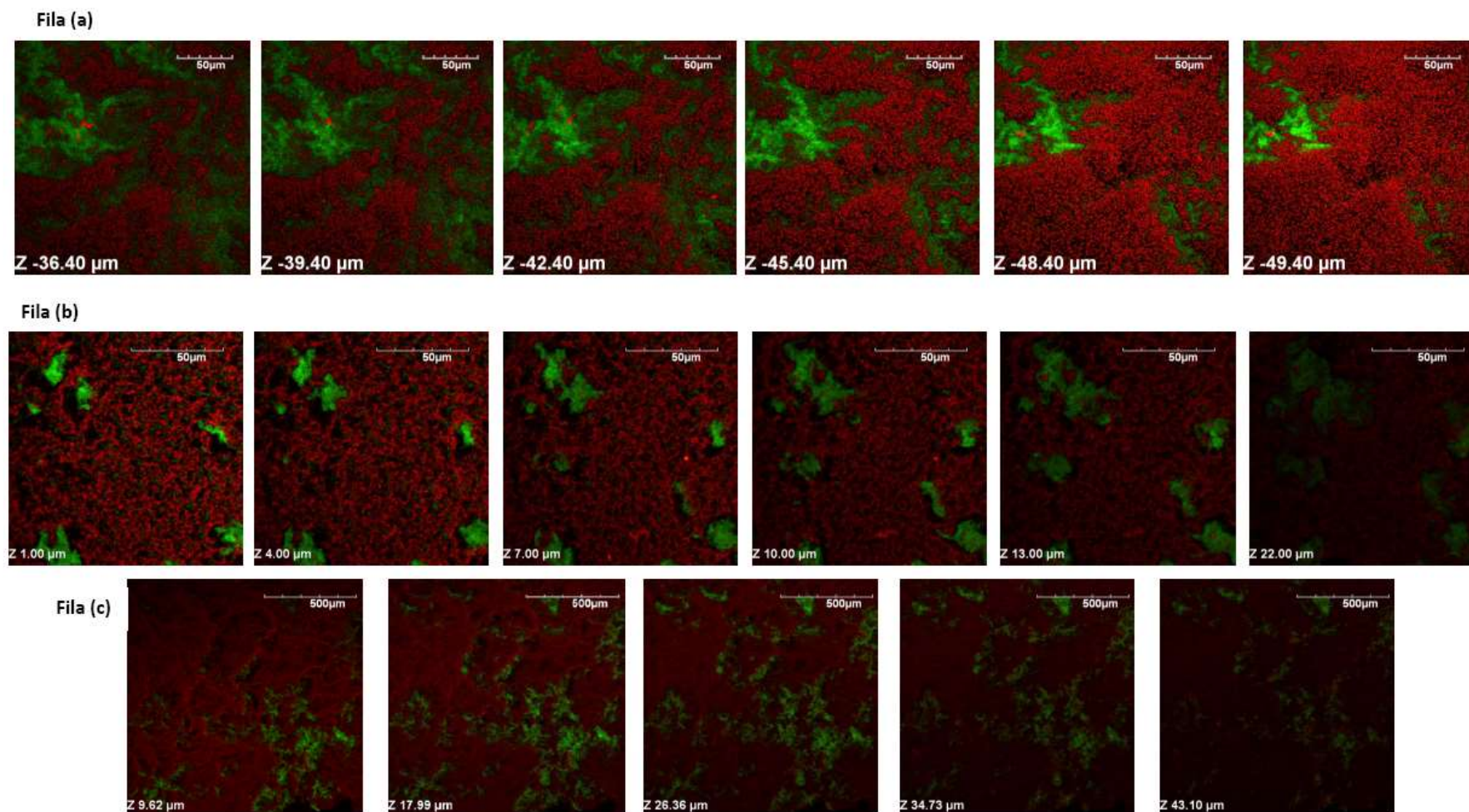


Figura 4.5-2 Microfotografías de geles de leche ácidos en presencia de gelatina determinadas por microscopía confocal de barrido láser. Fila (a) sistema SC, Fila (b) sistema SCa, Fila (c) sistema SCa a 10X. Las imágenes de las Filas (a) y (b) fueron observadas en un lente objetivo de 60X y contienen microfotografías en intervalos de  $\approx 3 \mu\text{m}$  de izquierda a derecha a través del eje Z; la Fila (c) contiene microfotografías observadas en un lente objetivo de 10 X y a través del eje Z en intervalos de  $\approx 8 \mu\text{m}$ . Todas las imágenes se sometieron al mismo acercamiento (zoom= x1.0) y a la misma temperatura de observación ( $\approx 25^\circ \text{C}$ ).

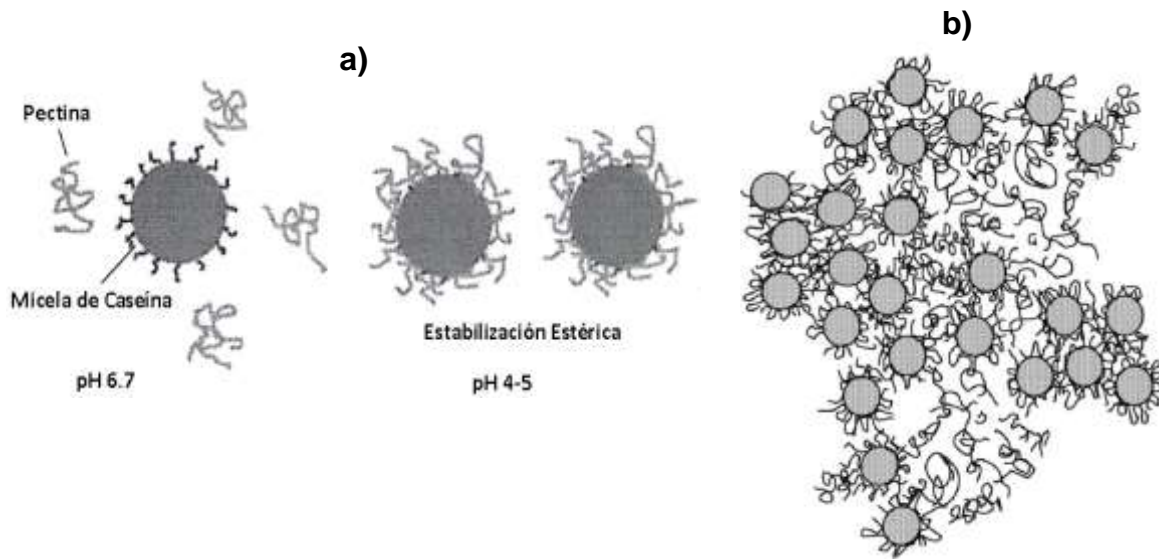


Figura 4.5-3 a) Imagen esquemática de las micelas de caseína cubiertas con moléculas de pectina, las cuales se adsorben para estabilizar estéricamente el sistema conforme el pH disminuye, b) Representación esquemática de la distribución de partículas de caseína (círculos) y pectina (líneas) en leche acidificada y gelificada. Los espacios entre pectina y partículas de proteína están ocupados por la fase acuosa. (Fuente: Tromp y col, 2004 y Ye, 2008).

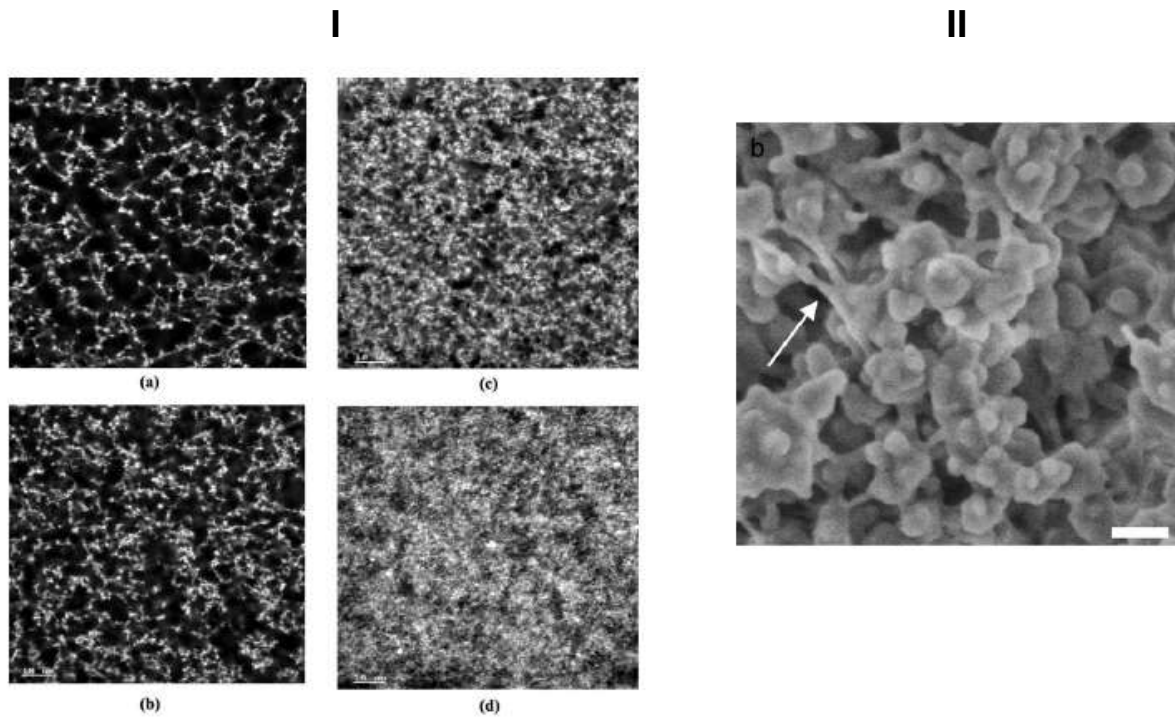


Figura 4.5-4 I. Microscopía confocal de barrido láser de geles de caseinato inducidos por acidificación con glucono delta lactona (2% p/v) después de 6 horas de acidificación (pH=4.0) con diferentes concentraciones de pectina de bajo metoxilo (% p/v): (a) 0; (b) 0.1; (c) 0.4; (d) 0.8. Barra de escala 10  $\mu$ m (Fuente: Latia-Merino y col., 2004). II. Microestructura de agregados caseína-k-carragenina, las flechas indican los filamentos de k-carragenina que unen partículas de caseína formando una red tridimensional en una mezcla formada por leche descremada reconstituida (10.5%) y k-carragenina (0.025%). Técnica de microscopía electrónica de barrido, barra de escala=100 nm (Fuente: Ji y col., 2008).

En la figura 4.5-4 se muestran algunas microfotografías de geles ácidos de leche estabilizados con pectina de bajo metoxilo en donde se visualiza una estructura más homogénea que la observada en los geles de leche-gelana (SC, SCa), parece existir una red de pectina que envuelve y “conecta” a las partículas de caseína, de tal forma que a medida que se incrementa la concentración de pectina parece predominar la red de este polisacárido. Con relación a este sistema, Matia-Merino y col (2004) describen la asociación de este sistema como agregados de proteína en donde la pectina se adsorbe en la superficie interconectando la red de partículas de caseína conforme el pH desciende. Sin embargo, al incrementar la concentración de pectina hay un cambio en la cinética de gelificación del gel mixto, de un gel de caseína inducido por acidificación (a bajas concentraciones de pectina), a un gel de pectina inducido por puentes de calcio (concentraciones de pectina > 0.2%).

Tanto en el sistema SC como en SCa, la organización macromolecular no recuerda a lo reportado en geles de leche ácida estabilizados con pectina (Ye 2008; Matia-Merino y col., 2004) y con  $\kappa$ -carragenina (Martin y col., 2006), a pesar de que gelana tiene un mecanismo de gelificación similar a estos polisacáridos. Probablemente, al dispersar la leche en polvo en las soluciones de gelana, dada la alta fuerza iónica de la leche, gelana comience su transición de estado desordenado (sol) a estado ordenado (gel) durante el enfriamiento de las mezclas desde 90 hasta 38 °C; permitiendo así su gelificación anticipada (aún cuando la temperatura de transición sol-gel de gelana 0.05% con 3 mM CaCl<sub>2</sub> es de 31.44 °C) y de manera independiente a la gelificación de las caseínas, la cual es conseguida lentamente a medida que se reduce el pH del sistema. Esto podría explicar la presencia de dominios “densos” gelificados de gelana en ambos sistemas y el comportamiento reológico durante la cinética de acidificación (figura 4.2-1). Sin embargo, la diferencia en fuerza iónica en SC y SCa genera efectos

diversos tanto en reología como en microestructura que conllevan a diferencias en la estabilidad de los geles.

El sistema SC contiene  $\text{CaCl}_2$  desde el inicio del enfriamiento del gel, el calcio está disponible para la asociación cadena-cadena de gelana independientemente del calcio liberado durante la acidificación de la leche proveniente del fosfato de calcio coloidal de la micela. Posiblemente el exceso de contraiones favorece la estabilización de las partículas de caseína (efecto de doble capa eléctrica), este sistema más estable se rodea de redes gelificadas de gelana que se refuerzan con el calcio liberado de la micela durante la acidificación, generando geles mixtos con partículas embebidas en una red densa de gelana. Ya que las caseínas también se están agregando durante la acidificación, pareciera que la presencia de gelana limita a la vez su agregación, razón por la cual esta red se muestra menos burda.

Dado que los geles del sistema SCa presentaron buena estabilidad a la sinéresis, es probable que existan interacciones entre gelana y las proteínas de la leche, posiblemente similar a la reportada por caseína- $\kappa$ -carragenina y caseína-pectina; probablemente existan también asociaciones tipo puentes e calcio que involucre no sólo a gelana y  $\kappa$ -caseína sino incluso a las proteínas séricas. Este aspecto no se puede esclarecer con nuestro trabajo, requiere estudios más profundos. Hasta ahora podemos establecer que la presencia de un hidrocóide con la capacidad de agregación como gelana favorece la retención de agua del sistema generando sistemas lácteos más estables a la sinéresis. La presión endógena propicia el flujo de agua desde el interior de la red hasta su superficie. La presencia de grandes zonas aisladas de la red de gelana en el sistema SC permite una mayor captación de agua difícilmente movilizadas. Además las pequeñas zonas entramadas de gelana entre la red de caseínas, tanto en SC como SCa también ofrece una resistencia ante la presión endógena.

# **Capítulo 5: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS**

## **5.1 CONCLUSIONES**

Los resultados de este trabajo muestran que el polisacárido gelana es capaz de gelificar en la fase acuosa de la leche cuando ésta se acidifica, y mantener una gelificación estable hasta valores de pH ~5.0. La adición de gelana al 0.05 % p/v a la leche generó incrementos en el carácter sólido-viscoelástico de los geles ácidos de leche. Los geles en presencia de gelana son tendentes a ser “geles fuertes” mientras que los geles en ausencia del polisacárido son “geles suaves”.

Las microscopías evidenciaron una cogelificación de gelana con partículas de caseína. La gelificación de gelana durante la acidificación de la leche promueve la estabilidad de la red de caseína, al formar una red que inmoviliza el agua y las partículas agregadas de caseína; lo cual es congruente con la reología de los sistemas leche-gelana (SCa y SC). Por otra parte, la adición de CaCl<sub>2</sub> y gelana generó sistemas reológicamente más estables y con menor sinéresis espontánea durante el almacenamiento. El exceso de contraiones favoreció la estabilización de los geles de leche debido a la formación de una red de caseína embebida en una red densa de gelana entrecruzada con el calcio presente en el medio acuoso, posiblemente reforzada con el calcio liberado de la micela de caseína durante la acidificación de la leche.

Al término de un periodo de observación de 16 días a temperatura de refrigeración se observó que la presencia de gelana y CaCl<sub>2</sub>-3 mM, reduce la sinéresis de los geles de leche ácida hasta en un 68%, CaCl<sub>2</sub>-3 mM reduce la sinéresis del gel en

el sistema SG hasta en un 50%, mientras que la presencia de gelana en ausencia de  $\text{CaCl}_2$ -3 mM reduce la exudación de agua en un 59%, por lo que la presencia de gelana es más determinante que la de  $\text{CaCl}_2$ -3 mM en la estabilidad a la sinéresis de los geles de leche ácida.

## 5.2 RECOMENDACIONES

- Realizar estudios reológicos en función del tiempo de almacenamiento de los geles, para evaluar cambios en las propiedades reológicas con el tiempo de envejecimiento del gel y correlacionarlas con los datos de sinéresis.
- Evaluar otras técnicas de microscopía, como electrónica de barrido o de fuerza atómica para visualizar posibles interacciones gelana-micelas de caseína.
- Visualizar en tiempo real la microscopía de los geles durante su formación y evaluar distintas concentraciones de gelana con la finalidad de determinar la organización estructural imperante en geles mixtos leche-gelana.
- Evaluar la velocidad de gelificación de los geles ácidos de leche en las propiedades reológicas y de microestructura, combinando concentración de agente acidulante y temperatura de gelificación.
- Examinar otros polisacáridos, como gelana altamente acilada o pectinas, en la estabilización de geles de leche ácida.
- Desarrollar cinéticas de gelificación usando bacterias ácido-lácticas para desarrollar productos lácteos de interés comercial.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilera, J.M. y Stanley, D.W. (1999) Microstructural aspects of a fluid food: Milk. En Macrostructural Principles of Food Processing and Engineering. An Aspen publication. Pp 293-324.

Alais, Ch. (2001) Ciencia de la Leche : Principios de Técnica Lechera. Décima Tercera Reimpresión. CECOSA (Ed). México, pp 15-23.

AOAC (1998) Oficial Methods of Análisis. Association of Oficial Analytical Chemists, Washington D.C.

Auty, M.A.E., O' Kennedy, B.T., Allan-Wojtas, P. y Mulvihill D.M. (2005) The application of microscopy and rheology to study the effect of milk salt concentration on the structure of acidified micellar casein systems. Food Hydrocolloids, 19, 101-109.

Badui, D.S. (2006) Leche. En Química de los Alimentos. 4ª edición. Pearson Educación (Ed.). México, pp 603-631.

Bird, B.R., Stemart, W.E. y Lightfoot, E.N. (2006) Fenómenos de Transporte, 2da edición, Limusa Wyley, México, pp 11-41.

Brule, G. y Lenoir, J. (1990) Coagulación de la Leche. En El Queso. Eck, A (Ed). Ediciones Omega. Barcelona España, pp 3-57.

Casado-Cimiano, D.P. (1991) Métodos para el análisis de las leches en polvo. En Guía para el análisis químico de la leche y los derivados lácteos. Ediciones Ayala (Ed.). España. Pp 494-498.

**De Belder, A.N. y Wik, K.O. (1975).** Preparation and properties of fluorescein labelled hyaluronate, *Carbohydrate Research*, 44, 251-257.

**De Kruif C.G. (1997)** Skim Milk acidification. *Journal of Colloid and Interface Science*, 185, 19-25.

**Doublier, J.L y Cuvelier, G. (1996)** Gums and Hydrocolloids: Functional Aspects. En *Carbohydrates in Food*, A.C. Eliasson (ed.), Marcel Dekker, Inc. Nueva York, pp 283-318.

**Hans, T. R., de Kruif, C. G., van Eijk, M. y Claus, R. (2004)** On the mechanism of stabilisation of acidified milk drinks by pectin. *Food Hydrocolloids*, 18, 565-572.

**Holt. C., (1997)** The milk salts and their interaction with casein. En *Advanced dairy chemistry. Lactose, water, salts and vitamins. Vol. 3.* P.F. Fox (editor) Chapman and Hall. Pp 233-256.

**Ji. S., Corredig, M., Goff, H. D. (2008)** Aggregation of casein micelles and k-carrageenan in reconstituted skim milk. *Food Hydrocolloids*, 22, 56-64.

**Keogh, M.K. y O’Kennedy, B.T. (1998)** Rheology of Stirred Yogurt as Affected by Added Milk Fat, Protein and Hydrocolloids. *Journal of Food Science*, 63, 108-112.

**Kym, B. Y. y Kinsella, J.E. (1989)** Effect of temperatura and pH on the coagulation of casein. *Milchwissenschaft* 44, 622-625.

**Lucey, J.A., van Vliet, T., Grolle, K., Geurts, T. y Walstra, P. (1997a)** Properties of Acid Casein Gels Made by Acidification with Glucono- $\delta$ -lactone. 1. Rheological Properties. *International Dairy Journal*, 7, 381-388.

**Lucey, J.A., van Vliet, T., Grolle, K., Geurts, T. y Walstra, P. (1997b)** Properties of Acid Casein Gels Made by Acidification with Glucono- $\delta$ -lactone. 2. Syneresis,



Permeability and Microstructural Properties. *International Dairy Journal*, 7, 389-397.

Lucey, J.A., Munro, P.A. y Singh H. (1998a) Rheological Properties and Microstructure of Acid Milk Gels as Affected by Fat Content and Heat Treatment. *Journal of Food Science*, 63, 660-664.

Lucey, J.A., Munro, P.A. y Singh H. (1998b) Whey Separation in Acid Skim Milk Gels Made with Glucono- $\delta$ -lactone: Effects of Heat Treatment and Gelation Temperature. *Journal of Texture Studies*, 29, 413-426.

Lucey, J.A. (2001) The relationship between rheological parameters and whey separation in milk gels. *Food Hydrocolloids*, 15, 603-608.

Lucey, J.A. (2002) ADSA Foundation Scholar Award. Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels. *Journal Dairy Science*, 85, 281-294.

Lucey, J.A. y Singh, H. (2003) Acid Coagulation of Milk. En *Advanced Dairy Chemistry*. Vol.1. Proteins. Part B. 3ª edición. Fox, P.F. y McSweeney, P.L.H. (Eds.). New York USA. Pp 1001-1025.

Lucey, J.A. (2004) Cultured dairy products: an overview of their gelation and texture properties. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 77-84.

Martin A. H., Goff D., Smith A., Dalgleish D. G. (2006) Immobilization of casein micelles for probing their structure and interactions with polysaccharides using scanning electron microscopy (SEM). *Food Hydrocolloids*, 20, 817-824.

Matia-Merino L., Lau K., Dickinson E. (2004) Effects of low-methoxyl amidated pectin and ionic calcium on rheology and microstructure of acid-induced sodium caseinate gels. *Food Hydrocolloids*, 18, 271-281.

**Miyoshi, E. y Nishinari, K. (1999)** Rheological and thermal properties near the sol-gel transition of gellan gum aqueous solutions. *Colloid Polymer Science*, 114, 68-82.

**Miyoshi, E., Takaya, T. y Nishinari, K. (1994)** Gel-sol transition in gellan gum solutions. I. Rheological studies on the effects of salts. *Food Hydrocolloids*, 8, 505-527.

**Pérez-Campos, S. J. (2008)** Propiedades reológicas dinámicas de dispersiones acuosas de gelana: efecto de la concentración de iones calcio en la formación de geles. Tesis de licenciatura. Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.

**Pérez Campos, S. J., Rodríguez-Hernández A. I y Chavarría-Hernández N. (2009)** Gelana: claves para su aplicación. *ÉNFAISIS alimentación Latinoamericana*, 1, 44-46.

**Rodríguez-Hernández, A. I. (1997)** Propiedades reológicas dinámicas de geles formados por mezclas gelana-xantana y gelana-i-carragenina. Tesis de Maestría. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México

**Rodríguez-Hernández, A. I. (2004)** Reología y estructura de mezclas formadas por los polisacáridos almidón de maíz ceroso y gelana. Tesis de doctorado. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México.

**Rodríguez-Hernández, A. I., Nuñez-Santiago, M. C. y Chavarría-Hernández, N. (2006)** Memorias del curso "Principios de Reología y su aplicación en el procesamiento de Alimentos". Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.

**Roefs, S. P. F. M. y van Vliet, T. (1990)** Structure of acid casein gels. 2. Dynamic measurements and type of interaction forces. *Colloids and Surfaces*, 50, 161-175.

**Ross-Murphy, S.B. (1995)** Rheology of biopolymer solutions and gels. En *New Physico-Chemical Techniques for the Characterization of Complex Food Systems*, E. Dickinson (ed.), Blackie Academic y Professional, Chapman y Hall. Gran Bretaña, pp. 139-156.

**Sanderson, G.R. (1990)** Gellan Gum. En "Food Gels", P. Harris (ed.), Elsevier Applied Science. Nueva York, Estados Unidos de América, pp. 201-232.

**Sears, F.W., Zemansky, M.W., Young, H.D. y Freedman, R.A. (1999)** Equilibrio y Elasticidad. En *Física Univrstaria*. Vol.1. 9ª edición. Pearson Educación (Ed.). México. Pp 337-345 y 446-448.

**Sosa-Herrera, M.G. (2008)** Reología y estabilidad de emulsiones elaboradas con mezclas de caseinato de sodio y gelana. Tesis de Doctorado. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México.

**Tang, J., Tung, M.A. y Zeng, Y. (1996)** Compression strength and deformation of gellan gels formed with mono and divalent cations. *Carbohydrate Polymers*, 29, 11-16.

**Tan Y. L., Ye A., Singh H. y Hemar Y. (2007)** Effects of biopolymer addition on the dynamic rheology and microstructure of renneted skim milk systems. *Journal of Texture Studies* 38, 404-422.

**Van de Velde, F., Weinbreck, F., Edelman M.W., van der Linden, E. y Tromp, R.H. (2003)** Visualisation of biopolymer mixtures using confocal scanning laser microscopy (CSLM) and covalent labelling techniques. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31, 159-168.

Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A. y van Boekel, M.A.J.S. (1999) Milk Components. En Dairy Technology Principles of Milk Properties and Processes. Marcel Dekker, Inc. (Ed.). New York, USA. Pp 27-100.

Ye Aiqian (2008) Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications- a review. International Journal of Food Science and Technology, 43, 406-415.