



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas

***Propiedades de geles de concentrado
de proteínas de lactosuero, miel y
harina***

Diego Karim Yamul

Tesis Doctoral

2008

Directora: Dra. Cecilia Lupano



C I D C A

Este trabajo de tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) bajo la dirección de la Dra. Cecilia Elena Lupano. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.

Agradecimientos

Agradezco a las siguientes personas e instituciones que hicieron posible la realización del presente trabajo de tesis.

- A la Dra. Cecilia Elena Lupano por haberme iniciado y formado en la investigación científica y que por sobre todo creyó en mí.
- Al CIDCA y todo su personal por haberme brindado todo lo necesario para que este trabajo concluyera exitosamente.
- A la Universidad Nacional de La Plata, a la fecha, pública, libre y gratuita.
- Muy especialmente a mi madre, Norma B. Silvestrelli quien siempre realizó grandes esfuerzos para que durante mi formación universitaria no me faltara nada y que pudiera abocarme de lleno al estudio.

INDICE.

	Página
Capítulo 1: Introducción.	1
1.1. El suero de leche.	2
1.1.1. Producción de lactosuero.	2
1.1.2. Utilización del lactosuero como ingrediente alimenticio.	3
1.1.3. Composición del lactosuero.	3
1.1.4. Obtención de concentrados proteicos de lactosuero (CPL).	4
1.1.5. Obtención de aislados proteicos de lactosuero por intercambio iónico.	7
1.1.6. Las proteínas del suero.	8
1.1.7. Propiedades funcionales de las proteínas del lactosuero.	10
1.1.8. Aplicaciones de las proteínas de lactosuero.	11
1.1.9. El proceso de gelificación. Formación de geles.	12
1.1.10. Propiedades de geles de CPL	15
1.1.11. Geles mixtos.	19
1.2. La miel.	21
1.2.1. Definición.	21
1.2.2. Origen.	21
1.2.3. Breve historia de la miel.	21
1.2.4. La producción de miel en la Argentina.	22
1.2.5. Composición química.	24
1.2.6. Actividad enzimática.	27
1.2.7. Propiedades reológicas.	28
1.2.8. Usos de la miel.	28
1.3. La harina de trigo.	30
1.3.1. Definición.	30
1.3.2. Breve historia del trigo.	30
1.3.3. Producción.	31
1.3.4. Clasificación del trigo.	32
1.3.5. Estructura del grano de trigo.	32
1.3.6. Componentes del grano de trigo.	33

1.3.7. La harina de trigo como alimento.	34
Objetivos.	35
Capítulo 2: Materiales y métodos.	36
2.1. Materiales utilizados.	37
2.2. Preparación de las muestras.	37
2.3. Calorimetría diferencial de barrido.	38
2.4. Microscopía electrónica de barrido.	41
2.5. Solubilidad de los componentes proteicos de los geles	42
2.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida de los constituyentes proteicos de los geles.	43
2.7. Capacidad de retención de agua.	45
2.8. Determinación del color de los geles.	46
2.9. Propiedades reológicas: textura.	47
2.10. Propiedades reológicas: viscoelasticidad.	50
2.11. Evaluación sensorial.	56
2.12. Evaluación nutricional.	58
2.13. Estudio microbiológico.	59
Capítulo 3: Calorimetría diferencial de barrido.	61
3.1. Introducción.	62
3.2. Resultados y discusión.	63
3.2.1. Dispersiones con miel.	63
3.2.2. Dispersiones con miel y harina de trigo.	66
3.3. Conclusiones.	70
Capítulo 4: Microscopía electrónica de barrido.	71
4.1. Introducción.	72
4.2. Resultados y discusión.	73
4.2.1. Geles con miel.	73
4.2.2. Geles con miel y harina de trigo.	74
4.3. Conclusiones.	77
Capítulo 5: Solubilidad proteica de los geles.	78

5.1. Introducción.	79
5.2. Resultados y discusión.	80
5.2.1. Geles con miel.	80
5.2.2. Geles con miel y harina de trigo.	81
5.3. Conclusiones.	84
Capítulo 6: Electroforesis de los constituyentes proteicos de los geles.	85
6.1. Introducción.	86
6.2. Resultados y discusión.	87
6.3. Conclusiones.	89
Capítulo 7: Capacidad de retención de agua.	90
7.1. Introducción.	91
7.2. Resultados y discusión.	92
7.2.1. Geles con miel.	92
7.2.2. Geles con miel y harina de trigo.	94
7.3. Conclusiones.	95
Capítulo 8: Color de los geles	96
8.1. Introducción.	97
8.2. Resultados y discusión.	98
8.2.1. Geles con miel.	98
8.2.2. Geles con miel y harina de trigo.	100
8.3. Conclusiones.	105
Capítulo 9: Propiedades reológicas de los geles: textura	106
9.1. Introducción.	107
9.2. Resultados y discusión.	108
9.2.1. Geles con miel.	108
9.2.2. Geles con miel y harina de trigo.	113
9.3. Conclusiones.	119
Capítulo 10: Propiedades reológicas de los geles: viscoelasticidad	120
10.1. Introducción.	121

10.2. Resultados y discusión.	122
10.2.1. Geles con miel.	122
10.2.2. Geles con miel y harina de trigo.	131
10.3. Conclusiones.	148
Capítulo 11: Evaluación sensorial de los geles.	149
11.1. Introducción.	150
11.2. Resultados y discusión.	151
11.3. Conclusiones.	155
Capítulo 12: Evaluación nutricional de los geles.	156
12.1. Introducción.	157
12.2. Resultados y discusión.	158
12.2.1. Propiedades nutricionales de los CPL.	158
12.2.2. Calidad de las proteínas de lactosuero.	158
12.2.3. Las proteínas de lactosuero y sus efectos positivos sobre la salud.	163
12.2.4. Propiedades nutricionales de la miel.	164
12.2.5. La miel y sus efectos positivos sobre la salud.	165
12.2.6. Propiedades nutricionales de los geles de CPL.	166
12.3. Conclusiones.	167
Capítulo 13: Estudio microbiológico de los geles.	168
13.1. Introducción.	169
13.2. Resultados y discusión.	170
13.3. Conclusiones.	172
Capítulo 14: Discusión general	173
14.1. Características de los geles de CPL	174
14.2. Efecto de la miel.	177
14.3. Efecto de la harina de trigo.	179
Capítulo 15: Conclusiones.	181
Referencias.	184

1. Introducción.

1.1. El suero de leche.

1.1.1. Producción de lactosuero.

La industria láctea tiene como subproducto en la preparación de queso o caseína grandes cantidades de suero. Este subproducto, que anteriormente se desechaba, contiene alrededor del 20% de las proteínas de la leche, cerca del 8% de la materia grasa y aproximadamente el 95% de lactosa, por lo que resulta un gran desperdicio de nutrientes el no utilizar el lactosuero como alimento (Pilosoph, 2003).

El volumen de lactosuero es aproximadamente 7 a 10 veces mayor que el queso producido, dependiendo del tipo de queso. Se calcula que en Europa se producen 75 millones de toneladas anuales de lactosuero, 27 en América del Norte y 8 en otras áreas del mundo, lo que resulta en un total de 110 millones de toneladas. Como la concentración de proteínas en el suero es de aproximadamente 6 g/l, esto equivale a alrededor de 600.000 toneladas anuales de proteínas de alto valor biológico. Por esto es importante que la industria láctea tenga un abanico de opciones para utilizar el lactosuero como base de alimentos, preferentemente para el consumo humano, con el fin adicional de no contaminar el medio ambiente y de recuperar, con creces, el valor monetario de este producto (Pilosoph, 2003).

A partir de los años 70 en Europa y de los 80 en nuestro país, comenzaron a desarrollarse procesos de separación, concentración y secado, que permiten obtener subproductos del lactosuero con interesantes aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica. Actualmente se estima que en la Argentina se producen alrededor de 450.000 toneladas de lactosuero por año, de los cuales el 62% es utilizado directamente en la alimentación animal, el 33% se transforma en derivados como lactosa y concentrados proteicos de lactosuero (CPL), el 4% se transforma en suero en polvo y sólo el 1% se trata como efluente. Las zonas de mayor producción son las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe (Pilosoph, 2003).

1.1.2. Utilización del lactosuero como ingrediente alimenticio.

El lactosuero es cada vez más utilizado como ingrediente en la elaboración de alimentos, tanto para mejorar la calidad como las propiedades funcionales de éstos, y por los efectos benéficos sobre la salud (Cheftel y col. 1982; Dumay, 1988). El lactosuero en polvo, por ejemplo, puede sustituir el agregado de leche en polvo aportando proteínas de alta calidad a casi la mitad del costo, y reduce el agregado de endulzantes que son reemplazados por la lactosa. En la actualidad se utiliza el lactosuero en la fabricación de alimentos lácteos (helados, yogur, untables), productos cárnicos (carnes procesadas, embutidos), panificados (bases para pasteles, galletitas, barras nutritivas), productos de confitería (chocolates, coberturas, caramelos) y bebidas (mezclas con cacao, cremas para café, bebidas para deportistas). Un ejemplo de productos de alto valor agregado derivados de las proteínas del lactosuero son los análogos o sustitutos de la materia grasa. Entre ellos se encuentra el Simplese®, el cual es un ingrediente multifuncional patentado obtenido a través de una coagulación termomecánica de CPL a pH ácido, lo que da como resultado partículas esféricas de 0,1-2,0µm de diámetro. Estas micropartículas tienen la propiedad de emular la estructura y textura de la grasa. El lactosuero presenta efectos positivos sobre la salud –mejora la respuesta inmunológica y ayuda en la prevención de distintos tipos de cáncer– por lo que se estudia cada vez más la forma de incluirlo como ingrediente funcional en los alimentos. Las diferentes proteínas del lactosuero originan por hidrólisis enzimática péptidos que poseen diferentes actividades biológicas. En diferentes trabajos de investigación se observó que ciertos péptidos poseen propiedades antimicrobianas, otros tienen la capacidad de disminuir la presión arterial y otros, incluso, poseen actividad antitumoral (Pilosof, 2003).

1.1.3. Composición del lactosuero.

Existen dos clases de lactosuero de acuerdo al método de obtención: suero ácido (pH final 4,6) o suero dulce (pH final 6,2 a 6,4). En la práctica a nivel industrial el suero ácido es el subproducto de la obtención de caseinatos o de la fabricación de quesos tipo Cottage. Estos productos se manufacturan ajustando el pH de la

leche a 4,6 por adición de ácidos, glucono delta lactona o un cultivo de bacterias ácido lácticas. Luego se corta, se cocina el coágulo resultante y se drena el suero. El suero dulce se obtiene por adición de enzimas coagulantes como la renina (chymosina: EC 3.4.23.4) para la obtención de quesos tipo Cheddar (Morr y col.,1993).

En la tabla 1.1 se muestra la composición media de los sueros ácido y dulce:

	Suero dulce (%)	Suero ácido (%)
pH	6,3	4,6
Cenizas	0,53	0,69
Lactosa	4,77	4,71
Proteínas	0,82	0,75
Grasas	0,07	0,03
Ácido láctico	0,15	0,55
Calcio	0,05	0,13
Sodio	0,07	0,06
Fósforo	0,06	0,09
Potasio	0,13	0,15

Tabla 1.1. Composición de los sueros ácido y dulce.

Adaptada de Morr y col. (1993).

1.1.4. Obtención de concentrados proteicos de lactosuero.

Un procedimiento muy utilizado para obtener concentrados de lactosuero es la ultrafiltración. En este procedimiento el suero es filtrado a través de membranas porosas que dejan pasar moléculas chicas y retienen moléculas grandes. Las proteínas son moléculas grandes que no atraviesan los poros de estas membranas, por lo que permanecen en el suero que se va concentrando. La lactosa, las sales y los oligopéptidos atraviesan los poros y se recogen en el permeado tal como se ilustra en la figura 1.1.

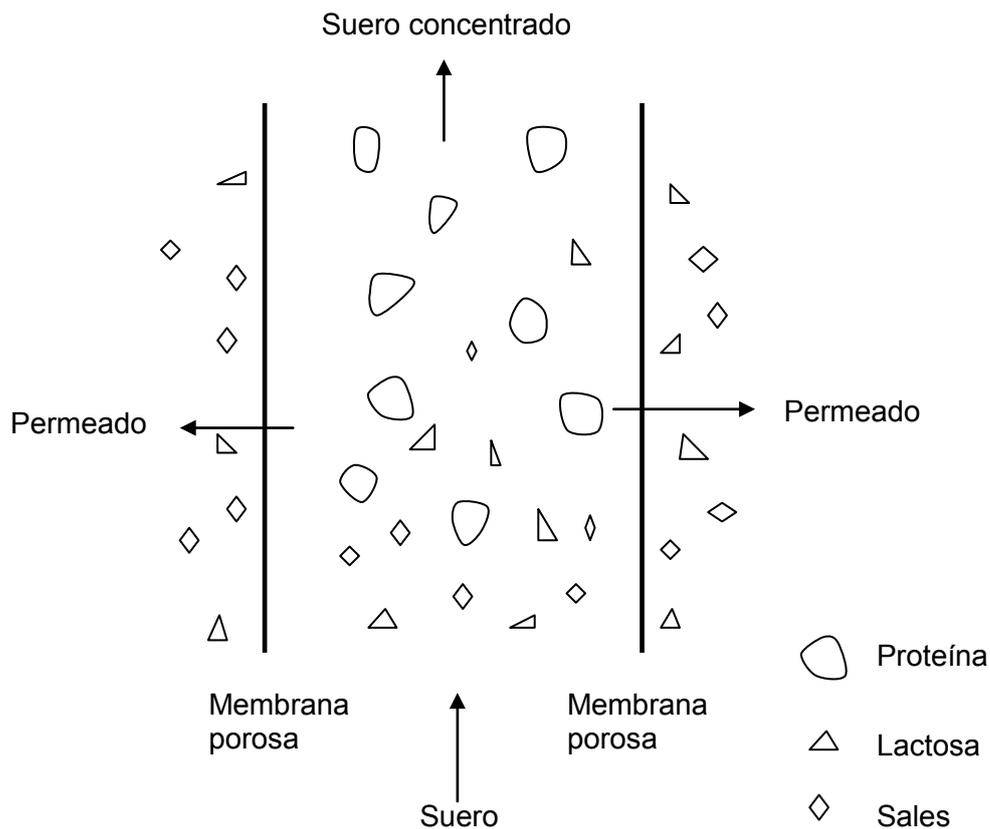


Figura 1.1. Proceso de ultrafiltración de lactosuero.

Para obtener un concentrado de proteínas de lactosuero con 35 a 50% de proteínas en base seca, el suero se pasteuriza, se clarifica por centrifugación para eliminar las pequeñas partículas de queso o caseína que hayan quedado, y posteriormente se concentra por ultrafiltración hasta un contenido de sólidos de 25-35%. Para obtener el concentrado en polvo, el producto obtenido por ultrafiltración se seca por spray (figura 1.2). Cada una de estas operaciones afecta la composición y las propiedades funcionales del producto final, como por ejemplo la solubilidad de la α -lactoalbúmina y de la β -lactoglobulina (Anandharamakrishnan y col., 2008).

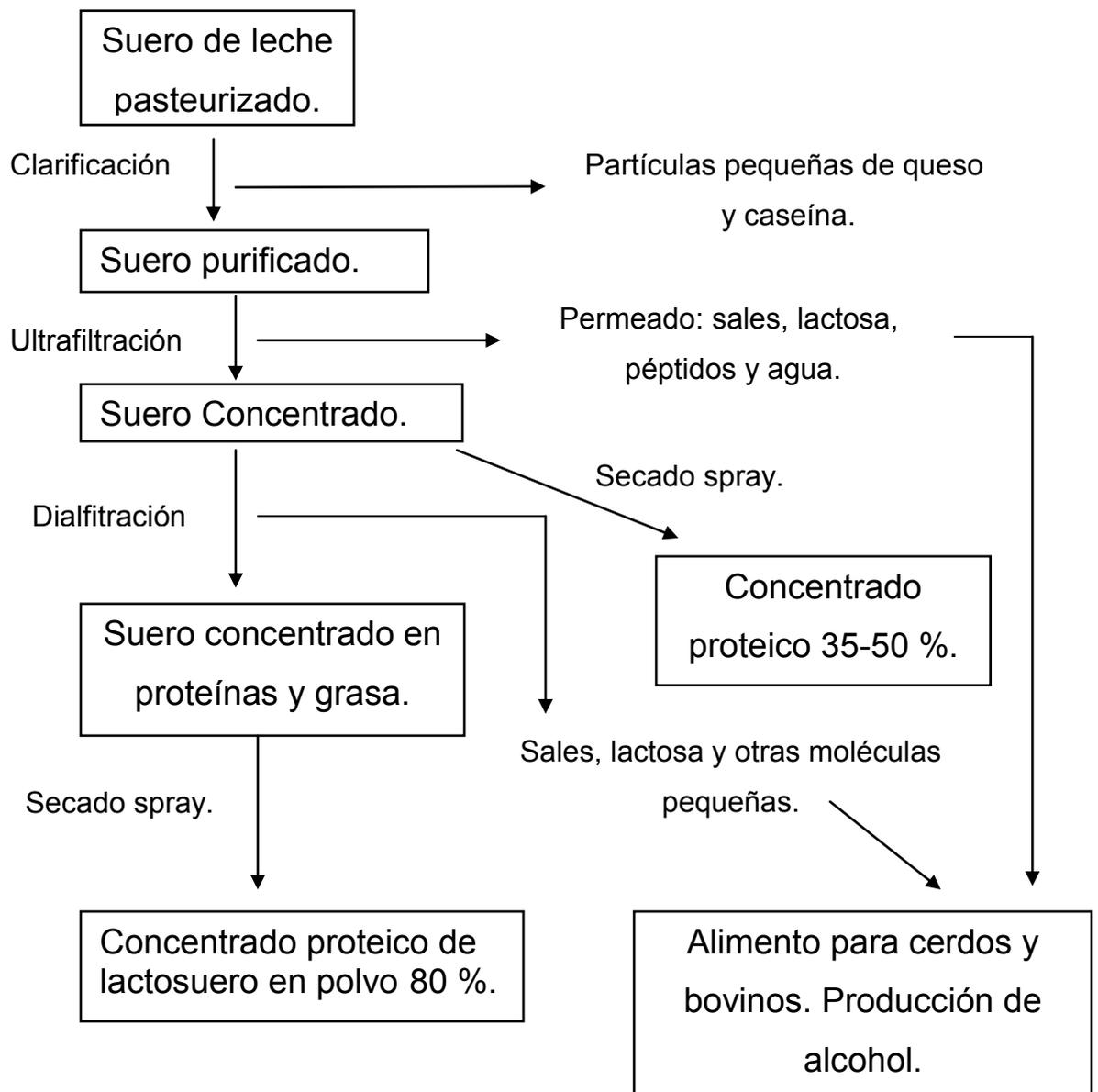


Figura 1.2. Esquema de obtención de un CPL.

Se puede obtener un concentrado proteico con 80% de proteína esencialmente de la misma manera pero agregando un paso de diafiltración. La diafiltración es un proceso similar a la ultrafiltración, en el cual el líquido retenido se va lavando con agua libre de sales, de manera de eliminar la mayor cantidad posible de sales y lactosa.

1.1.5. Obtención de aislados proteicos de lactosuero por intercambio iónico.

La tecnología de procesamiento mediante intercambio iónico se ha usado para producir aislados proteicos de lactosuero que contienen un 90% o más de proteínas.

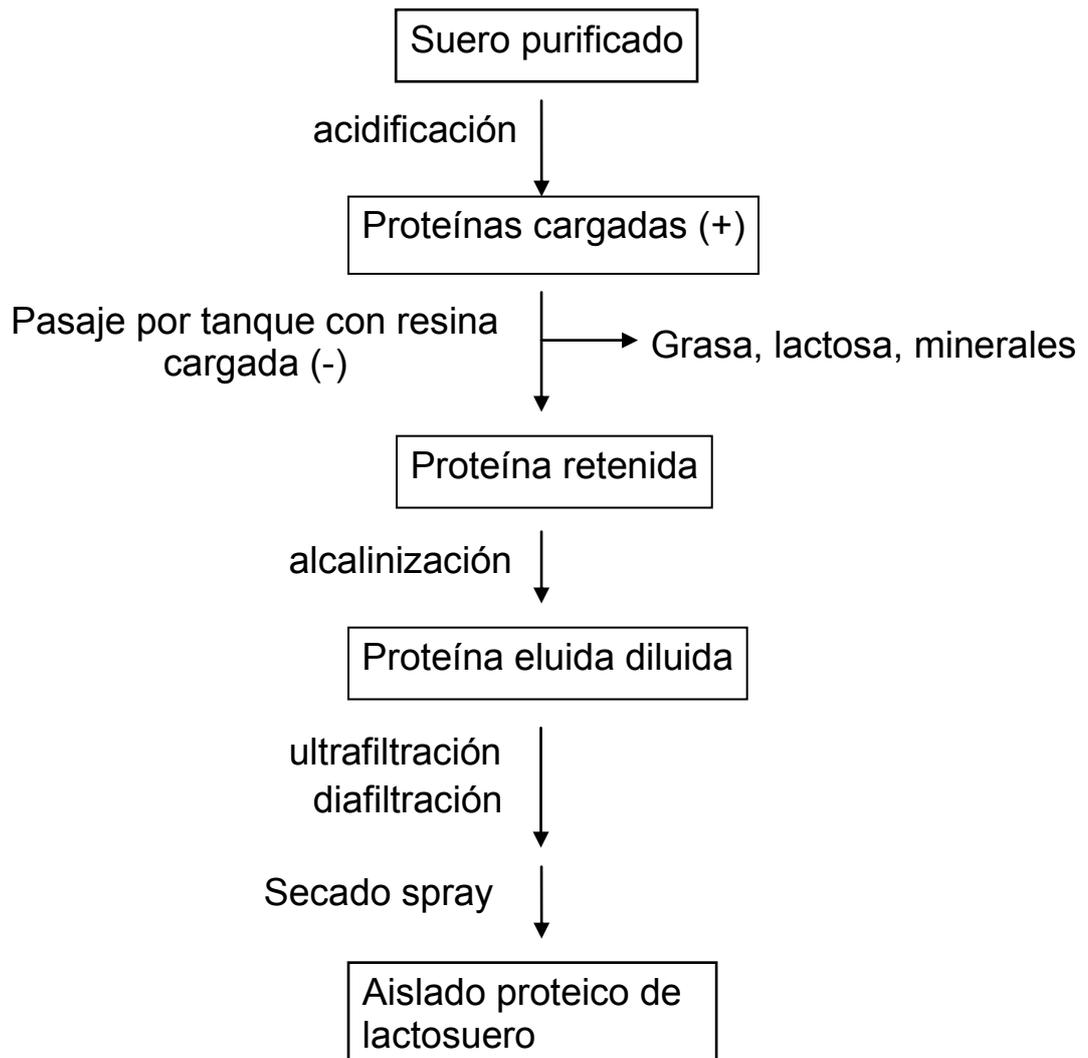


Figura 1.3. Esquema de obtención de un aislado proteico de lactosuero.

1.1.6. Las proteínas del suero.

Las proteínas del suero son un conjunto heterogéneo de proteínas que representa aproximadamente el 20% del total de la proteína láctea. Se diferencian de la

caseína en que son insensibles a la coagulación ácida y a la acción de la quimosina.

Las principales proteínas del lactosuero son: α -lactoalbúmina (α -La), β -lactoglobulina (β -Lg), seroalbúmina bovina (BSA) e inmunoglobulinas (Ig).

En la tabla 1.2 se muestran algunas de sus principales propiedades fisicoquímicas.

	β -Lg	α -La	BSA	Ig
Punto isoeléctrico.	5,2	4,2-4,5	4,7-4,9	5,5-8,3
Concentración en suero (g/L)	2-4	0,6-1,7	0,4	0,4-1,0
Concentración en suero (%p/p)*	56-60	18-24	6-12	6-12
Peso molecular (kd)	18,3	14	66	>146

*Gramos de proteína / 100gramos de proteínas totales.

Tabla 1.2. Propiedades fisicoquímicas de las proteínas del suero lácteo.

Adaptada de Eigel y col. 1984.

La β -lactoglobulina.

Esta proteína de 162 residuos de aminoácidos es la más abundante de todas, representando casi un 50% del total de las proteínas del lactosuero. La β -Lg existe como un dímero de 36,7 kd en soluciones por encima de su punto isoeléctrico hasta pH 7,5. Por debajo de pH 3,5 y por encima de pH 7,5 el dímero se disocia en un monómero expandido, y a pH entre 3,5 y 5,2 el dímero se polimeriza en un octámero de 147 kd. De gran importancia para esta proteína son sus 5 residuos de cisteína, cuatro de los cuales forman dos puentes disulfuro intramoleculares quedando un grupo sulfhidrilo libre en el residuo 119 o 121. Este contenido de residuos de cisteína y cistina facilita la polimerización de la proteína por formación de puentes disulfuro intermoleculares durante el procesamiento a alta temperatura y almacenamiento. Por encima de los 65°C comienza a desnaturalizarse sufriendo extensivos cambios conformacionales que exponen grupos SH altamente reactivos (Morr y col., 1993).

La α -lactoalbúmina.

Esta proteína representa aproximadamente el 20% de las proteínas del lactosuero y consiste en 123 residuos de aminoácidos. Todos sus residuos de cisteína se hallan en la forma de puentes disulfuro intramoleculares. Tiene una forma globular compacta con 4 puentes disulfuro (Morr y col.,1993). Ruegg y col. (1977) mostraron que la α -La se desnaturaliza a 65,2°C y a pH 6,7 y que se obtiene un 80 a 90% de renaturalización por posterior enfriamiento.

La seroalbúmina bovina.

La BSA representa alrededor del 6-12% del total de las proteínas del suero de leche y consiste en una cadena polipeptídica simple de 582 residuos de aminoácidos. Esta proteína es idéntica a la que se halla en el suero de la sangre y contiene 17 puentes disulfuro intramoleculares y un grupo sulfhidrilo libre (Morr y col.,1993).

Las inmunoglobulinas.

Son una familia heterogénea de glicoproteínas que tienen en común actividad de anticuerpos. Existen 5 clases de inmunoglobulinas: IgG₁, IgG₂, IgA, IgM e IgE. Todas se hallan en la leche y provienen de la sangre (Morr y col.,1993).

Otras proteínas y péptidos.

Existen otras proteínas que se encuentran en menor proporción en el lactosuero: fragmentos de β caseínas, fosfolipoproteínas, lactoporinas, lactoferrinas, lactoperoxidasa y lisozima, también conocidas como proteínas menores del suero (Morr y col.,1993).

De las principales proteínas del lactosuero arriba descritas sólo la α -La y la β -Lg son las que revisten importancia en la manufactura y propiedades funcionales de los CPL.

1.1.7. Propiedades funcionales de las proteínas del lactosuero.

Morr y col. (1993) definen a las propiedades funcionales de las proteínas como aquellas propiedades fisicoquímicas que influyen en la estructura, apariencia, textura, viscosidad y retención del aroma y sabor del producto.

Estas propiedades dependen de las condiciones de obtención del lactosuero. Una misma materia prima inicial puede dar origen a toda una gama de propiedades funcionales modificando ligeramente las condiciones de procesamiento.

Entre estas propiedades de las proteínas de lactosuero podemos mencionar (Morr y col., 1993; Meza y col, 2009):

Alta solubilidad. Las proteínas de lactosuero no desnaturalizadas poseen una excelente solubilidad en un amplio rango de pH y especialmente a pH ácido, lo cual es muy importante en la elaboración de bebidas ácidas y aderezos para ensaladas.

Poder emulsificante. Las proteínas de lactosuero tienen regiones hidrofílicas e hidrofóbicas que le permiten actuar como emulsificantes.

Capacidad de retención de agua. Estas proteínas pueden fijar alrededor de 5 gramos de agua por gramo de concentrado, propiedad muy útil en productos cárneos y embutidos.

Espumado. La formación de una espuma es análoga a la formación de una emulsión, pero en este caso la interfase es agua/aire. La capacidad espumante de estas proteínas se utiliza en la elaboración de postres helados aereados, baños batidos de postres y helados, y merengues.

Viscosidad. Las proteínas de lactosuero aportan baja viscosidad comparada con la mayoría de las proteínas, y por calentamiento ésta no se modifica sustancialmente. Esta propiedad permite que se utilicen en altas concentraciones.

Adhesividad. Las proteínas de lactosuero poseen buenas propiedades de adhesividad lo que los transforma en ingredientes útiles para adherir miga de pan,

masa o pan rallado a carnes o pescados, y también para fijar glaseados a productos de panadería.

Gelificación. Las proteínas de lactosuero en condiciones adecuadas forman por calentamiento redes tridimensionales irreversibles llamadas geles. En estos geles el agua queda atrapada en los capilares de la matriz, lo que aumenta la capacidad de retención de agua y previene la sinéresis. Los geles mejoran el rendimiento de varios productos alimenticios como el jamón y el surimi y mejoran la apariencia evitando las superficies húmedas en yogures y cremas ácidas. Permiten modificar la firmeza, cohesividad y elasticidad de carnes, productos de mar y tortas.

La efectividad con que las proteínas desarrollan sus propiedades funcionales está relacionada con las condiciones del entorno en el que se hallan, como pH, fuerza iónica, temperatura y presencia de azúcares, lípidos y otras proteínas.

1.1.8. Aplicaciones de las proteínas de lactosuero.

En la siguiente tabla se muestran algunas aplicaciones de las proteínas de lactosuero en diferentes productos alimenticios.

Producto	Funciones
Alimentos dietéticos e infantiles.	Aporte proteico, solubilidad y espesante.
Quesos naturales y fundidos.	Emulsificante, espesante y gelificante.
Símil quesos untables, helados y leche para el café.	Emulsificante y espesante.
Cremas, postres, flanes y yogur.	Emulsificante, espesante y gelificante.
Productos cárneos (salchichas, patés y hamburguesas).	Emulsificante, espesante, gelificante, ligante, capacidad de retención de agua y materia grasa.
Panadería.	Aporte proteico, retención de agua, gelificación y textura.
Pastas.	Aporte proteico y textura.

Confitería y chocolate con leche.	Emulsificante, espumante, gelificante y capacidad de retención de agua.
Sopas y salsas.	Emulsificante, espesante.
Platos cocidos.	Emulsificante, espesante y capacidad de retención de agua.
Bebidas lácteas o frutadas.	Solubilidad en caliente y/o pH ácido, espesante.

1.1.9. El proceso de gelificación. Formación de geles.

En los últimos años los CPLs se volvieron ingredientes muy importantes para la industria alimenticia debido a sus excelentes propiedades nutricionales y funcionales. Una de las propiedades funcionales esperadas es la capacidad de formar geles por calentamiento de sus dispersiones acuosas (Cheftel y col., 1982; Dumay, 1988).

Desde el punto de vista fisicoquímico los geles son sistemas multicomponentes que contienen una importante fase líquida pero exhiben un comportamiento típico de sólidos (Almdal y col., 1993). Los geles se obtienen por un proceso de gelificación que involucra un cambio en el estado macroscópico de la materia denominado “transición” del estado sol (solución) al estado gel (sólido viscoelástico) (Sperling, 1992). Desde el punto de vista de la física de polímeros, la formación de un gel procede mediante transición de primer orden desde un estado molecular desordenado en la solución a uno más o menos ordenado en la red del gel. El “punto gel” o “gel time” (t^*) representa el instante en que una solución

se vuelve un sólido viscoelástico o, en el modelo de gelificación de la polimerización, es el instante de tiempo en que se forma una red infinita (Aguilera, 1995).

El proceso de gelificación en alimentos normalmente se lleva a cabo en varios pasos que incluyen cambios conformacionales de las proteínas, su agregación y formación de una red tridimensional llamada gel. En el proceso de gelificación térmica de proteínas globulares el paso de desnaturalización es de

importancia crítica (Tolstoguzov, 1991; Fitzsimons y col., 2007). Las proteínas mantienen su estructura nativa a través de interacciones de tipo puente hidrógeno, iónicas, hidrofóbicas y puentes disulfuro. Estas interacciones son muy dependientes del entorno en el que se encuentran. Cuando las condiciones del entorno cambian estas interacciones se ven alteradas, nuevos enlaces se establecen y las proteínas asumen una nueva conformación (Ju y col., 1999). De este modo la formación de un gel depende de varios factores tales como la concentración de proteínas, pH, fuerza iónica y la presencia de otros componentes del alimento (Gault y col., 1992; Tolstoguzov, 1993, Rabiey y col., 2009).

Según un esquema clásico simple, la agregación y gelificación térmica de proteínas puede darse por los dos mecanismos descritos en la figura 1.4. En el primero la velocidad de agregación es mayor que la de desnaturalización, mientras que en el segundo mecanismo la velocidad de desnaturalización es mayor.

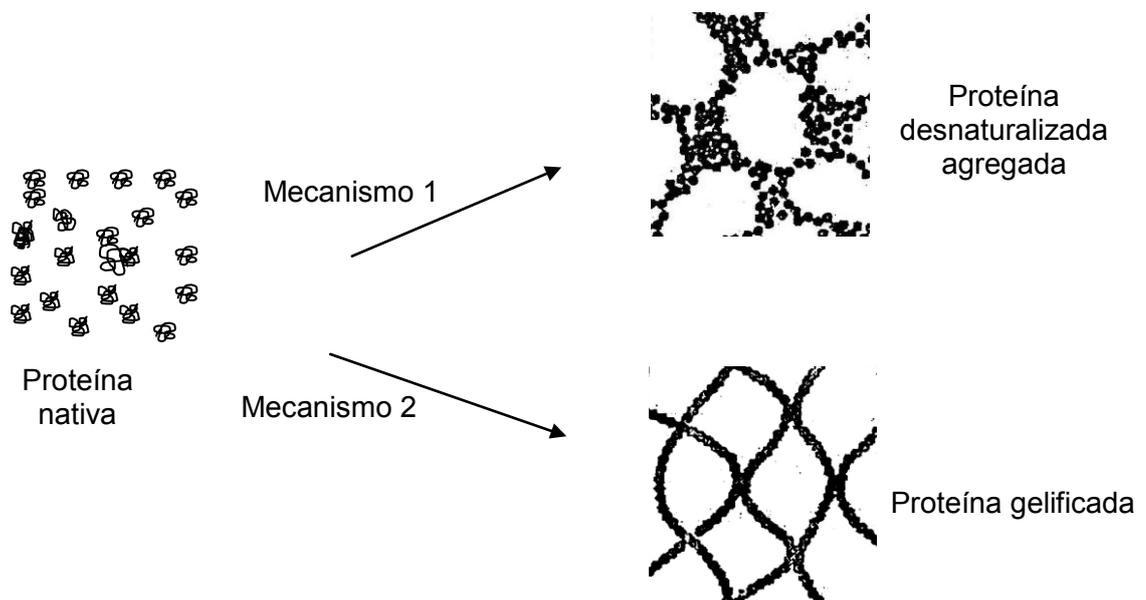


Figura 1.4. Agregación térmica de proteínas y gelificación.

El segundo mecanismo, es decir, la formación de una estructura ordenada o gel, puede darse cuando las proteínas, en este caso de lactosuero, se encuentran cargadas positiva o negativamente, lo que puede lograrse modificando la acidez del medio durante el procesamiento, de manera de estar relativamente lejos del pH

isoeléctrico, ya que cuando la carga neta es cero las proteínas tienden a agregarse (mecanismo 1) por no haber repulsión entre moléculas. La repulsión entre las cargas también puede disminuir al aumentar la fuerza iónica del medio.

La desnaturalización de las proteínas por calor es considerada como una transición intramolecular de primer orden, donde las moléculas compactas comienzan a desplegarse en ovillos aleatorios a la llamada temperatura de desnaturalización (Grinberg y col., 1992). Los geles de proteínas globulares requieren un cierto grado de desplegado de las proteínas como un primer paso en su formación, pero no de un desplegado total, el cual raramente ocurre por debajo de los 100°C (Clark y col., 1987). Estudios llevados a cabo utilizando cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en fase reversa, sugieren que la desnaturalización térmica de las proteínas del suero comienza a 40°C y procede lentamente hasta llegar al 10% de desnaturalización a 62°C. A 65°C se observa una renaturalización hasta casi el estado inicial, luego el % de desnaturalización sigue una relación lineal con la temperatura y alcanza un 95% a 85°C (Parris y col., 1991). El paso de renaturalización a 65°C puede ser interpretado como el colapso de dominios desnaturalizados en estructuras similares a las nativas (Jaenicke, 1991).

Una característica microestructural importante de los geles de proteínas del suero de leche es la presencia de una red de partículas proteicas o agregados más o menos esféricos que forman una matriz tridimensional con intersticios llenos de solución acuosa. Los geles particulados de β -Lg formados a una velocidad de calentamiento rápida (5-12°C/min) muestran cadenas de partículas casi esféricas de tamaño uniforme (alrededor de 0,5 μ m de diámetro) unidos como en un “collar de perlas”. Por otro lado, aquellos geles de β -Lg formados a menores velocidades de calentamiento resultan en cadenas más gruesas de partículas más grandes con una distribución de tamaño mayor (0,5-2,0 μ m de diámetro) unidas entre sí en muchos puntos (Stading y col., 1993; Euston y col., 2007). Las fuerzas que estabilizan a estas cadenas serían principalmente las interacciones hidrofóbicas (Clark y col., 1981) y posiblemente las interacciones iónicas (Kohnhorst y col., 1985). Las interacciones hidrofóbicas serían las fuerzas primarias que estabilizan la estructura del gel en la etapa final del calentamiento ya que estas interacciones se refuerzan con la temperatura; luego se le sumarían en la etapa de enfriamiento las interacciones por puente hidrógeno, las iónicas y los puentes disulfuro (Kang y col., 1991; Shimada y col., 1989; Visschers y col., 2005).

1.1.10. Propiedades de geles de CPL.

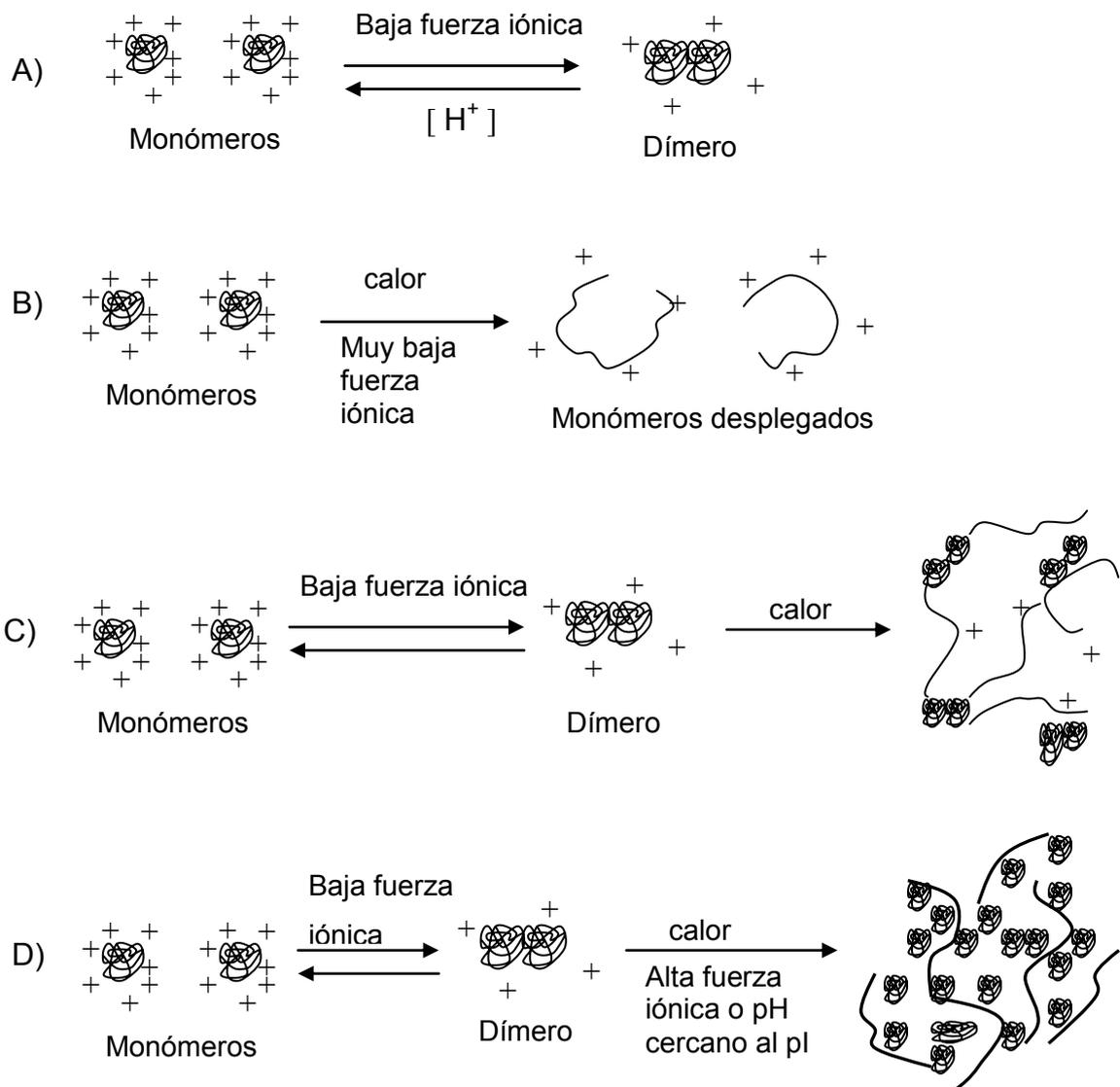
Las propiedades estructurales y funcionales de los geles de CPL no dependen solamente de las características propias de las proteínas que conforman dicho gel sino también de las condiciones (pH, fuerza iónica, concentración de proteínas, etc.), en las cuales el gel es obtenido.

Efecto del calcio y del sodio.

Estos iones se fijan en sitios específicos de la β -lactoglobulina reduciendo su carga efectiva neta. De esta manera las proteínas tienden a agregarse por no haber repulsión entre moléculas cargadas, dando como resultado geles opacos y de estructura grosera. Barbut (1995) estudió el efecto del sodio sobre las características de los geles de CPL, y encontró que a bajas concentraciones de sodio se forman geles transparentes que exhiben una buena capacidad de retención de agua y altos valores del parámetro de luminosidad L . Por el contrario, a altas concentraciones de sodio se obtienen geles opacos, de baja capacidad de retención de agua y bajos valores del parámetro de luminosidad.

La sal afecta la doble capa eléctrica que rodea las moléculas proteicas. Una fuerza iónica alta provee contraiones que reducen la repulsión por carga. Dependiendo del grado de disminución de la carga repulsiva, la agregación puede ser ordenada, con entrecruzamientos limitados, o desordenada, con entrecruzamientos ilimitados. La agregación ordenada produce geles, mientras que la agregación al azar produce geles colapsados o precipitados (Harwalkar y col., 1985).

En el caso particular de la β -lactoglobulina se ha propuesto un mecanismo para la desnaturalización térmica de esta proteína a pH 2,5:



Adaptado de (Harwalkar y col., 1985).

La β -lactoglobulina en solución existe en la forma de monómeros y dímeros en equilibrio. A pH 2,5 se encuentra predominantemente como monómero ya que el dímero se disocia por repulsión electrostática. Cuando aumenta la fuerza iónica del medio, la repulsión electrostática se reduce y los monómeros se asocian desplazando el equilibrio hacia la formación de dímeros (A). El calentamiento a muy baja fuerza iónica y pH produce el desplegamiento de la proteína, pero permanece como monómero (B). El calentamiento a baja fuerza iónica produce la polimerización o agregación después del desplegamiento. Durante el calentamiento predominan las fuerzas electrostáticas repulsivas y la interacción entre las moléculas resulta en pocos entrecruzamientos. Esto conduce a un gel estable, que

retiene gran cantidad de agua (C). Por otro lado, cuando la β -lactoglobulina se calienta a alta fuerza iónica o pH cercano al pI, las fuerzas electrostáticas repulsivas disminuyen. Esto aumenta las interacciones no covalentes y conduce a un número mayor de entrecruzamientos y a una compactación de la matriz proteica (D) (Harwalkar y col., 1985).

Diversos autores (Schmidt y col., 1978; Mulvihill, 1988) encontraron que la dureza de los geles de CPL se incrementa al aumentar la concentración de NaCl y CaCl₂. Se encontró también que el aumento de la concentración de CaCl₂ aumenta la firmeza de los geles hasta una concentración de dicha sal de aproximadamente 15 mM; más allá de esta concentración la firmeza disminuye (Lupano, 2000).

Efecto del pH.

La modificación del pH conduce a variaciones importantes en la fuerza y estructura de los geles de proteínas de suero de leche. A pH ácido y cercano al pI el efecto del pH es similar al de la fuerza iónica.

Standing y col. (1991) estudiaron el efecto del pH en geles de β -lactoglobulina. Estos autores encontraron que para valores de pH entre 4 y 6 (cerca del punto isoeléctrico de las principales proteínas del suero lácteo) se obtienen geles opacos, y que para valores de pH fuera de ese rango se obtienen geles transparentes.

A pH ácido, los enlaces no covalentes, especialmente las interacciones electrostáticas y puentes hidrógeno, son los responsables del mantenimiento de la estructura del gel, mientras que a pH 7,0 cobran importancia los puentes disulfuro (Shimada y col., 1988; 1989; Xing y col., 1990; Matsudomi y col., 1991; Lupano y col., 1992; Lupano y col., 1996). Esto hace que los geles preparados a pH neutro sean muy diferentes a los preparados a pH ácido. Además, como se mencionó anteriormente (sección 1.1.6, página 8), la β -lactoglobulina puede encontrarse como monómero, dímero u octámero dependiendo del pH.

Efecto de la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas es uno de los factores más importantes involucrados en la gelificación. Si la concentración de éstas es muy baja la gelificación no ocurrirá, pero una vez alcanzada la concentración mínima de proteínas requerida, la fuerza del gel aumenta y el tiempo de gelificación disminuye

a medida que la concentración proteica aumenta (Ross-Murphy, 1991; Taylor y col., 1993).

La concentración de proteínas está directamente relacionada con la firmeza de los geles (Lupano y col., 1992).

Boye y col. (1997) encontraron que el aumento de la concentración de proteínas incrementa la capacidad de retención de agua, el módulo elástico G' y el módulo viscoso G'' . Además, Mleko y col.(1994) estudiaron el efecto de la concentración de proteínas sobre las propiedades reológicas de los geles de CPL y encontraron que la deformación de los geles disminuye con el aumento de la concentración de proteínas hasta 10% p/p, y que más allá de esta concentración no se observan cambios significativos en la deformación. También hallaron que el valor del esfuerzo de corte de los geles aumenta con el aumento en la concentración de proteínas.

1.1.11. Geles mixtos.

Muchas veces los alimentos incluyen en su formulación más de un hidrocoloide para lograr las características de textura, reológicas y sensoriales deseadas. Muchos de estos sistemas mixtos se comportan según las propiedades individuales de los polímeros que los constituyen. En otros, sin embargo, las propiedades de la mezcla son diferentes de la de cada componente por separado. Por ejemplo, algunas mezclas binarias de hidrocoloides gelificantes dan geles más fuertes que los que pueden llegar a dar los polímeros por separado, o lo que es equivalente, se obtiene la misma fuerza del gel a una concentración total menor, lo que se traduce en una baja en los costos. Más aún, algunos polímeros que por separado no gelifican lo hacen cuando están en una mezcla. Tal característica es usualmente descripta como sinergismo (Morris y col. 1999).

El comportamiento de mezclas poliméricas en solución es usualmente dominado por la entalpía de interacción entre segmentos de las cadenas de polímeros (en contraste con las soluciones de moléculas pequeñas en donde la entropía de mezclado predomina). La formación sinérgica de un gel puede ocurrir de diferentes maneras. El mecanismo más directo es la formación de enlaces covalentes entre los dos polímeros; sin embargo, esto no es lo más común en

alimentos. Las interacciones atractivas ocurren con polímeros de cargas opuestas, y usualmente resulta en la aparición de un precipitado de polímeros, pero en otros casos puede conducir a la formación de geles por interacciones entre polianiones y policationes. En muchos otros casos las interacciones son desfavorables y conducen a la mutua exclusión de cada componente de la “zona de dominio” de cada polímero, resultando un incremento de la concentración efectiva de ambos. A concentraciones suficientemente altas el sistema se puede separar en dos fases dando una ruta para la preparación de geles multitexturados (Tolstoguzov, 1991, 1993; Morris y col. 1999).

Baeza y col. (2001) estudiaron las propiedades de geles de β -lactoglobulina en presencia de gomas no gelificantes (alginato de polipropilenglicol, xántica y λ -carragenina) y encontraron que estos polisacáridos modifican la cinética de agregación, el tamaño de los agregados de β -lactoglobulina y el grado de asociación de las partículas en la estructura. Spahn y col. (2006) encontraron que la presencia de λ -carragenina en geles de CPL promueve la gelificación a menor tiempo y concentración de proteínas (respecto de una muestra sin este polisacárido), lo cual está relacionado con la existencia de incompatibilidades termodinámicas entre las proteínas y el polisacárido.

Se observó que el almidón de mandioca incrementa la capacidad de retención de agua de los geles ácidos de CPL. Los geles ácidos mixtos de almidón de mandioca y CPL presentan zonas separadas de almidón gelatinizado y proteína agregada (Lupano y col., 1999). Por otro lado, en los geles mixtos CPL/proteínas de gluten preparados a pH ácido se observó que las proteínas del gluten aumentan la firmeza, la elasticidad y la capacidad de retención de agua de los geles, mientras que el CPL rompe la estructura del gluten (Lupano, 2000 b).

A partir de ingredientes que incluyen mezclas de CPL y polisacáridos en su formulación se puede obtener una variedad de productos nuevos gelificados (Spahn y col., 2008). El uso de mezclas de proteínas y polisacáridos está ganando importancia debido a sus interacciones sinérgicas que ofrecen la posibilidad de controlar o mejorar la textura de un alimento (Capitani y col., 2007). El estudio de los mecanismos de gelificación de los CPL con polisacáridos y otras macromoléculas está cobrando un gran interés en la industria de aditivos alimentarios, dado que estas mezclas modifican el comportamiento organoléptico y reológico del producto final (Jong y col., 2009).

1.2. La miel.

1.2.1. Definición.

Según el Código Alimentario Argentino (Capítulo 10, 2004): “Se entiende por miel el producto alimenticio producido por las abejas melíferas a partir del néctar de las flores o de las secreciones procedentes de partes vivas de las plantas, que las abejas recogen, transforman, combinan con sustancias específicas propias y almacenan y dejan madurar en los panales de la colmena”.

1.2.2. Origen.

En un sentido general, la miel es considerada como un alimento de origen animal, pero en realidad, su origen es vegetal, ya que la abeja no la produce por sí misma sino que transforma dos tipos de materias primas, el néctar de las flores y los mielatos de las plantas (Louveaux, 1985).

1.2.3. Breve historia de la miel.

La miel, como producto elaborado por las abejas desde hace miles y miles de años, fue apreciada por casi todas las antiguas civilizaciones, las cuales tenían a este alimento en alta estima, y consideraban sagradas la miel y las abejas. La utilizaron los egipcios en la taxidermia, y para otros pueblos era el ingrediente insoslayable en los ritos mágicos para hacer llover, lo mismo que en los ritos de nacimiento, boda y muerte, además de ser considerada por muchos pueblos como símbolo de fertilidad (Crane, 1980). La miel es un alimento que elaboran las abejas desde hace 20 millones de años, mucho antes de que existiera el hombre, y su utilización en la alimentación humana se remonta a la prehistoria.

La siguiente escala aproximada de tiempo muestra la antigüedad de las abejas en comparación con la del hombre (Crane, 1980):

- i) Hace 150-100 millones de años: aparecen las plantas que dan flores y producen néctar y polen.
- ii) Hace 50-25 millones de años: aparecen las abejas solitarias, y también los primeros primates.
- iii) Hace 20-10 millones de años: las abejas sociales producen y almacenan la miel.
- iv) Hace diez mil años: el hombre comienza a utilizar la miel, según las crónicas que se han encontrado.

El término para designar la miel es más antiguo que el que corresponde a la abeja, así también se consideró sagrada a la miel antes que a las abejas. La miel era un alimento valioso, en tanto que las abejas sólo eran una molestia. El hombre primitivo pensó que las abejas obtenían en alguna forma la miel ya preparada de las flores y de los árboles. Fue recién en el siglo XVIII cuando se supo que las flores sólo producían el néctar que juntaban las abejas. Hasta entonces se había supuesto que el néctar (o rocío de miel) caía del aire, que era exudación del cielo y en consecuencia un alimento tanto de los dioses como de los mortales, lo que lo colocaba en una categoría separada del resto de los alimentos (Crane, 1980).

1.2.4. La producción de miel en la Argentina.

La República Argentina es uno de los países con mayor tradición apícola en Latinoamérica. La industria de la miel presenta un potencial muy grande de explotación debido a las favorables condiciones agroclimáticas que posee el país en la mayor parte de su territorio. Una producción anual de más de 80000 toneladas desde el año 1999 ubica a nuestro país como el tercer productor mundial (Ver tabla 1.3), aunque en el año 2005 y 2006 la Argentina se posicionó en segundo lugar, delante de EEUU.

País	Año											
	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
China	188	212	189	214	254	256	268	268	276	305	309	301
EEUU	90	87	87	101	101	94	78	80	82	82	84	85
Argentina	57	75	75	98	93	85	85	85	80	95	97	92
Turquía	63	63	67	63	63	71	60	60	75	64	63	67
Méjico	49	54	57	52	57	59	59	62	56	57	58	55

Tabla 1.3. Principales países productores de miel.

Los valores están expresados en miles de toneladas.

Fuente: *Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca. 2007.*

El 80% de la producción de miel en Argentina está concentrada en 5 provincias:

Provincia	Nº de colmenas	%
Buenos Aires	1829400	50,86
Córdoba	368000	11,33
La Pampa	279932	8,62
Santa Fe	240000	7,39
Entre Ríos	239074	7,36
Resto del país	292504	14,44

Tabla 1.4. Principales provincias productoras de miel.

Fuente: *Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca. 2006.*

La mayor parte de la producción de miel argentina se exporta, representando el 24% del mercado mundial de miel y, junto con China, más de la mitad del mercado. (Figura 1.5).



Figura 1.5. Exportadores mundiales de miel.

Fuente: *Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca*. 2006.

1.2.5. Composición química.

La miel es un producto muy complejo debido principalmente a su doble origen animal-vegetal. Puede considerarse como una dispersión acuosa de partículas de tamaños muy diferentes, desde iones inorgánicos, azúcares en disolución y macromoléculas de proteínas en dispersión coloidal, hasta granos de polen procedentes de la flora melífera, que son los constituyentes de mayor tamaño (Piana, 1989).

Si bien los azúcares son los principales componentes de la miel, gran parte de las características que la distinguen tan especialmente a la miel, como su aroma, su sabor y su color, no son atribuidos a estos componentes mayoritarios, sino a otros que se encuentran en cantidades muy pequeñas.

La composición exacta de una miel determinada depende principalmente de las plantas de las que proviene, pero también del estado del tiempo, de la tierra y de otros factores. No hay dos mieles idénticas. Se han identificado 181 sustancias diferentes en la miel, algunas de las cuales no se han encontrado en ninguna otra parte (Crane, 1980).

En la tabla 1.5 se muestra la composición química media de la miel.

Componente.	Valor medio.	Valores extremos.
Agua	17,2%	13,4 - 25,0%
Fructosa	38,2%	27,3 - 44,3%
Glucosa	31,3%	22,0 - 40,8%
Sacarosa	1,3%	0,3 - 7,6%
Maltosa	7,3%	2,7 - 16,0%
Azúcares superiores*	1,5%	0,1 - 8,5%
Nitrógeno	0,04%	0 - 18,8%
Minerales	0,17%	0,02 - 1,0%
Ácidos libres	22,0 meq/Kg	6,8 - 47,2 meq/Kg
Lactonas	7,1 meq/Kg	0 - 18,8 meq/Kg
Ácidos totales	29,1 meq/Kg	8,7 - 59,5 meq/Kg
pH	3,9	3,4 - 6,1

Tabla 1.5. Composición química la miel.

*Se refiere a otros oligosacáridos de 3 o más monosacáridos y a polisacáridos.

Fuente: Belitz y col., 1988.

Hidratos de carbono.

La miel es la sustancia natural más compleja en su composición de azúcares. Éstos son los componentes mayoritarios, representan entre el 95 y el 99% del total de sólidos de este producto y contribuyen a darle su sabor dulce. Además son los responsables de muchas de las características fisicoquímicas como el poder rotatorio, la viscosidad, la higroscopicidad y la tendencia a la cristalización.

El origen de los azúcares de la miel es el néctar, pero también se forman por la acción de las enzimas segregadas por la abeja. Actualmente se han identificado aproximadamente 40 azúcares diferentes en este producto. A medida que la miel envejece la composición de azúcares se modifica, aumentando los oligo y polisacáridos y disminuyendo los monosacáridos.

Contenido de humedad.

El contenido de agua de una miel varía de un 13% a un 25%, y está relacionado con varios factores, entre ellos el clima, la flora, la zona geográfica, la proximidad y abundancia de la fuente de néctar, y el manejo por parte del apicultor.

El contenido de agua de la miel influye en su conservación por determinar en gran medida la actividad acuosa, influye sobre el comportamiento reológico, la palatabilidad, sabor, peso específico, solubilidad y valor comercial. Es un parámetro de clasificación de calidad por cuanto condiciona la cristalización, e indirectamente la fermentación ya que el aumento del contenido de agua superficial facilita el desarrollo microbiano.

Minerales.

En la miel se han hallado más de veinte elementos minerales, aunque algunos de ellos en muy pequeña cantidad (trazas), que provienen del néctar de la planta así como del polen que contiene la miel. El contenido de minerales tiene una marcada influencia sobre el color, el sabor y la acidez.

En la tabla 1.6 se muestra el contenido medio de minerales de mieles claras.

Mineral	Cantidad promedio (ppm)
Potasio	205
Cloro	52
Azufre	58
Sodio	18
Calcio	49
Fósforo	35
Magnesio	19
Silicio (como SiO ₂)	9

Tabla 1.6. Contenido de minerales en la miel.

Fuente: Crane y col. 1985.

Proteínas y aminoácidos.

El contenido proteico de la miel es muy bajo (0,1-0,2%). Se han identificado 7 proteínas, de las cuales cinco provienen de la abeja y dos de las plantas.

En la fracción nitrogenada de la miel además de proteínas hay aminoácidos en estado libre, de los cuales la prolina representa del 50 al 85% del total (Boniffacia y col., 1984).

Lípidos.

El contenido lipídico de la miel es muy pequeño, generalmente se encuentran micropartículas de cera incorporadas durante el procesado. Sin embargo, diversos autores (Smith y col, 1996; Pereyra y col, 1994) informaron el hallazgo de distintas clases de ácidos grasos dependiendo del tipo de miel analizada.

Vitaminas.

Aunque en cantidades pequeñas son varias las vitaminas que se hallan en la miel, siendo la más abundante la vitamina C. También se encuentran vitaminas del complejo B y las liposolubles A, D y K.

Aromas.

Independientemente de su dulzura, el sabor de la miel está estrechamente relacionado con su aroma, y ambas características dependen de cantidades muy pequeñas de sustancias complejas, que provienen de sus vegetales de origen. Entre estas sustancias se hallan ésteres de ácidos alifáticos y aromáticos, aldehídos, cetonas y alcoholes (Crane, 1980).

1.2.6. Actividad enzimática.

Una de las numerosas características que diferencian a la miel de otros edulcorantes es la presencia de enzimas. Desde el punto de vista alimenticio no tienen importancia; sin embargo, tienen un gran valor como indicadores de calidad, identidad y respuesta al calor y al almacenamiento (Crane, 1985).

1.2.7. Propiedades reológicas.

En las mieles naturales la variación de la viscosidad depende de factores como su contenido de agua, temperatura y origen floral. Las mieles presentan, en general, propiedades newtonianas; sin embargo, existe un grupo de ellas que tiene un comportamiento tixotrópico-pseudoplástico debido a su contenido relativamente alto de proteínas, es decir que cuando son sometidas a una fuerte y prolongada agitación su viscosidad disminuye notablemente, y si se las deja en reposo vuelven a su estado inicial.

1.2.8. Usos de la miel.

La miel encuentra uso en múltiples áreas de la industria alimenticia, en el campo farmacéutico, en cosmética y hasta con fines terapéuticos.

El 90% de la producción mundial de miel es para consumo directo, el restante 10% se destina a la elaboración de otros productos.

La Grange y col. (1988) resumen las funciones de la miel como ingrediente de los alimentos de la siguiente manera:

- i) *Humectancia*: la miel liga agua contribuyendo a la humedad de productos panificados, tendiendo a eliminar la sequedad de éstos e incrementando la textura del producto.
- ii) *Poder edulcorante*: la miel tiene un alto contenido de fructosa y puede sustituir al azúcar refinado en muchos productos alimenticios a base de cereales.
- iii) *Caramelización*: la miel se oscurece durante la cocción dando una coloración oscura a los productos panificados y una delicada crocancia a los cereales.
- iv) *Viscosidad*: los fabricantes de alimentos pueden usar la miel como elemento de recubrimiento y ligado de productos a base de cereales, lo cual resulta en un incremento del atractivo visual del producto y en una menor ruptura y densidad de éstos.
- v) *Sabor*: la miel imprime un sabor distintivo en los alimentos a los que se incorpora. Su presencia en los cereales les otorga características únicas que son percibidas por el consumidor como un valor agregado.

En la industria alimenticia la miel encuentra aplicaciones en productos de panadería, cereales para el desayuno, salsas y como endulzante y texturizante de frutas enlatadas, mermeladas, jaleas, conservas y productos untables (Considine y col., 1982). Crane (1975) menciona un importante número de productos alimenticios elaborados en diferentes países y que incluyen miel en su composición: el “Pain d’ épices” elaborado en Francia y Bélgica, el “Baseler Leckerli” es otra clase de pan aromatizado con miel que es producido en Suiza. En Alemania se fabrica el “Lebküchen”, en Italia se elabora el “Torone” que es un turrón con miel, almendras, nueces y frutos. La industria láctea elabora yogures con miel, como el “Ho-Mi” en Alemania y el “Leomiel” en Francia. En la fabricación de bebidas alcohólicas se utiliza la miel en la elaboración de hidromiel por fermentación alcohólica de miel diluida con agua (Crane, 1980). La miel también se agrega al jugo de uvas y de manzanas para obtener dos productos denominados “Pyment” y “Cyser”, respectivamente. También se puede llevar a cabo una fermentación acética con bacterias seleccionadas de manera de obtener vinagre de miel.

Desde el punto de vista nutricional la miel es un alimento de alto poder energético, ya que proporciona entre 300 y 320 Kcal /100g, debido a que es un alimento rico en hidratos de carbono. El resto de los componentes, proteínas, lípidos, vitaminas y sales minerales, se encuentra en cantidades muy pequeñas por lo que su aporte no es significativo desde el punto de vista nutricional.

1.3. La Harina de trigo.

1.3.1. Definición.

Con la denominación de harina, sin otro calificativo, se entiende el producto obtenido de la molienda del endosperma del grano de trigo (Código Alimentario Argentino, Capítulo 9, página 10, 2004).

El trigo es uno de los cereales más cultivados en todo el mundo, y al parecer unos de los primeros que el hombre comenzó a cultivar. Del trigo se obtiene la harina de trigo y de ésta el pan, alimento de consumo mundial.

Según el Código Alimentario Argentino (Capítulo 9, página 9, 2004) se entiende por trigo, la semilla sana, limpia y bien conservada de distintas variedades de *Triticum aestivum* y de *Triticum durum*.

El primero de ellos, también conocido como trigo pan, es el que se utiliza para la elaboración de panificados, y el segundo, también llamado trigo fideos, se utiliza para la elaboración de pastas.

1.3.2. Breve historia del trigo.

El trigo es un cereal creado por la naturaleza desde mucho antes que aparecieran los seres humanos. Desde que los hombres existen, el trigo ha proporcionado a nuestra especie una fuente importante de nutrientes y energía.

Aún no existe consenso sobre el lugar y tiempo exacto en el que aparecieron los primeros cultivos de trigo, pero lo que sí está bien establecido es que en la región Mediterránea muchas especies de trigo jugaron un rol muy importante como alimento de la población. El trigo tuvo un papel decisivo en el imperio romano, a tal punto que frecuentemente esta área es descripta como el "imperio del trigo", pero la gran migración desde el norte causó que el trigo sea desplazado durante un tiempo por el centeno. Durante la Edad Media el centeno era el alimento más importante en Europa. Luego de un período de lento progreso el trigo pasó a ser considerado como el mejor cereal para la alimentación, y la disponibilidad de trigo se consideraba como un signo de evolución. La calidad del trigo para la producción del pan mejoró, y este pan en una forma u otra se transformó en un alimento muy

importante para el mundo occidental. El trigo se transformó en un símbolo mundial, reflejando la situación alimenticia de millones de personas (Pomeranz, 1978).

1.3.3. Producción.

La Argentina produce alrededor de 15 millones de toneladas / año de trigo (ver tabla 1.7) siendo esta cantidad apenas el 1,25% de la producción mundial. De esa cantidad, aproximadamente 1/3 se consume en el país y 2/3 se exportan. En los últimos años el 60-70% de lo exportable lo adquiere Brasil, y el resto se reparte entre Chile, Irán, Perú, Egipto y otros países.

En la tabla 1.7 se muestra la producción de trigo durante la última década, con variaciones debidas fundamentalmente a condiciones climáticas y a las situaciones económicas imperantes. En los últimos años las políticas oficiales están orientadas a hacer más competitivo el trigo argentino para recuperar mercados mundiales que pagan mejor precio.

Periodo.	Producción (en millones de toneladas).	Periodo	Producción (en millones de toneladas).
96/97	15,914	02/03	12,301
97/98	15,000	03/04	14,563
98/99	12,400	04/05	15,960
99/00	15,300	05/06	16,214
00/01	15,960	06/07	14,600
01/02	15,292	07/08	15,400

Tabla 1.7. Producción de trigo en la Argentina durante la última década.

Fuente: *Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca*. 2008.

1.3.4. Clasificación del trigo.

Fuente: www.aaprotrigo.org 01/2008.

Trigo duro: también llamado trigo pan, es el más cultivado y se utiliza para la panificación.

Trigo blando: proporciona el grano que se utiliza para la fabricación de galletitas.

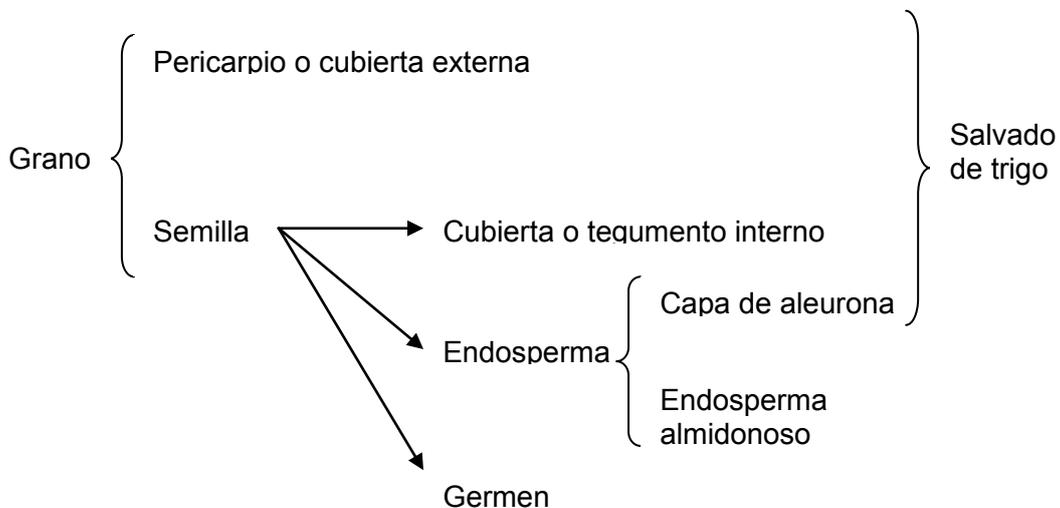
Trigo candeal: es muy apreciado en la industria fideera.

Trigo forrajero: **se lo utiliza como alimento de animales.**

Los dos primeros corresponden a *Triticum aestivum* con distinto porcentaje de proteínas y calidad de gluten; el tercero es *Triticum durum* con un grano más grande, de mayor porcentaje de proteínas y con un endosperma más vítreo.

1.3.5. Estructura del grano de trigo.

En el grano de trigo se pueden distinguir dos estructuras principales: el pericarpio o cubierta externa y la semilla. A esta última se la puede dividir en: cubierta o tegumento interno, germen y endosperma, este último formado por la capa de aleurona y el endosperma almidonoso. Tanto el pericarpio como el tegumento interno y la aleurona constituye lo que se conoce como salvado de trigo. El siguiente esquema resume lo anteriormente dicho:



1.3.6. Componentes del grano de trigo.

El grano de trigo está compuesto por hidratos de carbono, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales y agua. El contenido de humedad no debe ser superior al 14%, para evitar el crecimiento microbiano y otras alteraciones que se pueden producir durante el almacenamiento.

Hidratos de carbono.

Representan alrededor del 70% del peso del grano. Entre los hidratos de carbono se encuentran: almidón, pectinas, celulosa, hemicelulosa, pentosanos, dextrinas, maltotriosa, sacarosa, glucosa, maltosa y fructosa.

El almidón se localiza en gránulos en el endosperma almidonoso, y existe un gradiente de concentración que disminuye hacia la periferia (Pomeranz, 1978).

Cuando se calientan dispersiones acuosas de almidón, los gránulos se hinchan y pierden su birrefringencia característica. La amilosa pasa a la solución y aumenta la viscosidad del medio. Este proceso se conoce como gelatinización.

Proteínas.

Se encuentran en el endosperma, el germen y el pericarpio. En el endosperma las proteínas tienen un gradiente de concentración inverso al del almidón, aumentando hacia afuera. Representan aproximadamente el 10-12% p/p del grano y se las puede dividir en dos grandes grupos, el primero comprende a las albúminas y globulinas, mientras que el segundo grupo comprende a las proteínas de almacenamiento gliadinas y gluteninas.

Las gliadinas comprenden un grupo heterogéneo de proteínas, que se clasifican por su movilidad electroforética en geles con buffer lactato de aluminio, en gliadinas α , β , γ y ω (Woychik y col., 1961).

Las gluteninas se considera que son complejos de alto peso molecular formados por subunidades unidas por puentes disulfuro (Kasarda y col., 1978).

Lípidos.

La distribución de lípidos en el grano de trigo es muy variable. Del total de los lípidos el 70% corresponde a lípidos no polares, el 20% a glicolípidos y el 10% a fosfolípidos. El germen alberga a la mayor cantidad de lípidos, predominando los

fosfolípidos. Los lípidos polares del salvado contienen más fosfolípidos que glicolípidos, mientras que en el endosperma se da lo contrario.

1.3.7. La harina de trigo como alimento.

La harina de trigo es una importante fuente de calorías y carbohidratos en la alimentación occidental, en numerosas regiones en vías de desarrollo, representan el principal aporte de proteínas. Esto constituye un problema, ya que las proteínas de trigo son de baja calidad nutricional, siendo pobres en lisina, uno de los aminoácidos esenciales. Por este motivo, es conveniente complementarlas con proteínas de alto valor biológico, como las proteínas de suero de leche.

Si bien su calidad nutricional es pobre, las proteínas de almacenamiento de la harina de trigo son capaces de formar la estructura viscoelástica del gluten.

El gluten es el material viscoelástico que se forma cuando una masa de harina se lava con agua para separar el almidón y otros componentes solubles. La composición proteica del gluten consiste principalmente en gliadinas y gluteninas. Las gliadinas le confieren extensibilidad, mientras que las gluteninas le confieren elasticidad y firmeza (Schofield y col., 1983).

Además de los puentes disulfuro, los enlaces no covalentes tienen una considerable importancia en las interacciones entre subunidades de gluteninas y entre gluteninas, gliadinas y otras proteínas del trigo (Schofield y col., 1983).

Las subunidades de gluteninas de alto peso molecular han sido objeto de numerosos estudios por su importancia en la formación del gluten. Excepto en los extremos N- y C- terminales tienen secuencias repetidas ricas en prolina, glutamina y glicina. Los extremos N- y C- terminales contienen la mayor parte, si no todos, los residuos de cisteína que forman los puentes disulfuro intercatenarios. Los enlaces disulfuro se consideran esenciales para la viscoelasticidad del gluten. Se ha propuesto un modelo en el cual las subunidades de gluteninas de alto peso molecular interactúan con subunidades de gluteninas de bajo peso molecular a través de puentes disulfuro, y con gliadinas a través de enlaces no covalentes (Shewry y col. 2001).

Objetivos.

Hasta el momento las propiedades estructurales y funcionales de los geles de CPL han sido estudiadas por diferentes autores en distintas condiciones de pH y fuerza iónica. Sin embargo no existe información disponible sobre las propiedades de estos geles en presencia de ingredientes complejos tales como la miel y la harina de trigo.

Los objetivos del presente trabajo son:

- Estudiar el efecto de la miel y la harina de trigo sobre las propiedades estructurales y funcionales de los geles de CPL preparados a distintos pHs.
- Generar una alternativa más de uso del lactosuero que se produce en la industria quesera, incorporando ingredientes de alta producción nacional.
- Evaluar la posibilidad de uso de los geles de CPL/miel/harina de trigo como un alimento funcional de alto valor nutricional.

2. Materiales y métodos.

2.1. Materiales utilizados.

El CPL fue preparado por ultrafiltración a gran escala y donado por la empresa Williner S.A. (Rafaela, Santa Fe, Argentina). Composición del CPL utilizado: 49,3% de proteínas {calculados como [nitrógeno total (8%) – nitrógeno no proteico (0,3%)] x 6,38}, 5,1% de humedad, 6,0% de cenizas, 5,6% de lípidos y 32,3% de lactosa (estimada por diferencia). El índice de solubilidad del nitrógeno fue 80,9% a pH 7,0 y 70,8% a pH 4,75.

La miel fue cosechada en la provincia de Buenos Aires y contenía 16,9% de humedad, 76,3% de glucosa más fructosa y 1,7% de sacarosa.

La harina de trigo fue donada por molino Miguel Campodónico Ltda. (La Plata, Buenos Aires, Argentina) y contenía 10% de proteínas y 13% de humedad.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

2.2. Preparación de las muestras.

Preparación de dispersiones y geles de CPL, CPL-miel y CPL-miel-harina.

Se prepararon las siguientes dispersiones acuosas de CPL, CPL-miel y CPL-miel-harina:

- a) 10% (p/p) de proteínas del suero con las siguientes cantidades de miel, (%p/p): 0; 10; 20; 27,5; 32,5 y 37,5.
- b) 10% (p/p) de proteínas del suero con las siguientes cantidades de miel (%p/p): 0; 10; 20 o 25; y harina de trigo (%p/p): 0; 10 y 20.

Las dispersiones se llevaron a pH 3,75; 4,2 y 7,0 con HCl 1-3 N o NaOH 1N. Estas dispersiones se colocaron dentro de tubos de vidrio (2,2 cm de diámetro interno y 6 cm de altura) cerrados con tapones de goma tanto en su parte superior (tapón de goma perforado) como inferior (tapón de goma sin perforar) (figura 2.1). Luego se llevó a cabo la gelificación por calentamiento de los tubos en un baño de agua a 87°C durante 45 minutos, de acuerdo a la técnica descrita por Shimada y col. (1988). Durante el primer minuto de calentamiento los tubos se dejaron destapados a través del tapón de goma perforado para eliminar gases, pasado este tiempo se cerraron herméticamente con un tubo de plástico cerrado. Al cabo de los 45 minutos los tubos con la muestra fueron enfriados rápidamente a temperatura

ambiente con agua de la canilla y guardados a 4°C durante al menos 15 horas antes de cada análisis. Previo a las determinaciones, los geles se dejaron a temperatura ambiente hasta lograr el equilibrio térmico.

Las muestras para calorimetría diferencial de barrido (DSC) fueron preparadas de la manera arriba descrita pero sin calentar, pues se trabaja con las dispersiones y no con los geles.

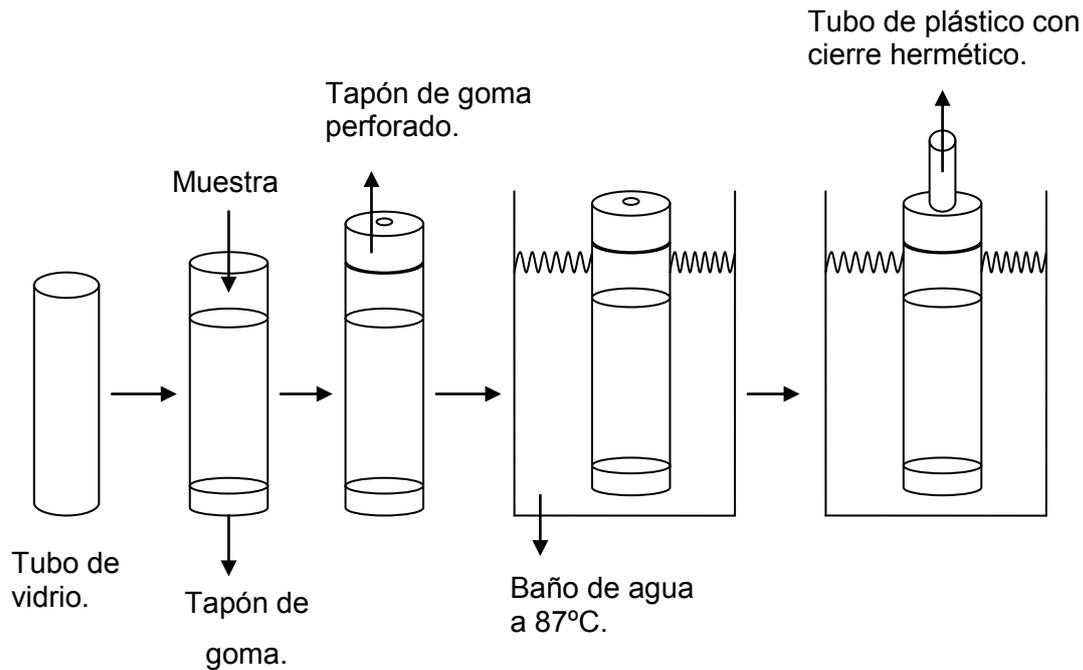


Figura 2.1. Dispositivo para obtener los geles.

2.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Fundamentos de la técnica de DSC.

Muchas transformaciones que suceden en los alimentos involucran un intercambio calórico; por ejemplo, la congelación del agua, los cambios de fase de los lípidos, las transiciones cristalinas, la desnaturalización de proteínas y la gelatinización del almidón, entre otras. Estos cambios entálpicos pueden detectarse mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido. En esta metodología se mide el flujo calórico diferencial requerido para mantener una muestra del material en estudio y una referencia térmicamente inerte a la misma temperatura. Si en la muestra en estudio tiene lugar una transformación acompañada de una absorción o

liberación de calor, ésta es registrada como una endoterma o una exoterma según el proceso que sufra la muestra (Lund, 1983).

La muestra y la referencia son colocadas en cápsulas de aluminio selladas herméticamente y ubicadas en la celda del equipo (figura 2.2). La capacidad de estas cápsulas es de 10 a 20 μL . La calibración del instrumento se realiza generalmente con sustancias de alta pureza, de entalpía y punto de fusión conocidos. El más utilizado es el Indio ($\Delta H_{\text{fusión}} = 28,424 \text{ J/g}$; Punto de fusión = $156,4^\circ\text{C}$).

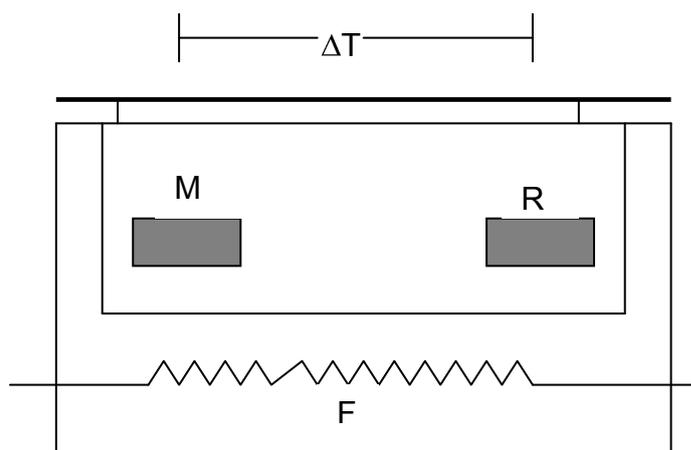


Figura.2.2. Esquema de la celda utilizada en calorimetría diferencial de barrido. M: muestra, R: referencia, F: fuente térmica, ΔT : diferencia de temperatura.

La determinación de la entalpía del proceso bajo estudio requiere de la medida del área de la endo o exoterma. El procedimiento más aceptado para la determinación de esta área es el descrito por Lund (1983) y se ilustra en la figura 2.3. Los puntos de intersección T_i y T_f representan las temperaturas inicial y final de la transición. La línea de base comienza en el punto de inflexión de la izquierda y termina en el de la derecha. T_p representa la temperatura de pico o temperatura aparente de transición.

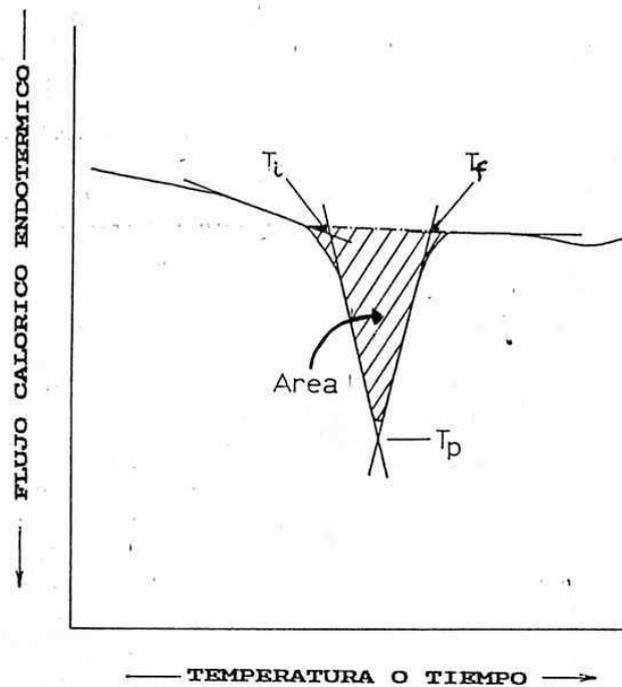


Figura 2.3. Determinación de la línea de base, área, temperaturas inicial (T_i) y final (T_f) en una endoterma típica de calorimetría diferencial de barrido (Lund, 1983).

El área así medida se relaciona con el cambio entálpico mediante una fórmula y se refiere a la masa de muestra.

Metodología.

Se utilizó un calorímetro Rheometric Scientific (Rheometric Scientific Ltd., Epsom, Surrey, UK) calibrado con Indio. Muestras de 8 a 15 mg de las dispersiones de CPL, CPL-miel y CPL-miel-harina, se colocaron en cápsulas herméticas de aluminio, y como referencia se usó una cápsula doble vacía. Tanto las muestras como la referencia fueron calentadas entre 25 y 120°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Los diagramas calorimétricos fueron impresos en un registrador Hewlett Packard 7046 B.

En los ensayos del presente trabajo, el área es calculada por el software del equipo al cual sólo hay que indicarle dónde comienza y dónde termina la endoterma, y de manera automática realiza el cálculo del cambio entálpico y de la temperatura de pico. De las endotermas obtenidas se calculó la temperatura aparente de transición para la desnaturalización de proteínas (T_p) y para la gelatinización del almidón (T_a), y la entalpía para la desnaturalización de proteínas

(ΔH_p) y para la gelatinización del almidón (ΔH_a). Se hicieron dos determinaciones como mínimo para cada condición.

2.4. Microscopía electrónica de barrido (MEB).

Fundamentos de la técnica de MEB.

Una condición fundamental que debe cumplir la muestra para poder ser analizada por MEB es que ésta debe ser conductora, si no lo es, se la transforma en conductora recubriéndola con una fina capa metálica que en la mayoría de los casos es una capa de oro. Los microscopios electrónicos disponen básicamente de: un cañón de electrones que emite dichas partículas para que choquen contra la muestra creando una imagen aumentada de ésta; lentes magnéticas para crear campos que dirigen y enfocan el haz de electrones; un sistema de vacío que es una parte relevante del microscopio electrónico, pues de otra manera los electrones podrían ser desviados por las moléculas del aire, y un sistema que registra la imagen que producen dichos electrones. Un microscopio electrónico de barrido crea una imagen ampliada de la superficie de un objeto por exploración de la superficie de la muestra punto por punto. Su funcionamiento se basa en recorrer la muestra con un haz muy concentrado de electrones; éstos pueden dispersarse de la muestra o provocar la aparición de electrones secundarios. Los electrones dispersados y los secundarios son recogidos y contados por un dispositivo electrónico situado a los lados de la muestra. Cada punto leído de la muestra corresponde a un píxel en un monitor. Cuanto mayor sea el número de electrones contados por el dispositivo, mayor será el brillo del píxel en la pantalla. A medida que el haz electrónico barre la muestra, se presenta toda la imagen de la misma en el monitor. Los microscopios electrónicos de barrido pueden ampliar los objetos 200.000 veces o más. Este tipo de microscopio es muy útil porque produce imágenes de la superficie del objeto (Breton, 2004).

Metodología.

Las muestras de geles se fijaron por triplicado en glutaraldehído al 2,5%, se deshidrataron con acetona al 25, 50, 70, 90 y 3 veces al 100%v/v y se secaron al punto crítico (Sorrivas de Lozano y col., 1983). La muestras secas se recubrieron

con una película de oro de aproximadamente 300 Å en un equipo Sputter Coater model 3 PELCO 91000 (Ted Pella Inc., CA, USA), y se observaron con un microscopio electrónico de barrido JEOL 35 CF (Tokio, Japan) a un voltaje de aceleración de 5kV y una amplificación de 1000X y 4000X.

2.5. Solubilidad de los componentes proteicos de los geles.

Fundamentos de los ensayos de solubilidad.

Con el objeto de estudiar las interacciones involucradas en el mantenimiento de la estructura de los geles, éstos fueron dispersados en 4 solventes de extracción diferentes: agua destilada (AD), buffer de pH 8,0 (0,086M Tris, 0,09M glicina, 4mM Na₂EDTA) (B), el mismo buffer pero conteniendo 0,5% de dodecil sulfato de sodio (SDS) y urea 8M (BSU) (Lupano y col., 1992, 1996; Shimada y col., 1988) y, sólo para los geles de pH 7,0, BSU más 1% de β-mercaptoetanol (BSUME). Estos solventes tienen la capacidad de romper distintas uniones: B rompe interacciones electrostáticas; BSU rompe interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y puentes de hidrógeno; BSUME ídem anterior más puentes disulfuro.

Metodología.

Se colocaron muestras de geles (0,050g) en sendos tubos de ensayo, y se les agregó 5 ml de cada uno de los solventes mencionados, de manera tal que la concentración final de proteínas fue de 0,1% p/V. Estas muestras fueron homogeneizadas a temperatura ambiente con un Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik, Stauffen, Germany) a 8000 rpm durante 1 min., y luego centrifugadas a 17400 rpm durante 30 min. a 20°C. Se determinó la solubilidad proteica en los sobrenadantes, y se expresó como: (contenido proteico en el sobrenadante/contenido proteico total) x 100. Para cada muestra se hicieron 3 extracciones independientes con cada solvente, y se informaron los valores medios con la respectiva desviación estándar. La concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó con un espectrofotómetro Beckam DU 650 (California, USA) a 280 nm, con valores de $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ de 8,636 para las muestras extraídas con agua destilada (Lupano y col., 1996) y de 10,2 para las muestras extraídas con los

otros solventes (Lupano y col., 1996; Shimada y col., 1988). El contenido proteico total se determinó por el método de Kjeldhal ($N \times 6,38$).

2.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) de los constituyentes proteicos de los geles.

Fundamentos de la electroforesis.

Cuando se aplica un campo eléctrico a una solución, las moléculas de soluto con carga neta positiva se desplazan hacia el cátodo y las moléculas con carga neta negativa se desplazan hacia el ánodo. Este desplazamiento se denomina electroforesis. Conduciendo el movimiento está la fuerza $q \times E$ ejercida por el campo eléctrico sobre la partícula, donde q es la carga de la molécula (en Coulombios) y E es la fuerza del campo eléctrico (en voltios por metro). Resistiendo el movimiento está la fuerza de fricción $f \times v$ que ejerce el entorno sobre la partícula, siendo v la velocidad de la partícula y f su coeficiente de fricción, que depende del tamaño y de la forma de la molécula.

Cuando aparece el campo eléctrico, la molécula se acelera rápidamente hasta alcanzar una velocidad en la que estas fuerzas se equilibran, y luego se mueve a velocidad constante. En esta condición se cumple:

$$f \times v = q \times E \quad (1)$$

Si reordenamos esta ecuación como $v/E = q/f$ para expresar la velocidad del movimiento por unidad de fuerza del campo, a este cociente se lo denomina movilidad electroforetica (μ) de la molécula:

$$\mu = v/E = q/f \quad (2)$$

Puesto que f depende del tamaño y de la forma de la molécula, la ecuación 2 nos indica que la movilidad de una molécula depende de su carga y de sus dimensiones moleculares.

En la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) se trabaja en condiciones desnaturizantes. El SDS disocia

la proteína en subunidades y despliega por completo cada cadena polipeptídica formando un complejo polipéptido-SDS cilíndrico y largo. En este complejo la cadena polipeptídica se halla recubierta por una capa de moléculas de SDS con los grupos sulfato del detergente expuestos al medio acuoso. Estos complejos tienen una relación constante de SDS a proteína y difieren solamente en la masa. La velocidad de migración de cada polipéptido tratado con SDS en un gel de tamiz molecular que contiene SDS está determinada principalmente por su peso molecular. El campo eléctrico suministra solamente la fuerza impulsora (Lenhinger y col., 2ª edición).

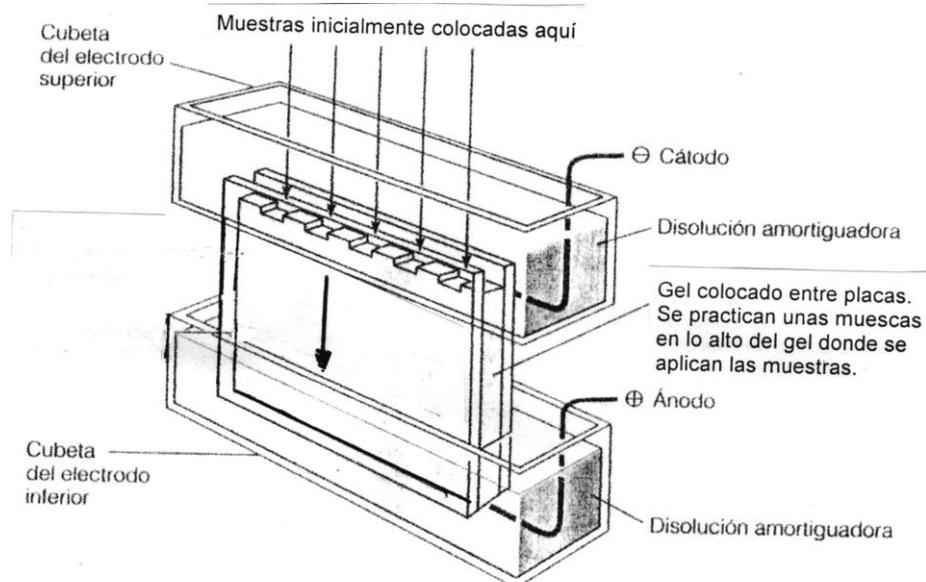


Figura 2.4. Esquema del equipo utilizado para realizar una SDS-PAGE.

Metodología.

La SDS-PAGE se realizó de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). Se utilizó un gel de separación con un gradiente lineal (5-15% de poliacrilamida, con una relación de acrilamida/bisacrilamida de 75:2). Los buffer utilizados fueron: Tris-HCl 0,375M, 0,1% SDS, pH 8,8 para el gel de separación, y Tris-HCl 0,025M, glicina 0,192M, 0,1% SDS, pH 8,3 para el buffer de corrida. La solución de proteínas (10 mg de proteínas de lactosuero/ml) se diluyó en un volumen igual de buffer de muestra (Tris-HCl 0,01M, EDTA 0,001M, SDS 1%, β -mercaptoetanol (β - ME) 5% v/v y glicerol 30% v/v, pH 8,0) y se calentó a 100°C en

baño María durante 5 minutos antes de sembrar. Se usaron marcadores de bajo peso molecular (Amersham Pharmacia Biotech, Inc. Calibration kit, Upsala, Sweden) que incluían: fosforilasa b (94,000), seroalbúmina bovina (67,000), ovoalbúmina (43,000), anhidrasa carbónica (30,000), inhibidor de tripsina de soja (20,100) y alfactoalbúmina (14,400). Se sembraron 5 μ L de las muestras y 3 μ L de los marcadores de peso molecular. La intensidad relativa de las bandas fue determinada con un analizador Gel Doc 1000 Image Analysis System (Bio Rad, Richmond, CA, USA) y los resultados se analizaron con el programa Molecular Analyst software Version 1.5 (Bio Rad, Richmond, CA, USA). De cada muestra se corrieron dos replicados independientes.

Dado que la miel no modifica apreciablemente la solubilidad de los constituyentes proteicos de los geles, se analizaron por electroforesis sólo los geles con distintos contenidos de harina de trigo.

2.7. Capacidad de retención de agua (CRA).

Metodología.

La CRA puede ser medida como el agua remanente en la muestra luego de someterla a una fuerza suave como la centrifugación a baja velocidad. Para esto un disco de gel de aproximadamente 2 mm de alto y 2,2 cm de diámetro se cortó en dos porciones. Cada una de ellas fue colocada sobre una membrana plana de nylon (poros de 5,0 μ m, Micronsep) y mantenida en la posición media de un tubo de centrifuga de 50 ml tal como se muestra en la figura 2.5. La pérdida de agua se determinó pesando la muestra antes y después de centrifugarla a 120xg durante 5 min. (Quéguiner y col., 1989). La CRA se expresó como el porcentaje del agua inicial remanente en el gel luego de la centrifugación. Los valores mostrados son el promedio (\pm desvío estándar) de al menos dos determinaciones.

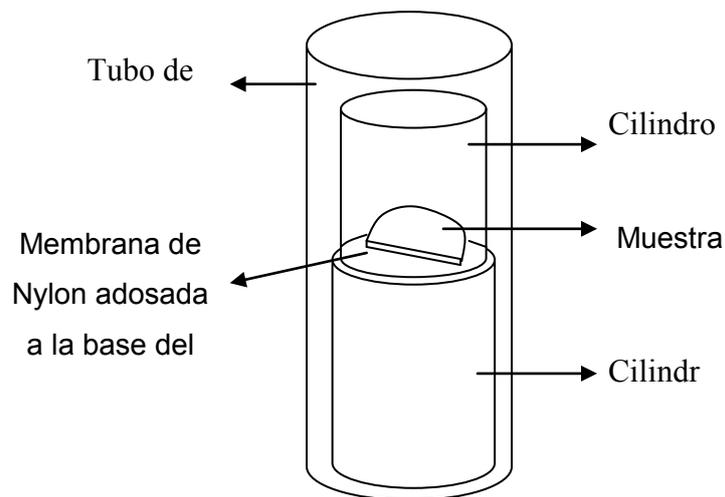


Figura 2.5. Esquema del dispositivo utilizado para la determinación de la CRA de los geles.

2.8. Determinación del color de los geles.

Fundamento.

A lo largo del tiempo se han desarrollado diversos modelos que intentan formalizar el estudio del color generando lo que se conoce como espacios de color; uno de ellos es el denominado: “Espacio Hunter”. Este modelo se basa en la teoría de los colores opuestos, la que postula la existencia de una especie de interruptor entre los receptores de la retina y el nervio óptico, de manera que las respuestas rojas son comparadas contra los colores verdes (dimensión a), las respuestas amarillas contra las azules (dimensión b) y las blancas contra el negro (dimensión L).

Idealmente el espacio Hunter es un prisma rectangular (figura 2.6) donde la expresión numérica de un color se realiza presentando los parámetros de luminosidad ($L=0$ indica negro, $L=100$ indica blanco), grado de rojo (a) o de su opuesto verde ($-a$) y el grado de amarillo (b) o de su opuesto azul ($-b$). Este diagrama es apropiado para interpretar diferencias de color (McGuire, 1992).

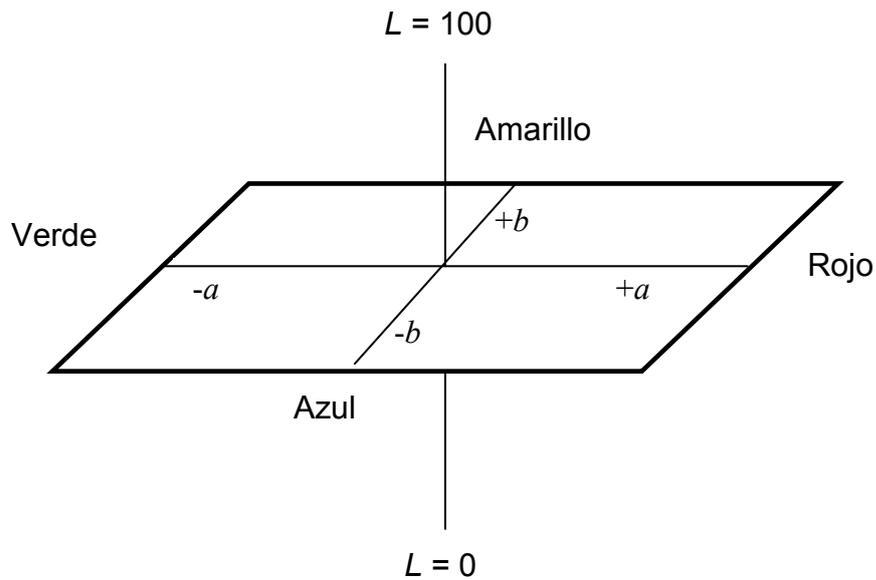


Figura 2.6. Representación del espacio Hunter.

Metodología.

El color superficial se midió sobre discos de gel de aproximadamente 2 mm de alto y 2,2 cm de diámetro utilizando un Chromameter CR 300 Minolta (Osaka, Japón) por medio del cual se determinaron los parámetros de Hunter.

2.9. Propiedades reológicas. Textura.

Fundamento.

El análisis de textura cuantifica el comportamiento mecánico del alimento sometiéndolo a una fuerza definida y midiendo la curva de deformación resultante. El objetivo es simular acciones como cortar, esparcir, masticar y deglutir.

Del análisis de las curvas fuerza versus tiempo se obtiene un cierto número de parámetros como la adhesividad, cohesividad, firmeza, elasticidad, y tiempo de relajación. La figura 2.7 muestra una curva típica del análisis de perfil de textura (TPA) de 2 ciclos de compresión.

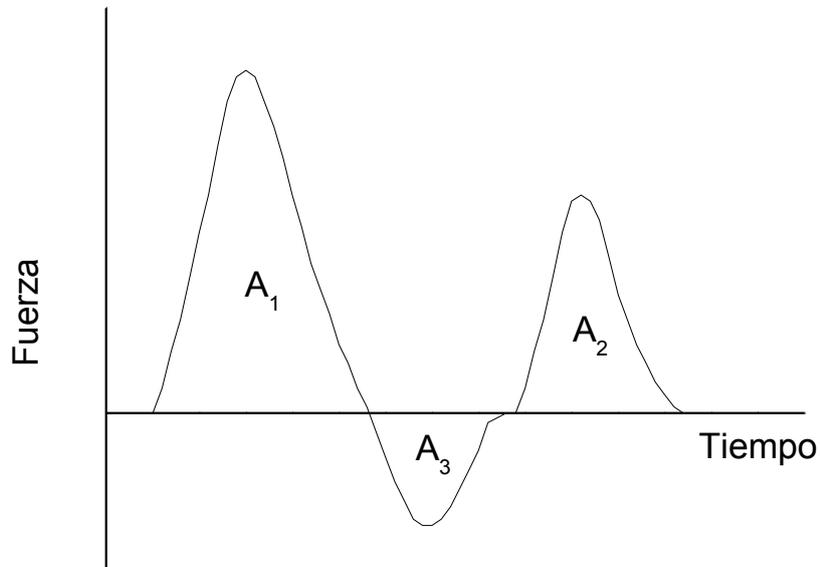


Figura 2.7. Curva típica del análisis de perfil de textura (TPA) de 2 ciclos de compresión.

De dicha curva se puede obtener la adhesividad y cohesividad, que de acuerdo a Bourne (1978) se definen de la siguiente manera:

- a) Adhesividad: es el área de fuerza negativa (A_3) obtenida luego del primer ciclo de compresión, y representa el trabajo necesario para alejar la sonda de compresión de la muestra.
- b) Cohesividad: es la relación del área de fuerzas positivas de la primera y segunda compresión (A_2/A_1).

La figura 2.8 muestra una curva de fuerza versus tiempo de un ciclo compresión en la que la muestra se comprime un determinado porcentaje y esta compresión se mantiene durante un cierto período de tiempo, hasta que la fuerza se mantenga casi constante en el tiempo, por ejemplo, durante 20 min. (F_{20}).

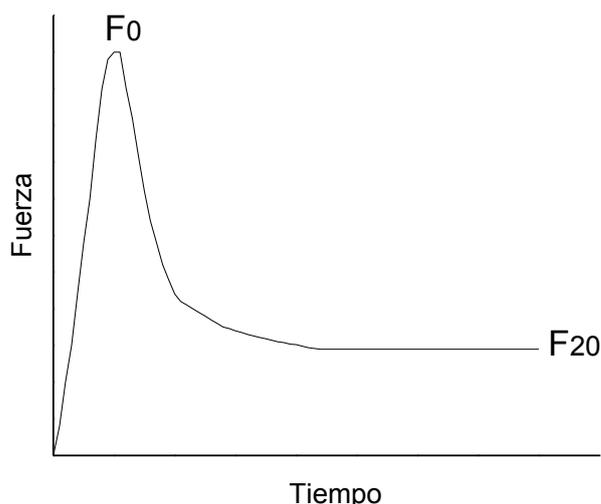


Figura 2.8. Curva de fuerza versus tiempo de un ciclo de compresión.

De dicha curva se puede obtener la firmeza, la elasticidad y el tiempo de relajación, que de acuerdo a Peleg (1979) se definen de la siguiente manera:

- a) Elasticidad: se calcula como la relación F_{20} / F_0 .
- b) Tiempo de relajación: es el tiempo para el cual $F=(F_0 + F_{20})/2$.
- c) Firmeza: es la fuerza máxima que se produce durante la compresión (F_0).

Metodología.

El análisis de textura se realizó sobre una sección de gel de 22 mm de diámetro por 20 mm de altura, con un texturómetro TA.XT2 Texture Analyzer (Stable Micro Systems Ltd., England) en el modo de compresión. La compresión fue ejercida por una sonda cilíndrica de sección plana (75 mm de diámetro) a una velocidad de desplazamiento de 1 mm/s. La firmeza del gel se midió al 20% (4 mm) de compresión, la cual se mantuvo durante 20 minutos, y se registró la fuerza ejercida sobre la sonda. La elasticidad del gel se calculó de acuerdo a la relación F_{20} / F_0 , siendo F_{20} la fuerza ejercida a los 20 min. de iniciada la compresión. El tiempo de relajación se obtuvo como el tiempo en el cual se cumple que $F = (F_0 + F_{20})/2$ (Peleg, 1979). Las medidas de adhesividad y cohesividad de los geles fueron llevadas a cabo con 2 ciclos de compresión, como se describió anteriormente. Los valores mostrados son el promedio (\pm desviación estándar) de al menos 3 determinaciones.

2.10. Propiedades reológicas. Viscoelasticidad.

Fundamento. (Schramm, 1991)

Introducción teórica a la viscoelasticidad.

El comportamiento elástico de un material se puede representar por un resorte que sigue la ley de Hooke (1), y el viscoso por un amortiguador que sigue la ley de Newton (2):

$$\tau_E = G \gamma_E \quad (1)$$

donde τ_E es el esfuerzo de corte, γ_E la deformación y G es un módulo constante del resorte.

$$\tau_V = \eta \bar{u}_V \quad (2)$$

donde τ_V es el esfuerzo de corte, \bar{u}_V la velocidad de corte y η la viscosidad.

Cuando se somete la muestra a una deformación oscilatoria, la expresión para dicha deformación puede escribirse como:

$$\gamma = \gamma_0 \text{sen}(\omega t) \quad (3)$$

donde γ_0 es la deformación máxima o amplitud, ω la frecuencia de oscilación angular y t es el tiempo. Si se reemplaza la ecuación (3) en la (1), se obtiene para el esfuerzo de corte resultante que actúa sobre el resorte, una función seno (4), indicando que la deformación aplicada y el esfuerzo de corte elástico se encuentran en fase.

$$\tau_E = G \gamma_0 \text{sen}(\omega t) \quad (4)$$

Derivando la ecuación (3) respecto del tiempo y reemplazando en la ecuación (2) se obtiene una función coseno para el esfuerzo de corte viscoso (5) que se encuentra 90° fuera de fase con respecto a la deformación aplicada.

$$\tau_v = \eta \omega \gamma_0 \cos(\omega t) \quad (5)$$

Observando las ecuaciones (4) y (5) se encuentra que la diferencia de fase entre la deformación aplicada y el esfuerzo de corte de respuesta indica cuán viscoelástica es la muestra. Si la diferencia de fase es 0° el material es puramente elástico, si es 90° es puramente viscoso y si está entre 0° y 90° , es viscoelástico.

Introducción experimental a la viscoelasticidad.

El esfuerzo de corte resultante τ , en general está defasado de la deformación aplicada por un ángulo ϕ y puede escribirse como:

$$\tau = \tau_0 \text{sen}(\omega t + \phi) \quad (6)$$

donde ϕ es la diferencia de fase y τ_0 la amplitud del esfuerzo de corte.

Expandiendo la ecuación anterior trigonométricamente, se obtiene:

$$\tau = \tau_0 [\cos \phi \text{sen}(\omega t) + \text{sen} \phi \cos(\omega t)] \quad (7)$$

Esta expresión contiene tanto la contribución elástica como la viscosa.

La relación entre la amplitud del esfuerzo de corte y la deformación máxima se denomina módulo complejo, G^* :

$$G^* = \tau_0 / \gamma_0 \quad (8)$$

El mismo es una medida de la resistencia total del material a la deformación aplicada.

La energía almacenada durante la deformación está representada por el módulo elástico o de almacenamiento, G' , mientras que la energía disipada en el elemento viscoso está representada por el módulo viscoso o de pérdida, G'' :

$$G' = G^* \cos \phi \quad (9)$$

$$G'' = G^* \sin \phi \quad (10)$$

Si la muestra es puramente elástica, $\phi = 0^\circ$, $G' = G^*$ y $G'' = 0$. Si la muestra es puramente viscosa, $\phi = 90^\circ$, $G'' = G^*$ y $G' = 0$.

El módulo complejo se relaciona con G' y G'' a través de la siguiente ecuación:

$$G^* = [(G')^2 + (G'')^2]^{1/2} \quad (11)$$

Como función alternativa al módulo complejo, se define la viscosidad compleja, η^* como:

$$\eta^* = G^* / \omega = (\tau_0 / \gamma_0) / \omega \quad (12)$$

que es una medida de la magnitud de la resistencia total de la muestra al esfuerzo de corte dinámico.

Otra función que se usa habitualmente para describir el comportamiento viscoelástico de un material es la tangente del ángulo de defasaje. La misma es proporcional a la energía disipada / energía almacenada por ciclo.

$$\tan \phi = G'' / G' \quad (13)$$

Por simplicidad los resultados experimentales de las medidas dinámicas se expresan frecuentemente en términos de G' , G'' , $\tan \phi$ o η^* como función de la temperatura a una frecuencia angular constante, o como función de la frecuencia angular a una temperatura constante.

Modelos empíricos.

Se han desarrollado modelos empíricos en los que los materiales viscoelásticos también pueden comportarse como sólidos o como líquidos. Giboreau y col. (1994) distinguen tres tipos de comportamiento viscoelástico, dentro del rango de viscoelasticidad lineal, de acuerdo al espectro mecánico (variación de G' y G'' con la frecuencia de oscilación angular ω) (figura 2.11): fluidos

viscoelásticos (soluciones macromoleculares diluidas) (figura 2.11a), en los que las propiedades viscosas predominan; soluciones macromoleculares semidiluidas (figura 2.11b), en las que a medida que la frecuencia aumenta G' se hace mayor que G'' ; y los materiales tipo gel (figura 2.11c), cuyo valor de G' es mayor que G'' en todo el rango de frecuencia. Este último entraría dentro del rango de los sólidos viscoelásticos, mientras que las soluciones macromoleculares semidiluidas tendrían un comportamiento intermedio entre un líquido y un sólido viscoelástico.

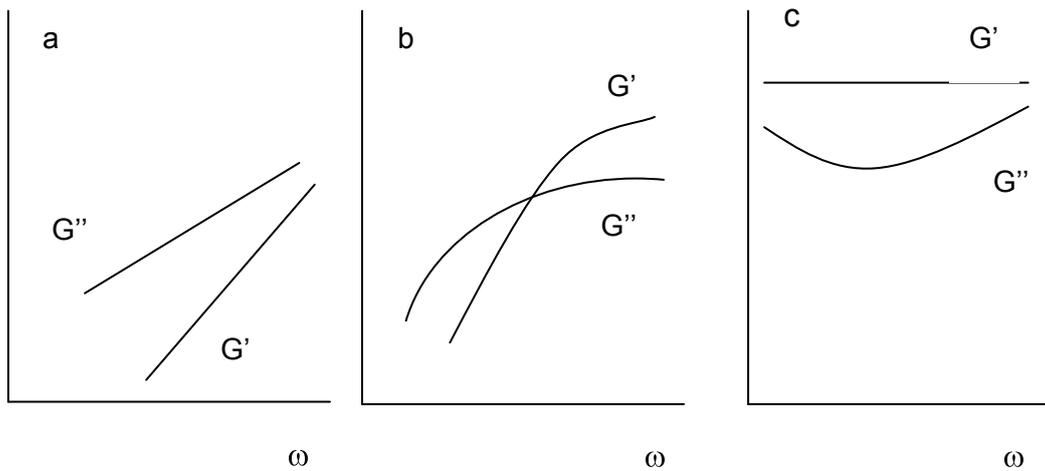


Figura 2.11. Espectros mecánicos de: solución macromolecular diluida (a); solución macromolecular semidiluida (b) y gel (c).

Ross-Murphy (1995) también distingue para los materiales viscoelásticos tres tipos de comportamiento, con los mismos espectros mecánicos que los presentados en la figura 2.11: las soluciones entrelazadas (figura 2.11a), los geles débiles (figura 2.11b) y los geles fuertes (figura 2.11c). Además analiza la variación de la viscosidad compleja, η^* , con la frecuencia de oscilación angular, que es diferente para cada tipo de material (figura 2.12).

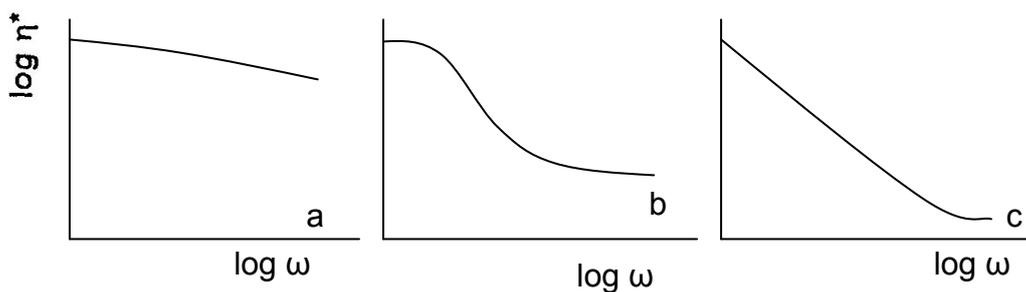


Figura 2.12. Viscosidad compleja en función de la frecuencia de oscilación angular (espectro mecánico) de soluciones entrelazadas (a), geles débiles (b) y geles fuertes (c). Ross-Murphy (1995).

Caracterización de un material viscoelástico.

Para caracterizar un material viscoelástico por medio de medidas oscilatorias de propiedades dinámicas, el material debe someterse a la siguiente secuencia de ensayos:

- i) *Barrido de deformación*, para localizar el rango de viscoelasticidad lineal.
- ii) *Barrido de frecuencia*, para caracterizar el grado de viscoelasticidad de la muestra a varias escalas de tiempo.
- iii) *Barrido de tiempo*, para entender la cinética de formación del gel.
- iv) *Barrido de temperatura*, para estudiar cómo se altera la viscoelasticidad de la muestra con las variaciones de temperatura.

Metodología.

Los ensayos se llevaron a cabo en un reómetro Haake CV 20 (Karlsruhe, Alemania), utilizando un sensor de platos paralelos con una separación de 1 mm entre ambos platos. El equipo se programó de manera tal que en todos los casos las medidas las realizara por triplicado. Las muestras, dispersiones de CPL de pH 3,75; 4,2 y 7,0 preparadas en agua destilada y a distintas concentraciones de miel y harina de trigo, se colocaron (1 ml) sobre el plato inferior termostatzado a 87°C durante 45 minutos para permitir su gelificación. Para prevenir la deshidratación de la muestra se adicionó silicona de baja viscosidad alrededor del borde de los platos.

El rango de viscoelasticidad lineal se determinó, luego de la gelificación, midiendo G^* en función de la deformación (barrido de deformación). En base a estos resultados, los barridos de frecuencia y tiempo de todas las muestras se realizaron a la misma deformación ($d = 10\%$), dentro de los límites de la linealidad.

Para la caracterización viscoelástica de las muestras se realizó, luego de la gelificación, un barrido de frecuencias donde se analizó la variación de G' , G'' y η^* en función de la frecuencia de oscilación angular, y se compararon los resultados con los modelos anteriormente descriptos. También se analizó la variación de la

Tan ϕ ($\omega = 1$ rad/seg) en función de la concentración de miel, harina de trigo y pH. Los datos experimentales fueron ajustados con la siguiente ecuación (Steffe, 1996):

$$G' = a\omega^b \quad (20)$$

Donde a y b son parámetros que caracterizan el comportamiento reológico, y fueron obtenidos por un método de ajuste no lineal usando el software SYSTAT (SYSTAT, Inc., Evanston, IL 1990). También se analizó la variación de dichos parámetros en función del pH, la concentración de miel y la concentración de harina de trigo.

Para el estudio de la cinética de formación del gel, se realizó un barrido de tiempo donde se analizó G' ($\omega = 1$ rad/seg) versus tiempo a 87°C durante 60 minutos; tiempo suficiente para permitir la gelificación completa de la muestra. Estos barridos de tiempo se hicieron, a diferencia de los otros ensayos, sin calentamiento previo de la muestra. Los datos experimentales fueron ajustados con la siguiente fórmula empírica (Nishinari y col., 1991; Yoshida y col., 1992):

$$G' = G'_{\text{sat}} [1 - \exp(-Kt)] \quad (21).$$

Donde G'_{sat} es el módulo de almacenamiento de equilibrio o saturación (el cual es una medida del valor final que alcanza el módulo de almacenamiento durante un experimento de cinética de gelificación), K es la constante de gelificación (indica cuán rápido se lleva a cabo la gelificación) y t es el tiempo. El valor de K se obtuvo por un método de regresión no lineal utilizando el programa SYSTAT. El "gel time" (t^*) se calculó extrapolando el incremento de G' hacia el eje de abscisas de acuerdo al método descrito por Clark (1991). El t^* representa el instante en que una solución se vuelve un sólido viscoelástico o, en el modelo de gelificación de la polimerización, es el instante de tiempo en que se forma una red infinita (Aguilera, 1995). Los resultados se analizaron estadísticamente aplicando un análisis de varianzas (ANOVA) con el programa SYSTAT. Las diferencias mínimas significativas (LSD) se calcularon con el test de Fisher a $P < 0,05$.

Para analizar la variación de la viscoelasticidad con la temperatura, se realizaron barridos de frecuencia calentando la muestra previamente durante 45 minutos a 60, 70, 80 y 90°C, y determinando luego el valor de G' y G'' a dichas temperaturas y a una $\omega = 1$ rad/seg.

El proceso completo de gelificación consta de dos etapas, una primera etapa de calentamiento para favorecer la desnaturalización y la interacción proteica a través de interacciones de tipo hidrofóbicas, seguida de otra etapa de enfriamiento donde se favorecerían las interacciones a través de puentes hidrógeno. Debido a imposibilidades técnicas, todas las medidas se realizaron a la temperatura de gelificación (87°C); excepto al evaluar la variación con la temperatura, con lo cual se está midiendo la variación de los parámetros dinámicos en la primera etapa del proceso.

En todos los casos G' y G'' están expresados en Pascales (Pa) y la η^* en Pascales \times segundo (Pa \times s).

2.11. Evaluación sensorial.

Fundamento.

El Institute of Food Technologists (IFT) define a la Evaluación Sensorial como “Una disciplina científica utilizada para evocar, medir, analizar e interpretar reacciones de aquellas características de los alimentos y materiales tal como son percibidas por los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído” (Yeannes, 2002).

Existen dos clases principales de evaluaciones sensoriales: las evaluaciones analíticas y las afectivas.

- a) Los ensayos analíticos son utilizados para evaluar a nivel de laboratorio productos en términos de diferencias o similitudes, y para la identificación y cuantificación de características sensoriales. A su vez, los ensayos analíticos se clasifican en ensayos discriminativos y descriptivos. Ambos emplean panelistas entrenados que sean capaces de generar resultados reproducibles. El entrenamiento de los panelistas los familiariza con los procedimientos de evaluación e incrementa su habilidad para reconocer, identificar y recordar características sensoriales.
- b) Los ensayos afectivos son utilizados para evaluar opinión y/o preferencia y/o aceptación de un producto. Se usan panelistas no entrenados, seleccionados al azar y representativos de la franja de población a la cual el producto está dirigido. Se necesita un número mínimo de 24 panelistas.

Independientemente del tipo de evaluación que se lleva a cabo hay que tener en cuenta los diversos factores que influyen en la aceptabilidad de un producto, a saber:

- a) Hábitos alimentarios de la población en estudio.
- b) Susceptibilidad innata.
- c) Problemas fisiológicos.
- d) Edad.
- e) Nivel socioeconómico.
- f) Tabaquismo.
- g) Sexo.
- h) Memoria sensorial.
- i) Abulia.
- j) Estrés.

Todos estos factores influyen en distinto grado sobre la aceptabilidad final de un producto.

La evaluación sensorial tiene múltiples aplicaciones en alimentos. Puede ser utilizada para el desarrollo de productos o el mejoramiento de los ya existentes, para efectuar cambios en el proceso, reducir costos mediante la selección de un nuevo ingrediente, para efectuar el control de calidad, determinar la estabilidad durante las distintas condiciones de almacenamiento y su vida útil, determinar graduaciones de calidad y la aceptación, preferencia y opiniones del consumidor. Es útil, además, determinar la correlación entre la evaluación sensorial y los índices físicos o químicos.

Metodología.

Se realizó una evaluación sensorial de:

- a) Geles de CPL a diferentes pHs (3,75; 4,2 y 7,0) y con distintas concentraciones de miel (0, 20 y 37,5 % p/p).
- b) Tarta de limón, reemplazando el relleno tradicional por un gel acidificado con jugo de limón (pH final: 4,2), 27,5% de miel y 10% de proteínas. Para

su elaboración se utilizó una receta tradicional extraída de un libro de cocina.

Se realizó un ensayo afectivo sobre un grupo de 34 panelistas seleccionados al azar, con el objetivo de evaluar las opiniones y/o la aceptación del producto. Los atributos sensoriales analizados para ambos productos fueron: apariencia, sabor, textura y aceptabilidad general. A su vez a estos parámetros se los clasificó como: inaceptable, pobre, aceptable, bueno y muy bueno, asignándoles valores de 0 a 4, respectivamente.

2.12. Evaluación nutricional.

Fundamento.

En la actualidad el conocimiento de las propiedades nutricionales de un producto alimenticio no es sólo importante para una empresa productora de alimentos sino también para el público consumidor. En los últimos años el interés de la gente por llevar una vida más saludable se incrementó notablemente. Existe un mayor grado de concientización entre los consumidores de alimentos de que la alimentación es uno de los factores que más condiciona la salud de los individuos, ejerciendo un rol fundamental sobre el desarrollo psico-físico y el rendimiento físico e intelectual de una persona. Esto se refleja en la demanda de los consumidores por conocer las características nutricionales de los alimentos que ingerirán. En este contexto actual, el desarrollo de nuevos alimentos debe ir siempre acompañado de un estudio de sus propiedades nutricionales.

Metodología.

Se calcularon los porcentajes de proteínas, lípidos, hidratos de carbono, agua y kilocalorías que aportan los geles utilizados en la evaluación sensorial y se hicieron las comparaciones respectivas con los valores de la dosis diaria recomendada para adultos de 70 Kg. Se evaluó también el aporte de aminoácidos esenciales comparándolo con las necesidades diarias recomendadas según la FAO/OMS.

2.13. Estudio microbiológico.

Fundamentos.

Uno de los factores que afectan en mayor medida la salud pública es la higiene de los alimentos. Una correcta higiene de éstos está determinada por una multitud de factores: condiciones de obtención de los mismos, características de los medios empleados para su transporte, temperaturas y condiciones de conservación, estructura de los locales donde se manipulan los alimentos etc., destacando entre todos ellos la higiene de las prácticas de los manipuladores de alimentos. Todos los factores citados se vigilan y controlan a lo largo del proceso de obtención y manipulación de un producto alimenticio. Una vez que el alimento está listo para su consumo, su análisis microbiológico puede informarnos acerca del resultado real de todo el proceso, ya que la presencia de determinados microorganismos en los alimentos es una medida de su calidad sanitaria y un indicador de la forma en la que fue manipulado (Silva García y col., 1998).

En la industria alimenticia la aplicación de las buenas prácticas de manufactura, los programas de reducción de patógenos y HACCP (Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control) han convertido a los controles microbiológicos en un punto altamente sensitivo y prioritario. Así mismo, las regulaciones nacionales e internacionales han incorporado la obligatoriedad de estos controles como una respuesta a la aparición de enfermedades y muertes causadas por alimentos contaminados (Silva García y col., 1998).

De lo antedicho se desprende que el análisis microbiológico es una herramienta muy importante en la evaluación de la calidad total de un alimento.

En base a los resultados obtenidos en la evaluación sensorial se decidió estudiar los geles que contienen 37,5% de miel debido a que fueron los más aceptados.

Metodología.

Se obtuvieron geles de pH 7, 4,2 y 3,75 (37,5% de miel), de acuerdo a la técnica descrita en la sección 2 del presente capítulo, y se almacenaron a 4°C durante diferentes períodos de tiempo (1, 5, 30 y 60 días). Una vez finalizado cada uno de los períodos de almacenamiento, los geles se manipularon en condiciones

de esterilidad de manera de poder estudiar el crecimiento microbiano de éstos en función del tiempo de almacenamiento a 4°C. También se analizó la carga microbiana inicial del CPL y de la miel.

El recuento microbiano se llevó a cabo homogeneizando 10 gramos de muestra con 90 ml de agua peptonada al 0,1% en un stomacher durante 30 segundos. Luego se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada al 0,1% y se plaquearon las diluciones apropiadas en agar para recuento en placa (PCA) para el conteo microbiano total (48 hs, 37°C) y en agar levadura glucosa cloranfenicol (YGC) para recuento de hongos y levaduras (5 días, 30°C). Todas las muestras se analizaron por duplicado.

3. Calorimetría diferencial de barrido.

3.1. Introducción.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica experimental que se aplica a sistemas moleculares definidos cuyas estructuras están estabilizadas por numerosas fuerzas débiles y, por consiguiente, susceptibles de experimentar transiciones conformacionales y/o cambios de fase cuando se someten a calentamiento o enfriamiento en un intervalo de temperaturas experimentalmente accesible. Esta técnica permite la caracterización termodinámica de los cambios conformacionales inducidos por cambios de temperatura en sistemas macromoleculares de interés biológico como proteínas (Privalov y col., 1986), ácidos nucleicos (Privalov y col., 1978), biomembranas (Mabrey y col., 1978), lípidos e hidratos de carbono. La calorimetría diferencial de barrido permite determinar la capacidad calorífica aparente de una disolución macromolecular como una función continua de la temperatura. A partir de esta función es posible, si el sistema macromolecular está bien definido, la determinación de los parámetros termodinámicos asociados a la transición: cambios de entalpía, de entropía, de energía de Gibbs y de la capacidad calorífica (Mayorga, 1995).

El efecto de la composición del medio sobre la temperatura de desnaturalización de las proteínas de lactosuero (T_p) fue observado en resultados previos, que mostraron que la diálisis disminuye la T_p de las proteínas del lactosuero (Lupano y col., 1992), indicando un efecto protector por parte de las sales. Por el contrario, el almidón no tiene ningún efecto sobre la T_p (Lupano y col., 1999) y el gluten la disminuye sólo ligeramente (Lupano, 2000 b).

En el presente trabajo se utiliza esta técnica para estudiar la desnaturalización térmica de las proteínas de suero de leche y la influencia de la miel y de la harina de trigo sobre dicho proceso.

3.2. Resultados y discusión.

3.2.1. Dispersiones con miel.

En la figura 3.1 se muestra, a modo de ejemplo, un termograma de una dispersión de CPL con 10% de miel obtenido en un experimento de DSC.

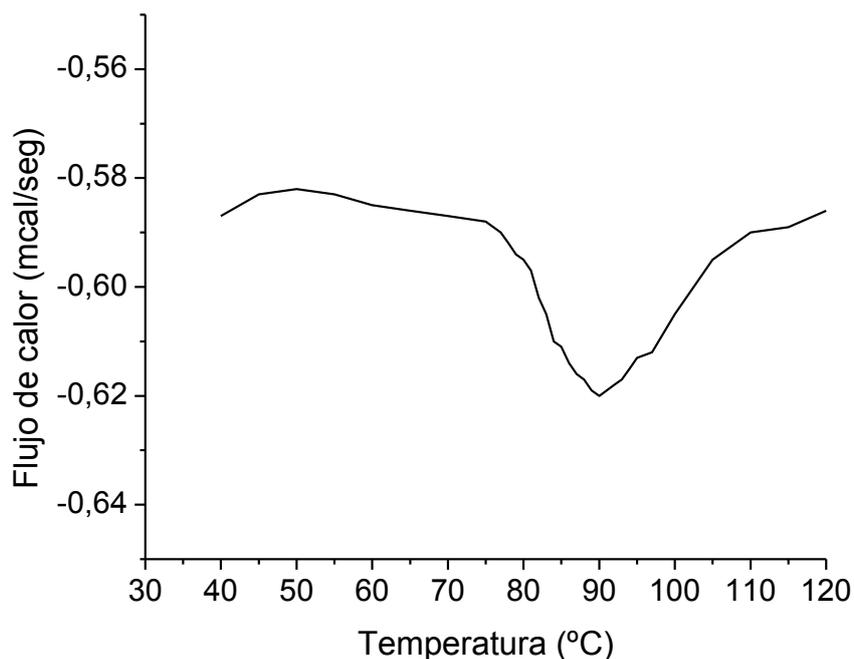


Figura 3.1. Termograma de una dispersión de CPL con 10% de miel obtenido en un experimento de DSC.

En la figura 3.2 se puede ver la temperatura de transición aparente para la desnaturalización de proteínas (T_p) de dispersiones de CPL en función del contenido de miel. La T_p es más alta a pH ácido que a pH neutro, confirmando resultados de bibliografía (Lupano y col. 1992).

La miel incrementa la T_p a todos los pHs ensayados, sugiriendo un efecto de protección por parte de la miel sobre la desnaturalización térmica de las proteínas.

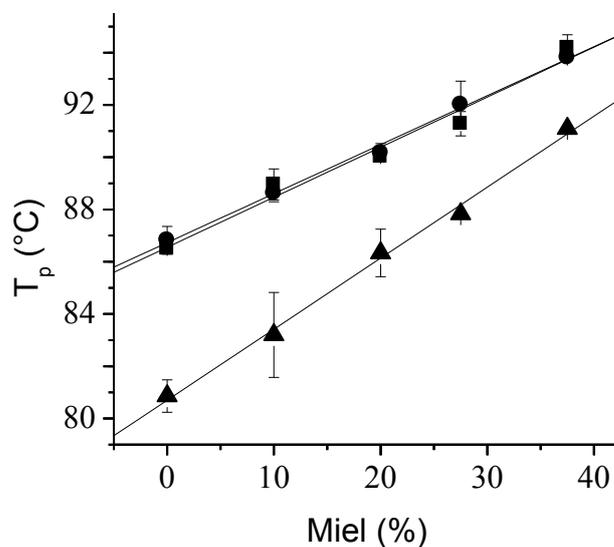


Figura. 3.2. Temperatura de transición aparente para la desnaturalización de proteínas (T_p) de dispersiones de CPL en función del contenido de miel. Concentración de proteínas: 10 % p/p. (■) pH 3,75; (●) pH 4,2; (▲) pH 7,0. Las barras muestran la desviación estándar ($LSD_{0,05} = 1,33$).

Los azúcares pueden aumentar la temperatura de desnaturalización de las proteínas del lactosuero. Este efecto puede ser debido principalmente a la capacidad de algunos azúcares, tales como la sacarosa, de incrementar la energía libre superficial entre el agua y la superficie hidrofóbica expuesta al solvente durante el desplegamiento de las proteínas (Kulmyrzaev y col., 2000).

La T_p vs la concentración de miel presentan una relación lineal a todos los pHs ensayados. La tabla 3.1 muestra las pendientes y los coeficientes de correlación de las líneas rectas obtenidas a los tres pHs por regresión de los datos experimentales. El efecto de la miel, reflejado por las pendientes de las líneas rectas, fue más importante en geles preparados a pH 7,0, al cual la sensibilidad de las proteínas del suero a la desnaturalización térmica es mayor. A medida que aumenta la T_p por aumentar la concentración de miel a pH neutro, la diferencia entre la temperatura de desnaturalización a pH neutro y ácido decrece.

pH de las dispersiones	Pendiente	Coefficiente de correlación
3,75	$0,192 \pm 0,018$	0,986
4,2	$0,187 \pm 0,007$	0,998
7,0	$0,272 \pm 0,010$	0,998

Tabla 3.1. Pendientes y coeficientes de correlación de las líneas rectas obtenidas al graficar T_p versus contenido de miel.

La entalpía correspondiente a la desnaturalización de proteínas (ΔH_p) de las dispersiones de CPL en función del contenido de miel se puede ver en la figura 3.3. El análisis de varianza mostró que no hubo diferencias a un nivel de significación

del 5% entre las muestras con diferentes contenidos de miel. Los valores de entalpía fueron más altos a pH 7,0 que a pHs ácidos, lo que confirma resultados de bibliografía (Lupano y col. 1992). El hecho de observar mayores valores de ΔH_p y menores de T_p a pH 7,0 que a pH ácido indica que a pH neutro habría inicialmente más proteína nativa, mientras que a pH ácido habría menos proteína nativa pero más resistente a la temperatura.

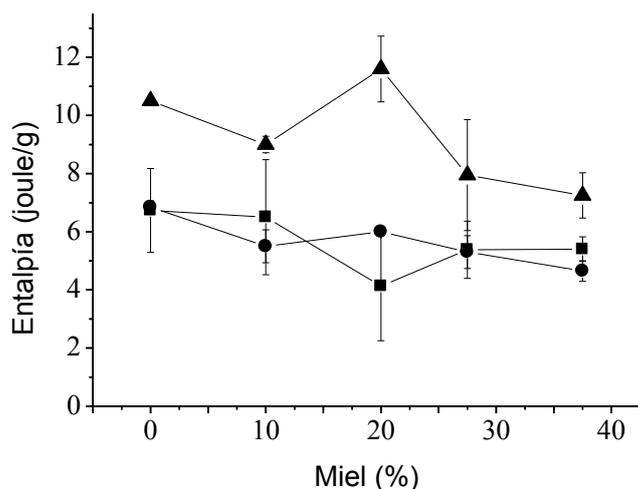


Figura. 3.3. Entalpía de desnaturalización de proteínas (ΔH_p) de dispersiones de CPL en función del contenido de miel. Concentración de proteínas: 10 % p/p. (■) pH 3,75; (●) pH 4,2; (▲) pH 7,0. Las barras muestran la desviación estándar ($LSD_{0,05} = 1,33$).

3.2.2. Dispersiones con miel y harina de trigo.

La figura 3.4 muestra los termogramas obtenidos cuando dispersiones de CPL con 20 % de harina de trigo y diferentes concentraciones de miel, preparadas a diferentes pHs, se calentaron en un equipo de DSC. A pH ácido se observaron dos endotermas; la de menor temperatura corresponde a la gelatinización del almidón, y la de mayor temperatura a la desnaturalización de proteínas. Esto indica que la gelatinización del almidón ocurre primero, seguida de la desnaturalización de las proteínas, tal como fue observado en sistemas CPL-almidón de mandioca (Lupano y col. 1999). A pH 7,0 y a bajos contenidos de miel las endotermas

correspondientes a la gelatinización del almidón y a la desnaturalización de proteínas se solapan.

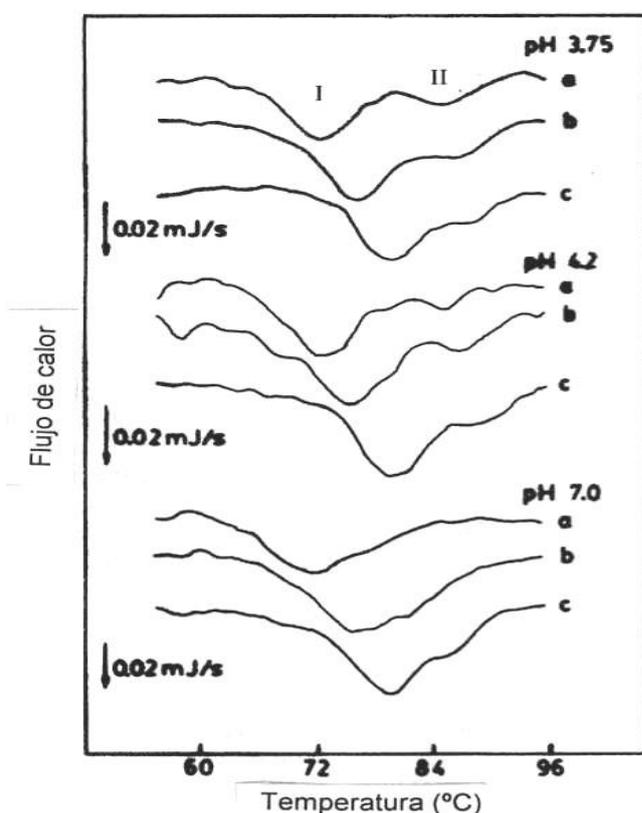


Figura. 3.4. Termogramas de DSC de dispersiones de CPL-harina de trigo. Concentración de proteínas de suero: 10 % p/p. Concentración de harina de trigo: 20% p/p. Contenido de miel: (a) 0%; (b) 10%; (c) 20%, p/p. I: gelatinización del almidón; II desnaturalización de proteínas.

La T_p de dispersiones de CPL conteniendo diferentes cantidades de harina de trigo en función del contenido de miel se muestra en la figura 3.5 (a - c). El análisis de varianza mostró que hay diferencias significativas ($P < 0,01$) entre las muestras preparadas a diferentes pHs y con diferentes contenidos de miel y harina de trigo. Al igual que en el caso anterior, la T_p aumentó con el contenido de miel en todas las condiciones ensayadas. Por el contrario, la presencia de la harina de trigo hizo que la T_p disminuyera, por lo que en las dispersiones que contienen miel y harina de trigo se observan dos efectos opuestos: la disminución de la T_p debido a la presencia de la harina de trigo y el incremento en la T_p debido a la miel. Es probable que de los componentes de la harina sean las proteínas de almacenamiento las que provoquen este efecto, ya que en estudios previos se

observó que el gluten disminuye ligeramente la T_p , como fue mencionado anteriormente (Lupano, 2000 b), mientras que el almidón no tendría ningún efecto (Lupano y col. 1999).

El efecto del contenido de miel y de harina de trigo sobre la temperatura de gelatinización del almidón (T_a) es presentado en la figura 3.5 (d - f). El análisis de varianza mostró que la T_a no se modificó por el pH en todas las condiciones ensayadas ($P > 0,05$), pero se incrementó con el contenido de miel a todos los pHs ensayados. Esto último probablemente se deba a que la miel tiene la capacidad de ligar fuertemente al agua retrasando la gelatinización del almidón, pues compite con éste por las moléculas de agua disponibles. Por otro lado, el aumento en la concentración de harina de trigo produjo un aumento en la T_a encontrando, además, interacciones significativas ($P < 0,05$) entre la harina de trigo y la miel. Ghiasi y col. (1982) propusieron que durante la gelatinización del almidón se produce una migración de agua, y que en sistemas complejos hay componentes como las proteínas de la harina de trigo que pueden limitar severamente tal migración (Jovanovich y col., 2003; Manley, 2000). Como consecuencia, cuando la harina de trigo se incrementa de 10% a 20% hay menos agua disponible para la gelatinización del almidón, lo que produce un aumento de la T_a . Este efecto se notó mucho más a altos contenidos de miel, probablemente debido al hecho que la miel también disminuye la cantidad de agua disponible para la gelatinización del almidón.

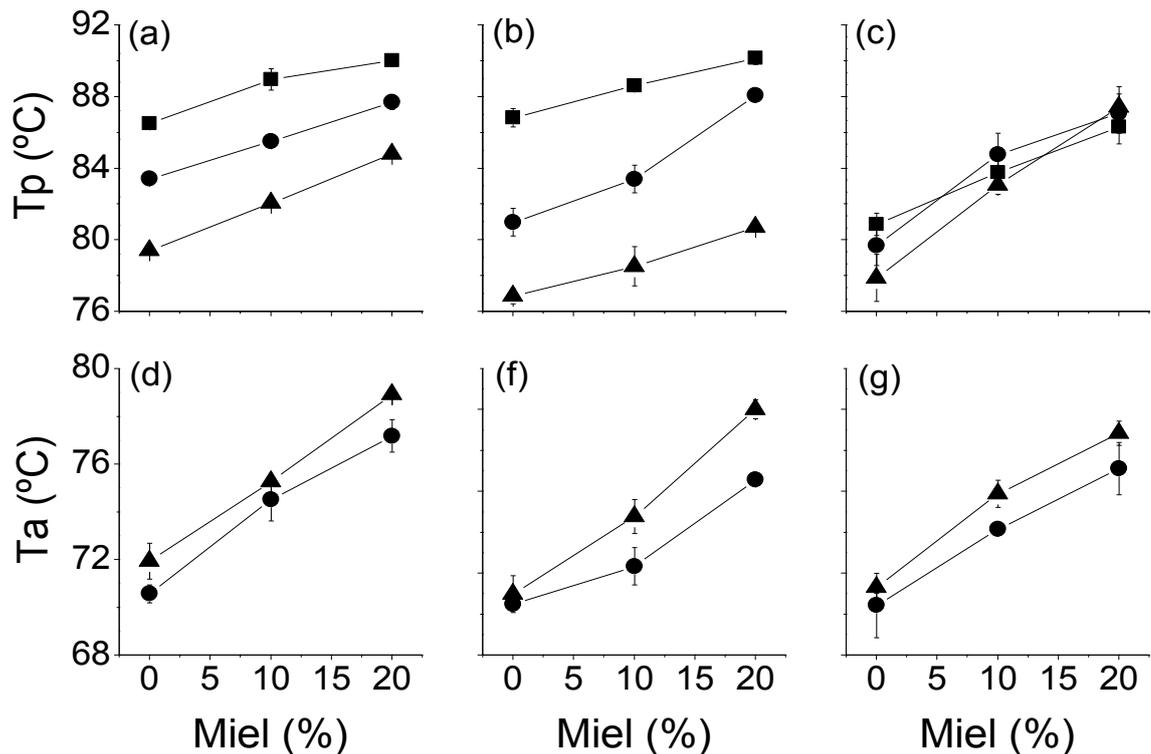


Figura 3.5. Temperatura aparente de transición para la desnaturalización de proteínas (T_p) de dispersiones de CPL, y temperatura de gelatinización del almidón (T_a), en función del contenido de miel. Concentración de proteínas de suero: 10 % p/p. (a y d) pH 3,75; (b y f) pH 4,2; (c y g) pH 7,0. Contenido de harina de trigo de los geles: (■), 0%; (●), 10%; (▲), 20% p/p. Las barras muestran la desviación estándar ($LSD_{0,05 T_p} = 0,40$; $LSD_{0,05 T_a} = 0,38$).

3.3. Conclusiones.

De los resultados obtenidos se desprende que el proceso de desnaturalización térmica de las proteínas del suero es afectado por las condiciones de pH a la que se realizaron los ensayos, y por la presencia de miel y harina de trigo.

La miel ejerce un efecto de protección sobre la desnaturalización térmica de las proteínas del suero; por el contrario, la harina de trigo disminuye la T_p , indicando un aumento en la sensibilidad de las proteínas a la desnaturalización térmica. Probablemente este efecto se debe a una interacción entre las proteínas del trigo y las proteínas del suero.

El proceso de gelatinización del almidón se ve retrasado por la presencia de componentes como la miel y las proteínas del gluten, que tienen la capacidad de ligar agua fuertemente, disminuyendo de esta manera la cantidad de agua disponible para la gelatinización.

4. Microscopía electrónica de barrido.

4.1. Introducción.

Las técnicas de observación visual son un elemento complementario de análisis importante en el estudio de la estructura de los geles proteicos (Heertje, 1993). La microscopía electrónica de barrido (MEB) es una técnica ampliamente utilizada para la caracterización estructural de muestras sólidas, de la cual se puede obtener una gran variedad de información morfológica, debido a su elevada resolución. En el caso particular de los geles del presente trabajo, permite visualizar de manera directa la estructura íntima de éstos, permitiendo obtener valiosa información sobre su estructura y las interacciones entre los diferentes elementos que conforman dicha estructura.

Los geles proteicos se pueden clasificar básicamente en geles de estructura fina, de diámetro de poro del orden de los nanómetros (nm), y de estructura particulada, cuyo tamaño de poro es del orden de los micrómetros (μm) (Standing y col., 1992). Algunos geles presentan estructura heterogénea con algunas zonas de alta y otras de baja densidad, originada quizás por distintos tipos de cadena y de entrecruzamientos y/o por la formación de poros de diferentes tamaños (Standing y col., 1992, 1993).

El objetivo de este capítulo es el estudio de la estructura de geles de proteínas de lactosuero mediante MEB.

4.2. Resultados y discusión.

4.2.1. Geles con miel.

La figura 4.1 muestra la estructura de los geles observada por MEB a distintos pHs y concentraciones de miel. En todos los casos se observa una estructura de gel particulada que coincide con las obtenidas por otros autores (Clark y col. 1981; Standing y col. 1993; Verheul, 1998). Estas partículas que forman la estructura del gel tienen un tamaño que está en el orden de los $0,5\mu\text{m}$, que es mucho mayor que el tamaño de las proteínas de suero de leche nativas ($<10\text{nm}$). De aquí que estas partículas consisten en un gran número de moléculas de proteína agregadas (Verheul, 1998).

Se observa que la estructura de los geles cambia de acuerdo al pH al que fueron preparados; así, por ejemplo, los geles preparados a pH 4,2 presentan una estructura más agregada con poros más grandes que los geles de pH 3,75 y 7,0. Esto se debe a que en los geles preparados a pH 4,2 se está próximo al pI de la β -Lg y α -La, de manera que las proteínas tienden a agregarse al disminuir la repulsión electrostática. Esta estructura de poros grandes de los geles de pH 4,2 coincide con la estructura obtenida por Verheul y col. (1998) en geles de pH 6,9 y alta concentración de NaCl. En este caso la sal actúa como contraión neutralizando parte de las cargas negativas, disminuyendo así la repulsión entre las moléculas de proteína. Por otra parte, el agregado de miel disminuye el tamaño de los poros a todos los pHs ensayados, haciendo que la estructura se vuelva más homogénea, especialmente en los geles preparados a pH 4,2. Una posible explicación es que la miel forme puentes hidrógeno con algunos grupos de las proteínas, interfiriendo con la formación de agregados.

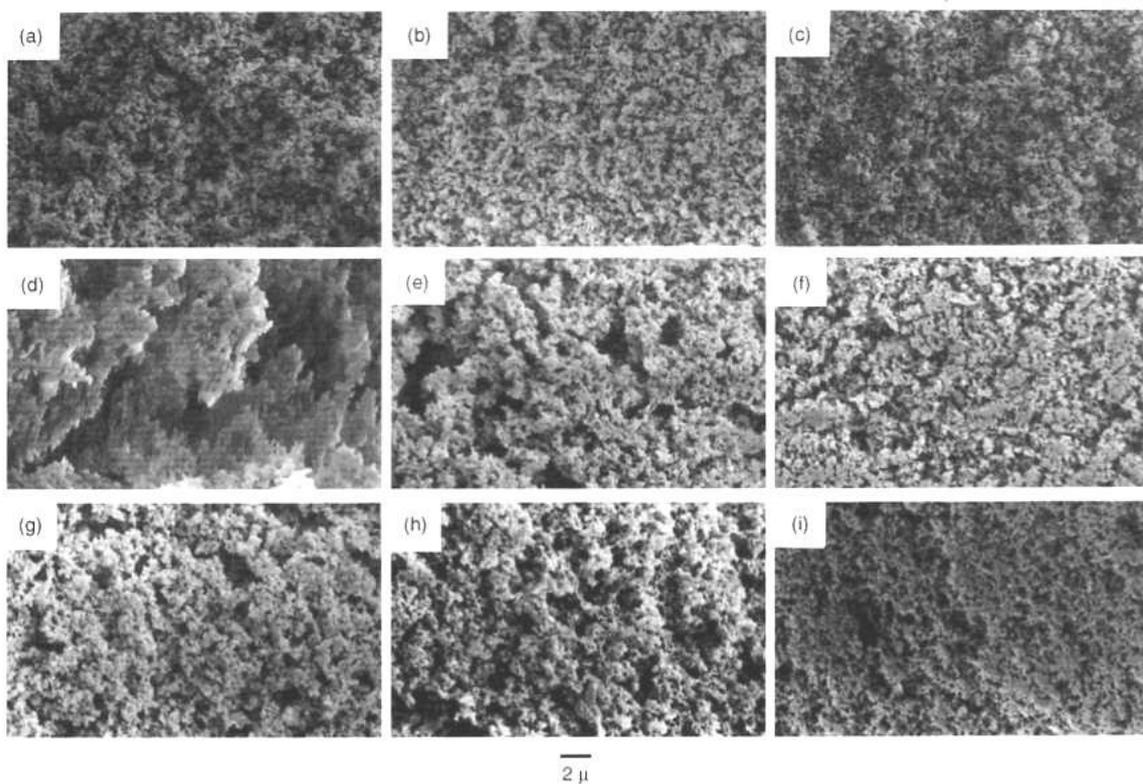
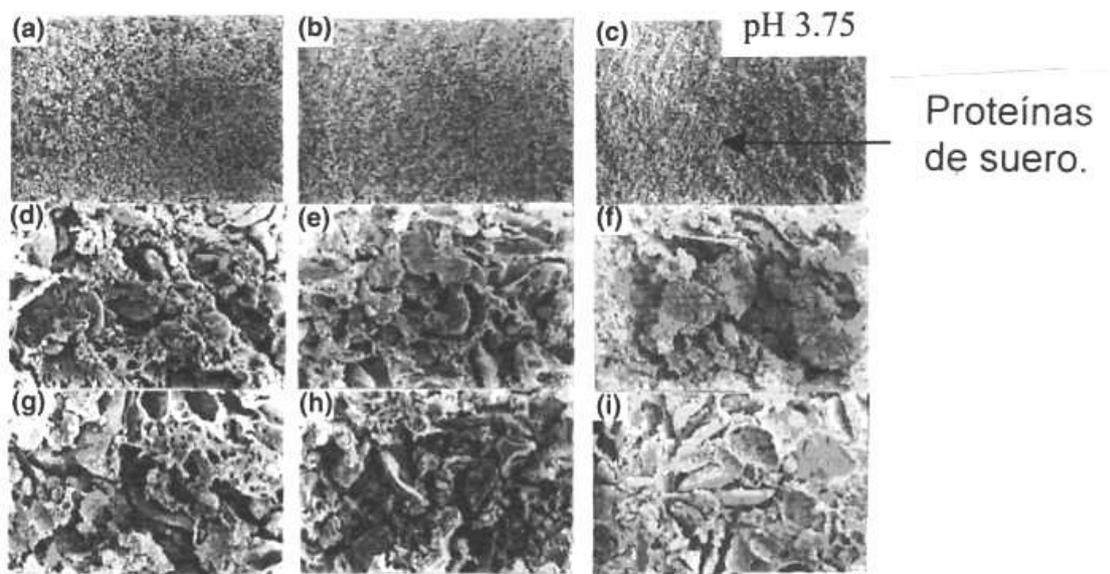


Figura 4.1. Microscopía electrónica de barrido de geles de CPL. Contenido de proteína de los geles: 10% p/p. Contenido de miel: (a, d, g) 0%; (b, e, h) 10%; (c, f, i) 37,5%. pH de los geles: (a, b, c) 3,75; (d, e, f) 4,2; (g, h, i) 7,0. Aumento: 4000X.

4.2.2. Geles con miel y harina de trigo.

En la figura 4.2 se puede ver la estructura de los geles observada por MEB a distintos pHs, concentraciones de miel y harina de trigo. Se observa que los gránulos de almidón se encuentran rodeados por una red de gluten discontinua y por proteínas del suero en los geles que contienen harina de trigo (Fig. 4.2 d - i). No se observa en general una red continua de gluten, debido probablemente al hecho que las proteínas del suero romperían su estructura, confirmando los resultados obtenidos por Lupano (2000 b). Las proteínas del suero tendrían la capacidad de formar puentes hidrógeno y puentes disulfuro con las proteínas de la harina de trigo, lo que interferiría en la formación de la red de gluten.



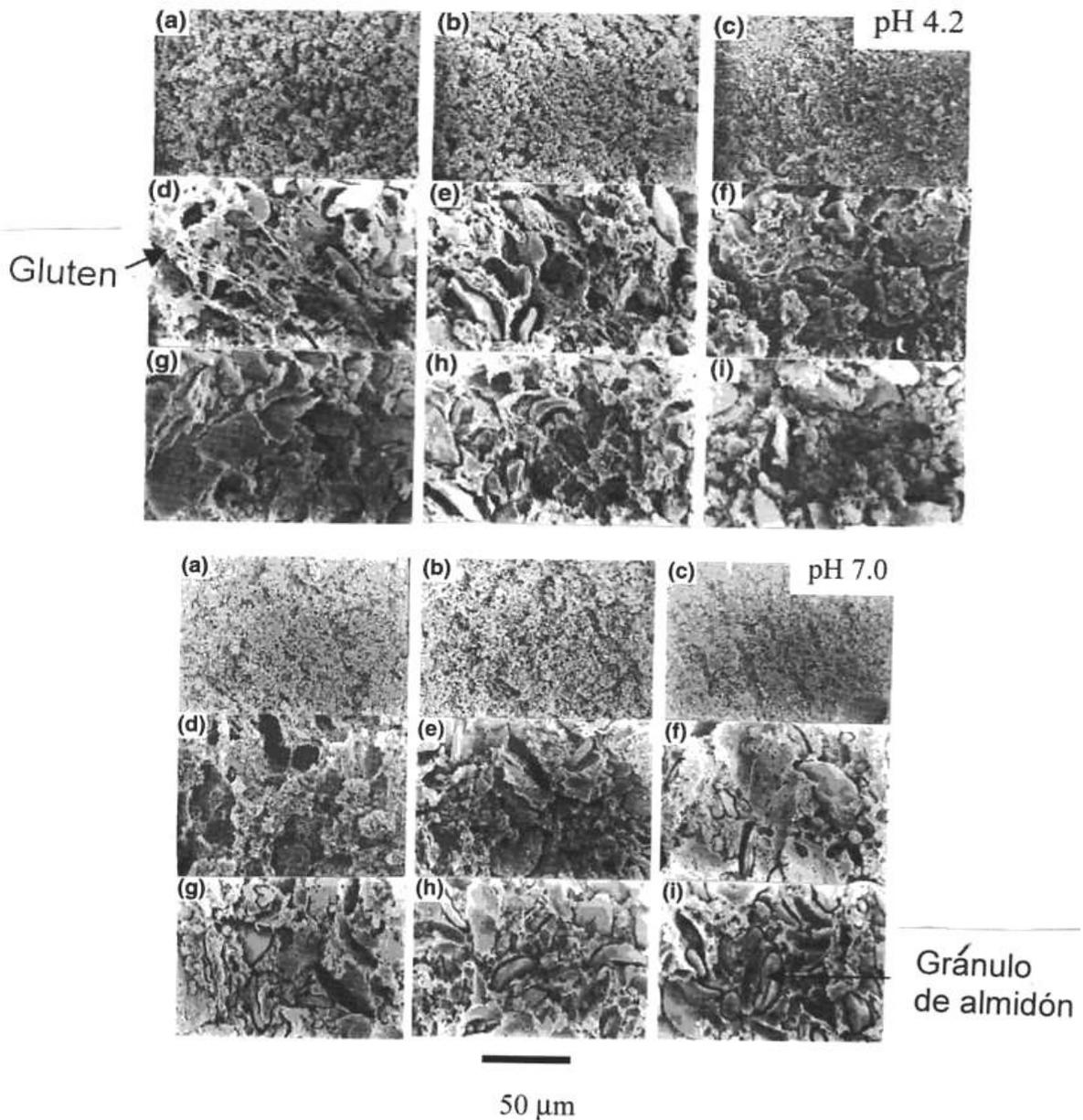


Figura 4.2. Microscopía electrónica de barrido de geles de CPL. Contenido de proteínas de suero de los geles: 10% p/p. Contenido de miel: (a, d, g) 0%; (b, e, h) 10%; (c) 37,5%; (f, i) 25% p/p. Contenido de harina de trigo: (a-c) 0%; (d-f) 10%; (g-i) 20% p/p. Aumento: 1000X.

4.3. Conclusiones.

La estructura de los geles depende del pH al que fueron preparados. Los geles de pH 3,75 y 7,0 poseen una estructura más homogénea que los geles de pH 4,2, en los cuales se observa una estructura más agregada con grandes poros. Probablemente esto último se deba a la proximidad del pl. Por otro lado, la miel

vuelve la estructura de los geles más homogénea, disminuyendo el tamaño de los poros, especialmente en los geles de pH 4,2. Los geles con harina de trigo presentan una estructura mucho más heterogénea, debido a los gránulos de almidón y a la red de gluten. El hecho que no se observe una red continua de gluten sugiere una interacción entre las proteínas de almacenamiento de la harina de trigo y las proteínas del suero a través de interacciones no covalentes y a pH neutro también mediante puentes disulfuro.

*5. Solubilidad proteica
de los geles.*

5.1. Introducción.

De acuerdo a lo descrito en el capítulo 1, en el proceso de formación de un gel de proteínas de lactosuero, éstas se desnaturalizan, se despliegan, y finalmente se agregan de manera más o menos ordenada para generar la estructura del gel. La formación de redes proteicas se considera el resultado de un balance entre las interacciones proteína-proteína (fuerzas atractivas y repulsivas), y las interacciones proteína-agua (Cheftel y col. 1993). Entre las fuerzas atractivas se encuentran las interacciones hidrofóbicas (favorecidas a altas temperaturas), las electrostáticas, los puentes hidrógeno (favorecidos a bajas temperaturas) y los puentes disulfuro. La contribución de cada tipo de interacción depende de la naturaleza de la proteína y de la etapa del proceso de gelificación. Las fuerzas repulsivas observadas especialmente a pHs alejados del punto isoeléctrico, y las interacciones proteína-agua, mantienen alejadas a las cadenas polipeptídicas. El aumento de la concentración proteica facilita la interacción intermolecular y la gelificación (Cheftel y col. 1993). La formación de puentes disulfuro forma geles irreversibles por calentamiento, como por ejemplo los geles de ovoalbúmina y de β -lactoglobulina (Creamer y col., 2004). Los geles de gelatina, en cambio, están estabilizados principalmente por puentes hidrógeno y funden cuando se calientan, pudiendo repetirse varias veces el proceso de gelificación-fusión.

El objetivo de este capítulo es el estudio de la estructura de los geles de proteínas de lactosuero a través de las interacciones entre los distintos componentes que conforman dichos geles.

5.2. Resultados y discusión.

5.2.1. Geles con miel.

En la figura 5.1 se muestra la solubilidad de los constituyentes proteicos de los geles de CPL en función de la concentración de miel. Se observa que en los geles ácidos dicha solubilidad aumenta a medida que se utilizan solventes de extracción que rompen más tipos de unión proteína-proteína, hasta llegar al 100% de solubilidad con BSU. Este medio, que contiene urea y SDS, rompe todas las

interacciones no covalentes, indicando que éstas son las responsables del mantenimiento de la estructura de los geles ácidos. En cambio, en los geles de pH 7,0, donde las reacciones de intercambio sulfhidrilo-disulfuro cobran importancia, se observa que a las interacciones no covalentes (electrostáticas, hidrofóbicas y puentes hidrógeno) se suman los puentes disulfuro como determinantes de la estructura. Así, se observa una solubilización total de los constituyentes proteicos de estos geles sólo cuando se utiliza BSUME. Este medio es equivalente al BSU pero con el agregado de β -mercaptoetanol, lo que indica que los puentes disulfuro juegan un rol muy importante en el mantenimiento de la estructura de los geles neutros.

La miel prácticamente no modificó la solubilidad de los constituyentes proteicos de estos geles, excepto en el caso de los geles preparados a pH 4,2, en los cuales la solubilidad en B se incrementó levemente en los geles de contenido de miel mayor a 27,5%. Esto sugiere que la miel podría desestabilizar levemente los geles preparados a pH 4,2. Este hecho puede explicarse considerando que la miel puede formar puentes hidrógeno con las proteínas del suero, disminuyendo de este modo los puentes hidrógeno entre moléculas de proteína, siendo este efecto más importante en los geles preparados a pH 4,2. Los geles preparados a pH 4,2 con miel tienen una estructura más homogénea, y con poros más chicos que los mismos geles preparados sin miel, tal como se observó por microscopía electrónica de barrido en el capítulo 4.

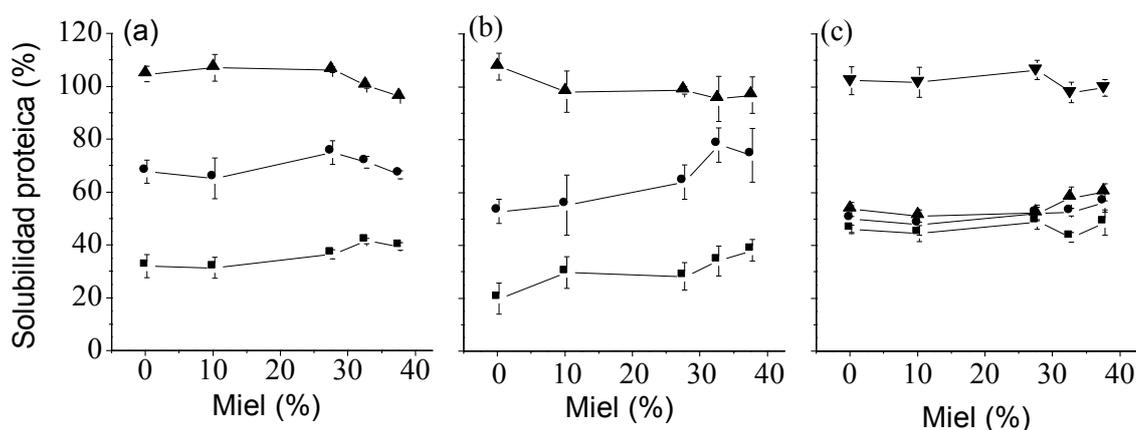


Figura. 5.1. Solubilidad de los constituyentes proteicos de geles de CPL en función del contenido de miel. Contenido de proteínas de los geles: 10% p/p. Concentración de proteínas en todos los ensayos de solubilidad: 0,1% p/v. pH de los geles: (a) 3,75; (b) 4,2; (c) 7,0. Solventes de extracción: (■) agua destilada; (●) buffer estándar, pH 8,0 (B); (▲) buffer estándar conteniendo urea 8M y 0,5% de SDS (BSU); (▼) buffer estándar conteniendo urea 8M, 0,5% de SDS y 1% de β -mercaptoetanol (BSUME). Las barras muestran la desviación estándar ($LSD_{0,05} = 20,60$).

5.2.2. Geles con miel y harina de trigo.

La figura 5.2 muestra la solubilidad de los constituyentes proteicos de los geles de CPL en función del contenido de miel a tres pHs diferentes y a distintas concentraciones de harina de trigo. La solubilidad de las proteínas de los geles en presencia de harina de trigo fue menor que en los mismos geles sin harina de trigo en todas las condiciones ensayadas. Las proteínas de trigo son menos solubles que las proteínas del suero, pero la relación proteínas de trigo / proteínas de suero fue de 1:10 o 2:10; de aquí que la menor solubilidad de las proteínas de trigo no es suficiente para explicar la disminución de la solubilidad de los constituyentes proteicos de estos geles. Es posible que los componentes de la harina de trigo interaccionen con las proteínas del suero disminuyendo su solubilidad, tal como lo sugieren los resultados de calorimetría diferencial de barrido (capítulo 3) y microscopía electrónica de barrido (capítulo 4).

Al igual que en el caso de los geles ácidos con miel, la alta solubilidad de los componentes proteicos de los geles ácidos con miel y harina de trigo en BSU indica que las interacciones no covalentes son las responsables del mantenimiento de la estructura de estos geles. Sin embargo, dentro de las interacciones no covalentes, las electrostáticas juegan un rol más importante en el mantenimiento de la estructura de los geles de pH 3,75, tal como lo demuestra la mayor solubilidad proteica de estos geles en B que la de los geles de pH 4,2. Nuevamente, la baja solubilidad de los componentes proteicos de los geles neutros con miel y harina de trigo en todos los solventes de extracción que rompen las interacciones no

covalentes, indica que los puentes disulfuro juegan un rol muy importante en la estructura de estos geles.

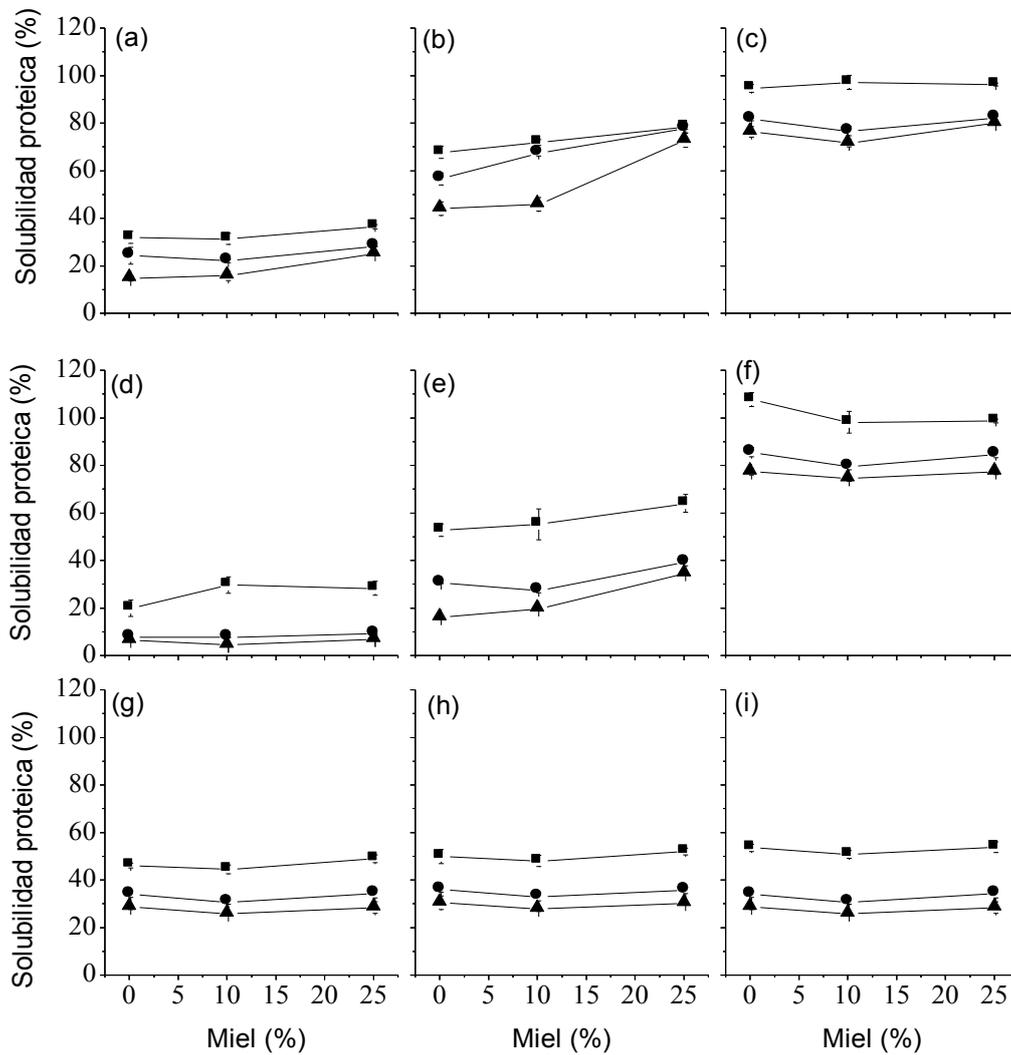


Fig. 5.2. Solubilidad de los constituyentes proteicos de geles de CPL en función del contenido de miel. Contenido de proteínas de suero de los geles: 10% p/p. Concentración de proteínas de suero en todos los ensayos de solubilidad: 0,1% p/v. pH de los geles: (a)-(c), 3,75; (d)-(f), 4,2; (g)-(i), 7,0. Solventes de extracción: (a), (d), (g) agua destilada; (b), (e), (h) buffer estándar, pH 8,0 (B); (c), (f), (i) buffer estándar conteniendo urea 8M y 0,5% de SDS (BSU). Contenido de harina de trigo: (■), 0%; (●), 10%; (▲), 20%. Las barras muestran la desviación estándar ($LSD_{0,05}=20,50$).

5.3. Conclusiones.

Los resultados arriba mostrados indican que en el mantenimiento de la estructura de los geles están involucradas diferentes clases de interacciones. En los geles ácidos son las interacciones no covalentes las responsables del mantenimiento de su estructura. Por el contrario, los puentes disulfuro (covalentes) son muy importantes en la estructura de los geles neutros.

La miel prácticamente no modifica la solubilidad de los constituyentes proteicos de los geles en todas las condiciones ensayadas. Por el contrario, la harina de trigo interaccionaría con las proteínas del suero haciendo que disminuya la solubilidad de estas últimas a todos los pHs y concentraciones de miel ensayadas.

*6. Electroforesis de los
constituyentes
proteicos de los geles.*

6.1. Introducción.

La estructura de un gel de proteínas involucra diferentes clases de interacciones entre los constituyentes proteicos de éste. Estas interacciones, covalentes y no covalentes, dependen, entre otras cosas, de la naturaleza de las proteínas involucradas en la estructura del gel y del pH al cual el gel fue preparado. Por ejemplo, la formación de puentes disulfuro y el intercambio sulfhidrilo-disulfuro se ven favorecidos a pH neutro pero no a pH ácido. En el capítulo anterior se estudió qué tipos de enlaces se hallan involucrados en el mantenimiento de la estructura de los geles; en este capítulo, el objetivo es estudiar qué especies proteicas están involucradas en dicho mantenimiento y qué tipo de interacciones aporta cada una de ellas. Para esto, las proteínas extraídas con AD, B y BSU se analizaron a través de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

6.2. Resultados y discusión.

Dado que la miel no modifica apreciablemente la solubilidad de los constituyentes proteicos de los geles, se analizaron por electroforesis sólo los geles con distintos contenidos de harina de trigo. La figura 6.1 muestra los perfiles electroforéticos de las especies proteicas extraídas con AD, B y BSU de los geles preparados a diferentes pHs y contenidos de harina de trigo. Estos perfiles reflejan la diferente solubilidad de las distintas especies proteicas que pueden estar formando parte del gel en esas soluciones de extracción. En los geles preparados a pH 3,75, la solubilidad de la β -Lg aumentó cuando se cambió la solución de extracción de AD a B y de B a BSU, mientras que la solubilidad de la α -lactoalbúmina (α -La) se incrementó principalmente cuando se cambió la solución de extracción de AD a B. Esto indicaría que la β -Lg podría contribuir al mantenimiento de la estructura del gel a través de interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y puentes hidrógeno, mientras que la α -La lo haría principalmente a través de interacciones electrostáticas. También se observa que el pico de la α -La y del monómero de la β -Lg tienden a decrecer en algunos casos a medida que el contenido de harina de trigo aumenta. Estos resultados están de acuerdo con los

ensayos de solubilidad descritos en el capítulo anterior, e indicarían una posible interacción entre la harina de trigo y las proteínas del suero, tal como fue discutido anteriormente.

Los picos correspondientes a los geles preparados a pH 4,2 fueron más pequeños que los correspondientes a los geles preparados a pH 3,75, indicando que hay más especies proteicas involucradas en la estructura del gel. En los geles de pH ácido se observa que los picos de la α -La y β -Lg se incrementan al cambiar la solución de extracción de AD a B y de B a BSU, sugiriendo que a estos pHs ambas proteínas contribuyen al mantenimiento de la estructura del gel a través de interacciones no covalentes.

Finalmente, y en concordancia con los ensayos de solubilidad, los perfiles electroforéticos de los geles preparados a pH 7,0 presentaron picos pequeños tanto para la α -La como para la β -Lg con todos los solventes de extracción utilizados, indicando que los puentes disulfuro son los determinantes de la estructura de estos geles a pH neutro.

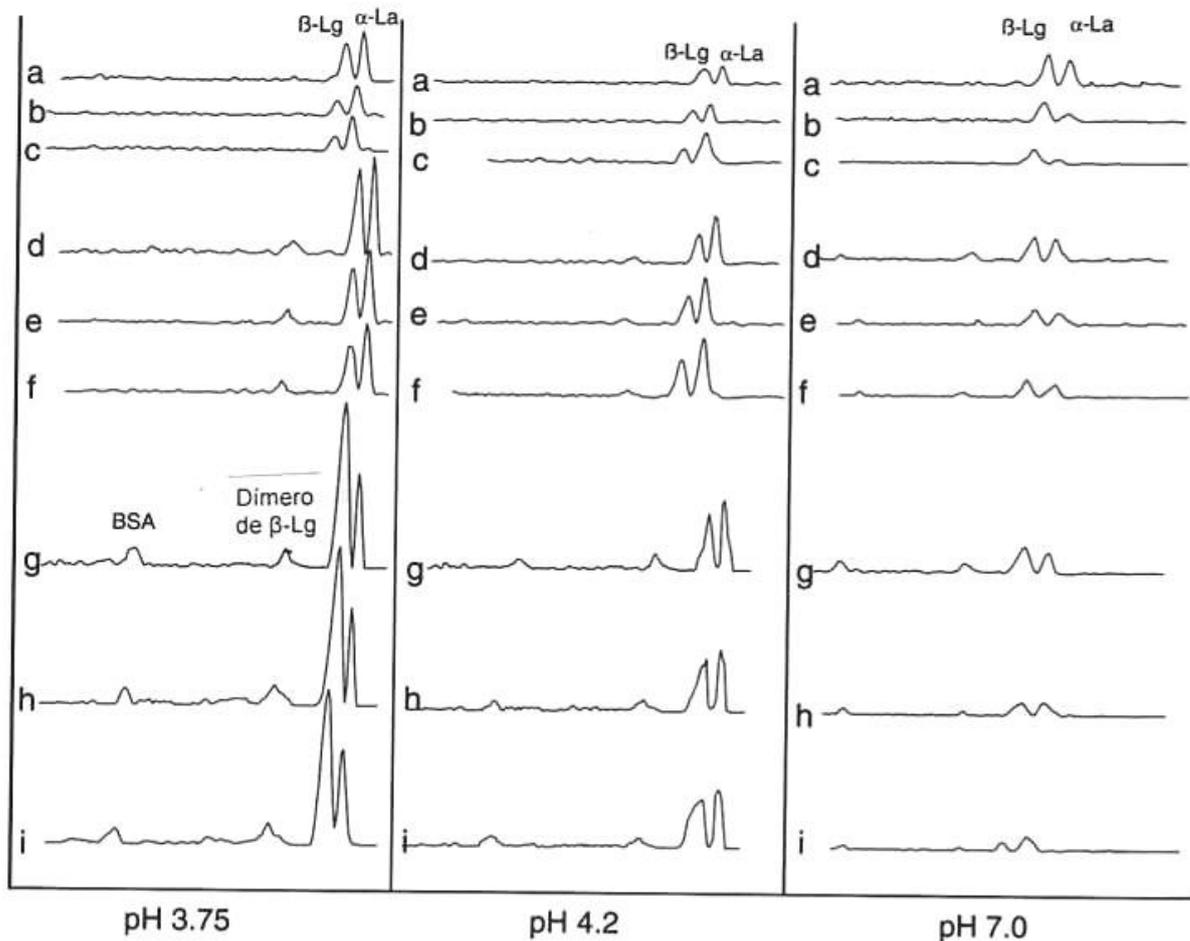


Figura 6.1. Perfiles electroforéticos de proteínas de geles de CPL con harina de trigo. Las muestras fueron tratadas con β -mercaptoetanol antes de la electroforesis. Concentración de proteínas de suero de los geles: 10% p/p. Soluciones de extracción: (a)-(c) agua destilada; (d)-(f) buffer estándar de pH 8,0 (B); (g)-(i) buffer estándar conteniendo urea 8 M y 0,5% SDS (BSU). Contenido de harina de trigo: (a), (d), (g) 0%; (b), (e), (h) 10%; (c), (f), (i) 20%. α -La: α -lactoalbúmina; β -Lg: β -lactoglobulina; BSA: seroalbúmina bovina.

6.3. Conclusiones.

Los componentes proteicos de los geles participan en el mantenimiento de la estructura de éstos a través de diversos tipos de interacciones según el pH al cual el gel fue preparado. Es así que, a pH 3,75 la β -Lg interviene en la estructura de los geles por medio de interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y puentes hidrógeno, mientras que la α -La lo hace principalmente a través de interacciones electrostáticas. A pH 4,2 ambas contribuyen con todas las interacciones no covalentes mencionadas. A pH 7,0, la situación es completamente distinta, dado que son los puentes disulfuro los principales responsables del mantenimiento de la estructura de los geles.

*7. Capacidad de retención
de agua.*

7.1. Introducción.

La capacidad de retención de agua (CRA) es la habilidad de un producto de ligar moléculas de agua y retenerlas luego de la aplicación de una fuerza suave. La cantidad de agua ligada en un alimento es un aspecto relevante en la tecnología de procesamiento de los alimentos. Los geles proteicos están constituidos por una matriz de cadenas de proteínas donde se encuentra oculta la fase acuosa (Standing y col., 1993). Muchos geles tienen estructuras hidratadas que pueden retener además de agua otros componentes del alimento. Algunos geles proteicos retienen hasta un 95% o más de agua; el agua retenida está físicamente inmovilizada por la estructura proteica y no puede ser expulsada por presión. Los grupos CO y NH expuestos durante la desnaturalización se convierten en centros polarizados creando a lo largo de la cadena polipeptídica un sistema de multicapas de agua que al enfriarse interaccionarían formando nuevos puentes hidrógeno, generando la estructura necesaria para la inmovilización del agua libre. Otra forma de ligar agua es a través de los poros de la red proteica que pueden retener agua por fenómenos de capilaridad (Cheftel y col., 1993).

La CRA de los geles proteicos puede modificarse por el agregado de diversas sustancias como los carbohidratos. La miel, al igual que otros compuestos como el almidón y el gluten, tienen la capacidad de formar puentes hidrógeno con moléculas de agua, incrementando la CRA de los geles de CPL (Lupano, 2000 a, b; Lupano y col., 1999; Yamul y col., 2003).

El objetivo de este capítulo es el estudio de las propiedades funcionales de los geles de proteínas de lactosuero a través de su CRA, y cómo se modifica por la presencia de miel y harina de trigo.

7.2. Resultados y discusión.

7.2.1 Geles con miel.

La figura 7.1 muestra la CRA de geles de CPL-miel preparados a diferentes pHs y cantidades de miel. La CRA de los geles sin miel fue mayor en los geles preparados a pH 7,0, y menor en los geles preparados a pH 4,2, los cuales

presentan una estructura más agregada, en concordancia con estudios previos (Lupano, 2000a; Lupano y col., 1999; Lupano y col., 1996). Este hecho podría explicarse teniendo en cuenta que a pH 4,2, cercano al pI, aumentan las interacciones entre moléculas de proteína como consecuencia de la disminución de la repulsión electrostática, y disminuyen las interacciones proteína-agua impidiendo la formación de una matriz capaz de retener grandes cantidades de agua. La CRA se incrementó con el contenido de miel a todos los pHs ensayados, alcanzando valores similares para todos los geles a concentraciones de miel suficientemente altas. Esto es probablemente debido a la capacidad de la miel de formar enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua, al igual que otros componentes como el almidón y el gluten que presentan un comportamiento similar, y que habían sido estudiados previamente (Lupano, 2000 a, b; Lupano y col., 1999).

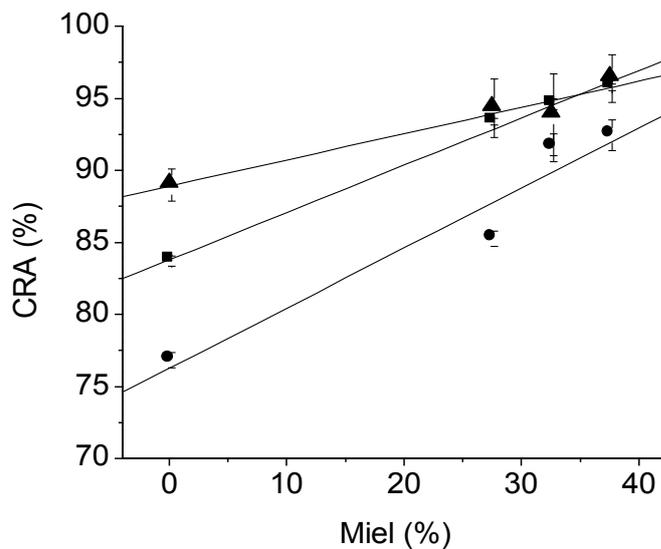


Figura 7.1. Capacidad de retención de agua (CRA) de geles de CPL en función de la concentración de miel. Contenido proteico de los geles: 10% p/p. pH de los geles: (■) 3,75; (●) 4,2; (▲) 7,0. Las barras muestran la desviación estándar ($LSD_{0,05} = 3,78$).

En la tabla 7.1 se puede ver la relación lineal existente entre la CRA y el contenido de miel. Los valores de las pendientes de las rectas de regresión indican que en los geles de pH 4,2, (donde la CRA es menor) el efecto de la miel es más importante.

pH de los geles	Pendiente	Coefficiente de correlación
3,75	0,328 ± 0,015	0,998
4,2	0,417 ± 0,076	0,968
7,0	0,182 ± 0,030	0,974

Tabla 7.1. Pendientes y coeficientes de correlación de las líneas rectas obtenidas por regresión de los datos de CRA versus contenido de miel.

7.2.2. Geles con miel y harina de trigo.

La CRA de los geles con miel y harina de trigo se muestra en la figura 7.2. El análisis de varianza mostró que la CRA de los geles preparados a diferentes pHs, contenido de harina de trigo y contenido de miel es significativamente diferente ($P < 0.01$). Se encontraron interacciones significativas ($P < 0.01$) entre los factores pH-contenido de harina de trigo, pH-contenido de miel, contenido de harina de trigo-contenido de miel y pH-contenido de harina de trigo-contenido de miel.

Como en el caso anterior, la miel incrementó la CRA a todos los pHs ensayados, y el mínimo valor de CRA se obtuvo en los geles de pH 4,2 sin harina de trigo. La CRA de los geles con harina de trigo fue cercana al 100%, probablemente debido a la capacidad del almidón gelatinizado y de las proteínas de almacenamiento de la harina de trigo de ligar agua. Dichas proteínas pueden formar puentes hidrógeno con el agua [1/3 de los residuos de aminoácidos de las proteínas de almacenamiento de la harina de trigo son glutamina que puede absorber hasta dos veces su peso en agua (Manley, 2000)].

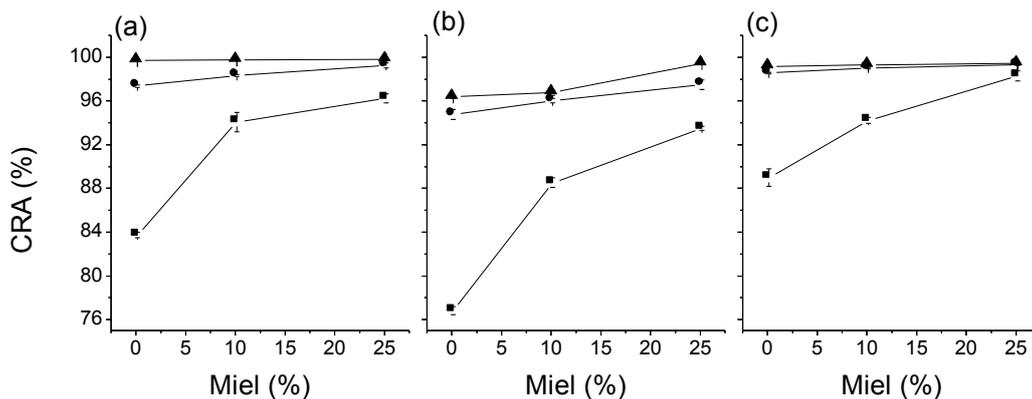


Figura 7.2. Capacidad de retención de agua (CRA) de geles de CPL en función de la concentración de miel. Contenido de proteínas de suero de los geles: 10% p/p. (a) pH 3,75; (b) pH 4,2; (c) pH 7,0. Contenido de harina de trigo de los geles (■) 0%; (●) 10%; (▲) 20%. Las barras muestran la desviación estándar ($LSD_{0,05} = 4,73$).

7.3. Conclusiones.

De los resultados mostrados arriba se desprende que la CRA de los geles es afectada por las condiciones de pH al cual los geles fueron preparados y por la presencia de miel y de harina de trigo.

En el caso de los geles con miel sólo a bajas concentraciones de miel el efecto del pH es bien notorio. Por el contrario, a altas concentraciones de miel predomina el efecto ligante de agua de este componente, haciendo que las diferencias en la CRA debidas al pH sean menos importantes.

Por último, en los geles que además de miel contienen harina de trigo, el efecto del pH y de la miel es el mismo que en el caso anterior, con la diferencia que un 10 a 20% de harina de trigo aumenta la CRA hasta casi un 100%, enmascarando completamente el efecto de la miel y el pH.

8. Color de los geles.

8.1. Introducción.

Vivimos en un mundo de color. Tanto es así que asociamos a códigos de colores los objetos, entornos y paisajes que tenemos a nuestro alrededor. Cambios en esos códigos se interpretan como alteraciones del entorno, de modo que nos informan de su estado o de su evolución a lo largo del tiempo. Algo así ocurre también con los alimentos. En efecto, el color es la primera sensación que se percibe. Es también un factor importante dentro del conjunto de sensaciones que aporta el alimento, y tiende a veces a modificar subjetivamente otras sensaciones como el sabor y el olor. Las preferencias por el color de los alimentos, por ser éste precisamente un factor subjetivo, no son las mismas para cada persona, y varían según las regiones, países o edades (Calvo, 1999).

El color es uno de los principales atributos de calidad que tiene el consumidor a la hora de seleccionar los alimentos y determina el primer juicio sobre su calidad. El estudio del color está tomando una gran importancia en la industria de los alimentos debido a que se está utilizando como herramienta para la automatización y control de procesos en la elaboración de diversos productos, y en el control de calidad del producto acabado. El color en los alimentos depende fundamentalmente de los pigmentos propios o adicionados y de las transformaciones que tienen lugar en el procesamiento y almacenamiento. Muchos de los cambios de color que ocurren durante la elaboración de los alimentos son característicos de los mismos. El seguimiento tanto de procesos de elaboración como de las alteraciones de los alimentos puede realizarse mediante la determinación del color (Francis, 1987).

El objetivo de este capítulo es el análisis del color de los geles, y las condiciones que pueden influir en el color final de éstos. Para esto se midieron los parámetros de Hunter.

8.2. Resultados y discusión.

8.2.1. Geles con miel.

Los parámetros de Hunter a , b y L de los geles de CPL-miel se muestran en la figura 8.1. Se observa que el aumento de la concentración de miel incrementó los parámetros a y b y disminuyó L a todos los pHs ensayados. El parámetro a indica el grado de rojo y el b el grado de amarillo de una muestra. Esto es causado por el propio color de la miel y por las reacciones de Maillard que se ven favorecidas por la presencia de los azúcares reductores que se encuentran en la miel. Esta disminución en el valor de L indica que la mayor parte de la luz que pasa a través del gel no es reflejada, es decir que la miel y las reacciones de Maillard que tuvieron lugar aumentan la absorción de luz por parte del gel transformándolo en menos luminoso.

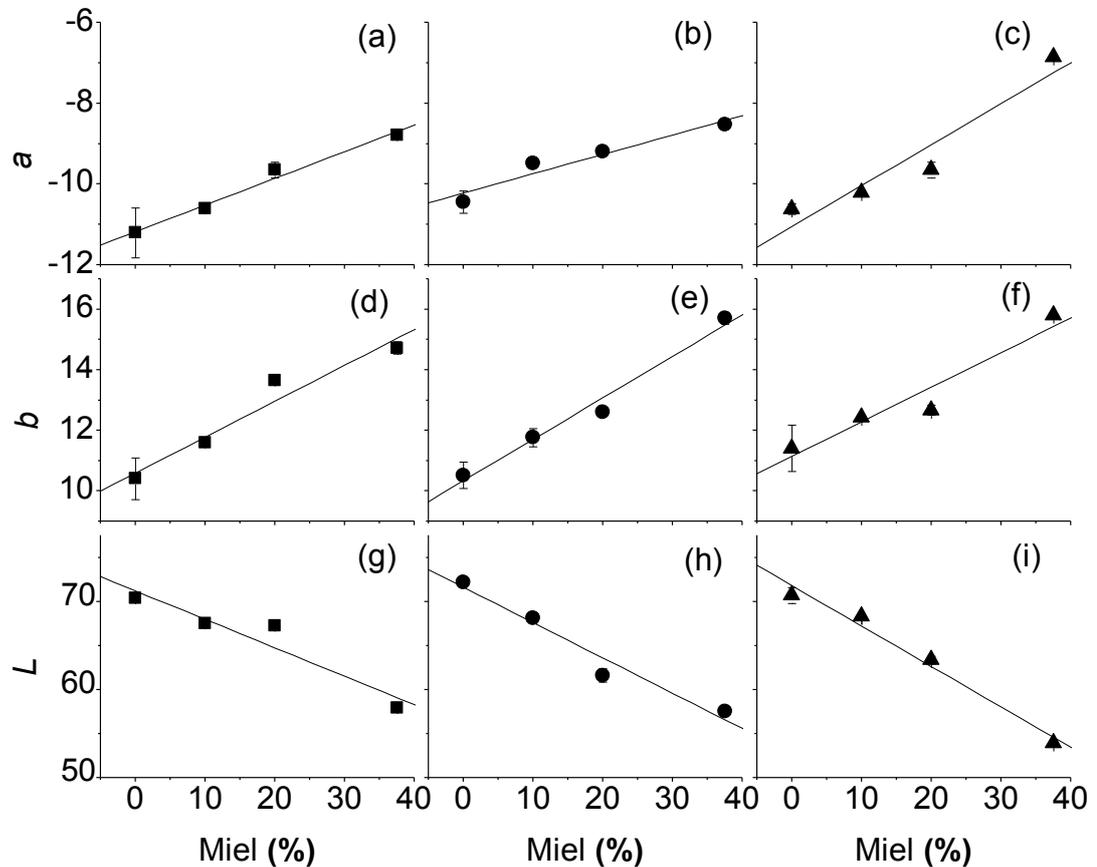


Figura 8.1. Parámetros de Hunter de geles de CPL en función del contenido de miel. Contenido de proteínas de los geles: 10% p/p. pH de los geles: (■) 3,75; (●) 4,2; (▲) 7,0. (a, b, c) parámetro a ; (d, e, f) parámetro b ; (g, h, i) parámetro L . Las barras muestran la desviación estándar. ($LSD_{0,05} a = 0,39$; $LSD_{0,05} b = 0,63$; $LSD_{0,05} L = 0,78$).

En la tabla 8.1 se observa que existe una relación lineal entre los parámetros de Hunter y la concentración de miel, siendo la pendiente de la recta del parámetro *a* de los geles preparados a pH 7,0 mayor que las correspondientes a los geles preparados a pH ácido. Igualmente, la pendiente de la recta del parámetro *L* es más negativa en los geles preparados a pH 7,0. Esto indica que la miel incrementa las reacciones de pardeamiento principalmente a pH 7,0, lo cual es esperado dado que las reacciones de Maillard se ven favorecidas a este pH (Namiki y col., 1983).

Parámetro de Hunter	pH de los geles	Pendiente	Coefficiente de correlación
<i>a</i>	3,75	0,066 ± 0,006	0,992
	4,2	0,048 ± 0,009	0,963
	7,0	0,101 ± 0,022	0,955
<i>b</i>	3,75	0,118 ± 0,020	0,971
	4,2	0,137 ± 0,014	0,989
	7,0	0,114 ± 0,023	0,962
<i>L</i>	3,75	-0,323 ± 0,075	-0,951
	4,2	-0,400 ± 0,060	-0,979
	7,0	-0,459 ± 0,047	-0,990

Tabla 8.1. Pendiente y coeficiente de correlación de las rectas obtenidas por regresión lineal de los parámetros de Hunter *a*, *b* y *L* de los geles de CPL en función de la concentración de miel.

8.2.2. Geles con miel y harina de trigo.

La figura 8.2 muestra los parámetros de Hunter *a*, *b* y *L* de los geles de CPL-miel-harina de trigo. Como en el caso anterior, se observa que el aumento de la concentración de miel incrementó los parámetros *a* y *b*, con lo que aumentó el grado de rojo y amarillo de los geles, respectivamente, y disminuyó *L*, con lo que decreció la luminosidad de los mismos, a todos los pHs ensayados. Como se discutió anteriormente, esto es causado por el propio color de la miel y por las

reacciones de Maillard que se ven favorecidas por la presencia de los azúcares reductores de la miel.

La hidrólisis de los carbohidratos de los alimentos está influenciada por factores tales como la temperatura y el pH, entre otros. Esta hidrólisis puede ser muy importante en ciertas técnicas de procesado y conservación, pudiendo llevar en ocasiones a cambios de color y de otras propiedades funcionales. Los enlaces glicosídicos son más rápidamente escindidos en medio ácido que en medio alcalino, especialmente cuando son sometidos a altas temperaturas.

La harina de trigo, al igual que la miel, incrementó los parámetros *a* y *b* y disminuyó *L*. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que, si bien el principal componente de la harina de trigo es el almidón, un polisacárido no reductor, éste puede sufrir un cierto grado de hidrólisis cuando se le calienta aportando, de este modo, azúcares reductores. De esta manera, durante la gelificación térmica de una dispersión de CPL – miel – harina de trigo se pueden producir azúcares reductores que favorecen las reacciones de pardeamiento, modificando el color del gel obtenido.

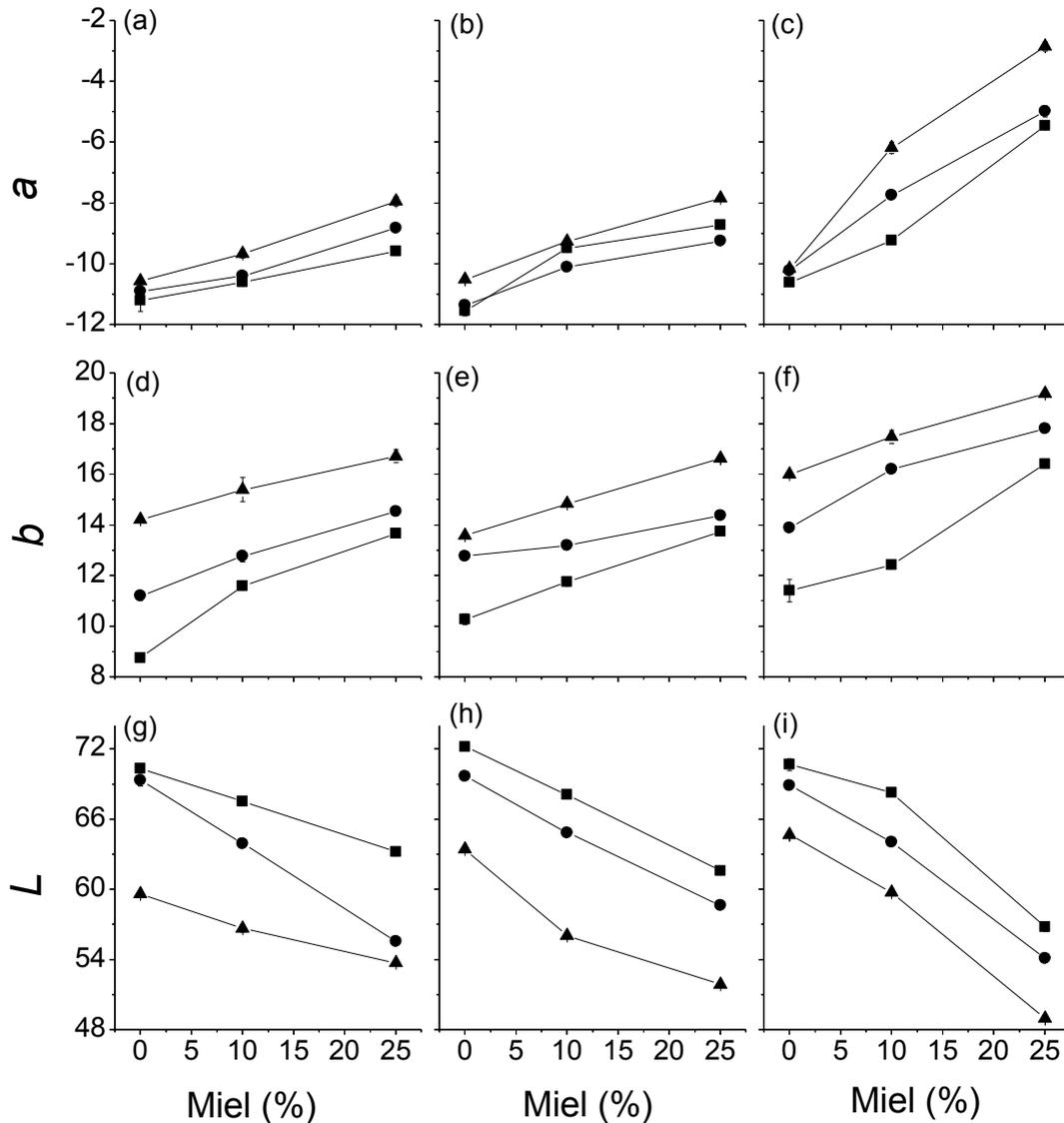


Figura 8.2. Parámetros de Hunter de geles de CPL en función del contenido de miel. Contenido de proteínas de suero de los geles: 10% p/p. pH de los geles: (a, d, g), 3,75; (b, e, h), 4,2; (c, f, i), 7,0. (a, b, c) parámetro a ; (d, e, f) parámetro b ; (g, h, i) parámetro L . Contenido de harina de trigo: (■), 0%; (●), 10%; (▲), 20%. Las barras muestran la desviación estándar. ($LSD_{0,05} a = 1,07$; $LSD_{0,05} b = 0,80$; $LSD_{0,05} L = 2,35$).

En la tabla 8.2 se observa que, como se discutió previamente, existe una relación lineal entre los parámetros de Hunter y la concentración de miel, siendo las pendientes de las rectas de los parámetros a , b y L de los geles preparados a pH 7,0 mayores que las correspondientes a los geles preparados a pH ácido. Esto

indica que la miel incrementa las reacciones de pardeamiento principalmente a pH 7,0, lo cual es esperado dado que las reacciones de Maillard se ven favorecidas a este pH (Namiki y col., 1983). Por otro lado, el incremento en la concentración de harina de trigo no produjo una tendencia definida en la pendiente de estas rectas.

Parámetro Hunter	de pH	% Harina de trigo	Pendiente	Coefficiente de correlación	
L	3,75	0	$-0,285 \pm 0,011$	-0,999	
		10	$-0,552 \pm 0,052$	-0,999	
		20	$-0,231 \pm 0,037$	-0,993	
	4,2	0	$-0,424 \pm 0,010$	-0,999	
		10	$-0,440 \pm 0,025$	-0,999	
		20	$-0,448 \pm 0,127$	-0,962	
	7,0	0	$-0,572 \pm 0,144$	-0,969	
		10	$-0,596 \pm 0,057$	-0,996	
		20	$-0,635 \pm 0,063$	-0,995	
	a	3,75	0	$0,065 \pm 0,002$	0,999
			10	$0,085 \pm 0,015$	0,986
			20	$0,105 \pm 0,071$	0,998
4,2		0	$0,109 \pm 0,042$	0,931	
		10	$0,082 \pm 0,018$	0,976	
		20	$0,287 \pm 0,048$	0,986	
7,0		0	$0,211 \pm 0,031$	0,989	
		10	$0,208 \pm 0,018$	0,996	
		20	$0,287 \pm 0,048$	0,986	
b	3,75	0	$0,130 \pm 0,005$	0,999	
		10	$0,132 \pm 0,010$	0,997	
		20	$0,099 \pm 0,008$	0,997	
	4,2	0	$0,138 \pm 0,005$	0,999	
		10	$0,065 \pm 0,010$	0,988	
		20	$0,121 \pm 0,001$	0,999	
	7,0	0	$0,205 \pm 0,045$	0,977	

10	$0,152 \pm 0,034$	0,976
20	$0,126 \pm 0,009$	0,998

Tabla 8.2. Pendiente y coeficiente de correlación de las rectas obtenidas por regresión lineal de los parámetros de Hunter a , b y L de los geles de CPL en función de la concentración de miel.

8.3. Conclusiones.

De los resultados obtenidos se concluye que tanto la presencia de miel como de harina de trigo modifica los parámetros de Hunter de los geles.

La miel no sólo cambia el color de dichos geles debido al color que ella aporta sino también debido a que favorece las reacciones de Maillard por la presencia de los azúcares reductores que contiene. Por otro lado, la harina de trigo presenta un comportamiento similar al de la miel, con la diferencia que por sí misma no aporta color a los geles sino a través de reacciones de pardeamiento no enzimático.

*9. Propiedades reológicas de los
geles: Textura*

9.1. Introducción.

La textura de un alimento es un factor que influye en gran medida en la evaluación que hacen los consumidores sobre la calidad del mismo. Esta normalmente se refiere a cómo se comporta un alimento justo antes de ser ingerido y después de ser introducido en la boca (Thibodeau, 2004). Para Bourne (1982) es un conjunto de propiedades físicas que derivan de la estructura del alimento, relacionadas con la deformación, desintegración y flujo del mismo bajo una fuerza.

Los métodos instrumentales para la medida de la textura se dividen en tres clases (Bourne, 1978):

- a) Ensayos fundamentales: miden parámetros relacionados con el área de la ingeniería tales como: módulo de Young, módulo de corte, módulo de cizalla, relación de Poisson, etc. Estos ensayos no correlacionan bien con la evaluación sensorial de las propiedades de textura de los alimentos.
- b) Ensayos empíricos: cubren una serie de ensayos tales como la punción, corte, extrusión, etc. Los ensayos de esta categoría dan una buena correlación con la evaluación sensorial de la textura en un número limitado de alimentos.
- c) Ensayos imitativos: son ensayos que intentan imitar con instrumentos las condiciones a las cuales el alimento está sujeto en la boca. Es en esta categoría donde cae el análisis de perfil de textura.

Actualmente uno de los métodos instrumentales más usados en las medidas de textura de geles proteicos es el ensayo de compresión uniaxial en platos paralelos, usando un analizador de texturas o texturómetro.

El objetivo del presente capítulo es estudiar cómo influye la miel, la harina de trigo y el pH sobre la textura de los geles de CPL.

9.2. Resultados y discusión.

9.2.1. Geles con miel.

Firmeza.

La figura 9.1 muestra la firmeza de los geles de CPL en función de la concentración de miel. Los geles sin miel preparados a pHs ácidos y a pH neutro presentaron una firmeza similar, aunque la firmeza de los geles de pH 3,75 fue un poco mayor. Estos resultados concuerdan con datos previos (Lupano, 2000a, 2000b; Lupano y col., 1992) y con los resultados informados por Shimada y col. (1988), quienes encontraron que los geles de aislados de proteínas de suero preparados a pH neutro y a pH 3,5 tienen similar firmeza, observando un incremento de ésta en los geles preparados a pH 6,5 y una disminución de dicho parámetro en geles preparados a pH mayor que 7,5. Por el contrario, Tang y col. (1995) encontraron que la firmeza de los geles de CPL presentaba un máximo a pH 7,5 y disminuía a valores mínimos a pHs menores que 6. La miel incrementó levemente la firmeza de los geles preparados a pH 3,75 pero no modificó apreciablemente la firmeza de los geles preparados a pH 7,0 y 4,2.

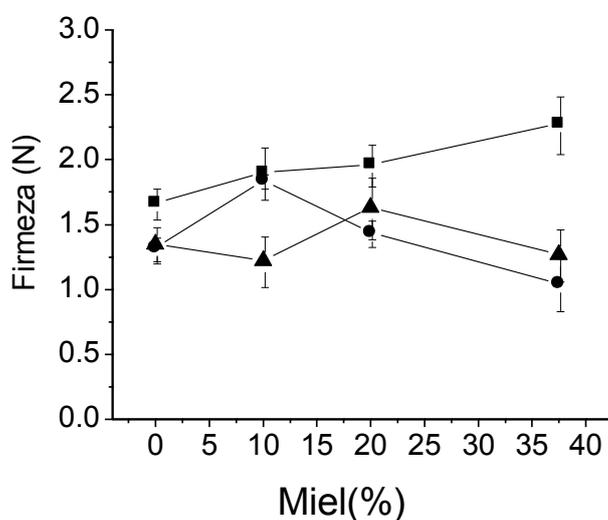


Figura 9.1. Firmeza (expresada en Newtons) de geles de CPL en función de la concentración de miel. Contenido proteico de los geles: 10% p/p. pH de los geles: (■) 3,75; (●) 4,2; (▲) 7,0. Las barras muestran la desviación estándar ($LSD_{0,05} = 0,27$).

Elasticidad.

La figura 9.2 muestra la elasticidad de los geles de CPL preparados a diferentes pHs y en función de la concentración de miel. La elasticidad de los geles sin miel concuerda con resultados previos (Lupano y col., 1992). Como se esperaba, la elasticidad fue mayor en geles preparados a pH 7,0, al cual las reacciones de intercambio sulfhidrilo-disulfuro son favorecidas. La miel no modificó apreciablemente la elasticidad de los geles de CPL, aunque se observó una pequeña disminución de la elasticidad en geles preparados a pH 3,75 y 7,0 con 37,5% de miel y en geles preparados a pH 4,2 con contenidos de miel de 20% o más.

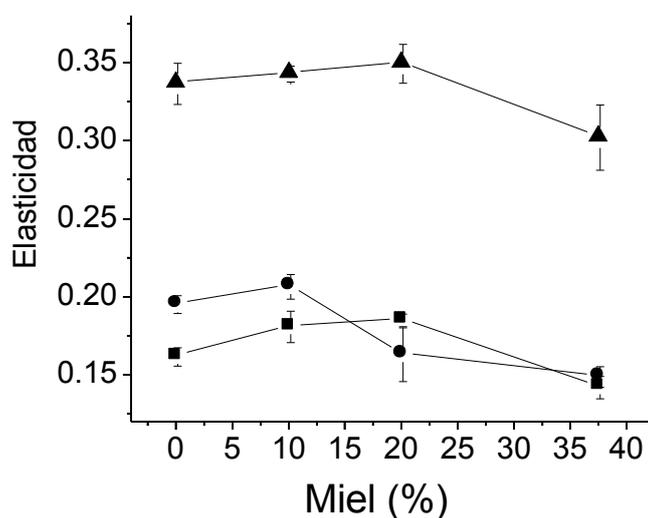


Figura 9.2. Elasticidad de geles de CPL en función de la concentración de miel. Contenido proteico de los geles: 10% p/p. pH de los geles: (■) 3,75; (●) 4,2; (▲) 7,0. Las barras muestran la desviación estándar ($LSD_{0,05} = 0$).

Tiempo de relajación.

Si una muestra del material en estudio es deformada hasta un cierto porcentaje y la deformación es mantenida a un nivel constante, el estrés desarrollado en la muestra durante la deformación comienza a relajarse gradualmente (Bloksma, 1978). El tiempo de relajación de los geles sin miel disminuyó con el pH

(figura 9.3), en concordancia con resultados previos (Lupano, 2000a, Lupano y col., 1992). La figura 9.3 muestra también que el tiempo de relajación disminuye con el contenido de miel en geles preparados a pH 7,0 y 4,2, alcanzando en este último un valor similar a los geles de pH 3,75. Este comportamiento sugiere que la miel incrementa el comportamiento viscoso de los geles de CPL. Los puentes hidrógeno entre pequeñas moléculas incrementan significativamente la viscosidad de los líquidos, y los enlaces son lo suficientemente débiles para ser temporalmente extendidos, intercambiados o rotos (Pomeranz, 1978). La miel, debido a su alto contenido de azúcares, tiene la posibilidad de formar enlaces puentes hidrógeno, y de esta manera incrementar el comportamiento viscoso de los geles. Por otro lado, los geles preparados a pH 3,75 presentaron características viscosas antes del agregado de miel, por lo que la miel no modificó apreciablemente el tiempo de relajación de estos geles.

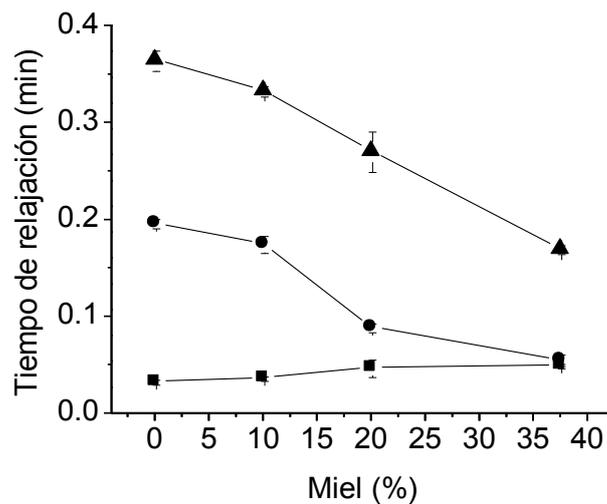


Figura 9.3. Tiempo de relajación (expresado en minutos) de geles de CPL en función de la concentración de miel. Contenido proteico de los geles: 10% p/p. pH de los geles: (■) 3,75; (●) 4,2; (▲) 7,0. Las barras muestran la desviación estándar ($LSD_{0,05} = 0,08$).

Adhesividad.

La adhesividad es el trabajo necesario para superar las fuerzas atractivas entre la superficie de un alimento y la superficie de otro material con el que el alimento entra en contacto (Larmond, 1976). La teoría de adhesión propone que un material se adhiere debido a fuerzas interatómicas e intermoleculares tales como los enlaces covalentes, iónicos y fuerzas de Van der Waals. La adhesión de un material puede describirse en términos de la suma de dos energías: la energía de superficie y la energía cohesiva. La energía de superficie depende de la fuerza del enlace entre la muestra y la superficie con la que entra en contacto, mientras que la energía cohesiva representa la energía disipada en la deformación plástica y viscoelástica (Dobraszcyk, 1997). La figura 9.4 muestra la adhesividad de los geles de CPL en función del contenido de miel. La adhesividad de los geles ácidos se incrementó con la concentración de miel, especialmente en los geles de pH 3,75. Es posible que a pHs ácidos los azúcares de la miel se adhieran fácilmente al metal de la sonda de prueba. Además, los geles preparados a pH 7,0 son más cohesivos y, de este modo, tendrían una capacidad reducida para adherirse a otros materiales. Esto probablemente se deba a la presencia de puentes disulfuro que reducirían la deformación plástica necesaria para adherirse a una superficie.

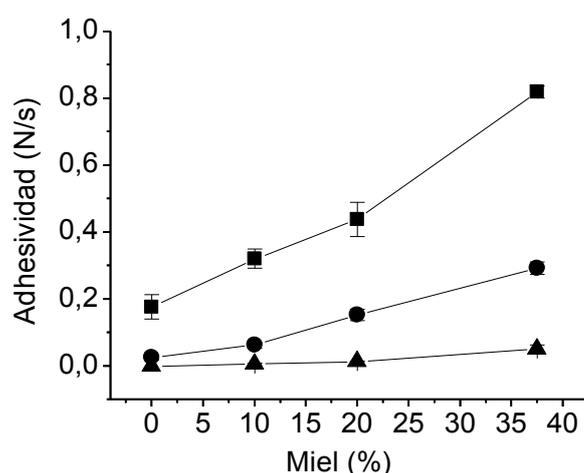


Figura 9.4. Adhesividad (expresada en Newtons/segundo) de geles de CPL en función de la concentración de miel. Contenido proteico de los geles: 10% p/p. pH de los geles: (■) 3,75; (●) 4,2; (▲) 7,0. Las barras muestran la desviación estándar ($LSD_{0,05} = 0$).

Cohesividad.

En la figura 9.5 se puede ver la cohesividad de los geles de CPL en función de la concentración de miel. Los geles preparados a pH 7,0 presentaron una cohesividad mayor que los geles ácidos, en concordancia con datos informados por Tang y col. (1995). Esto se puede explicar teniendo en cuenta que los enlaces disulfuro están involucrados en el mantenimiento de la estructura de los geles de pH 7,0, mientras que los enlaces no covalentes son responsables del mantenimiento de la estructura de los geles ácidos (Lupano y col.,1992). La presencia de miel no modificó apreciablemente la cohesividad de los geles preparados a pH 7,0 y 3,75, mientras que a contenidos de miel del 20% o más la cohesividad de los geles de pH 4,2 disminuyó, en coincidencia con el incremento de la solubilidad en buffer de pH 8,0 de los constituyentes proteicos de estos geles (capítulo 5, figura 5.1).

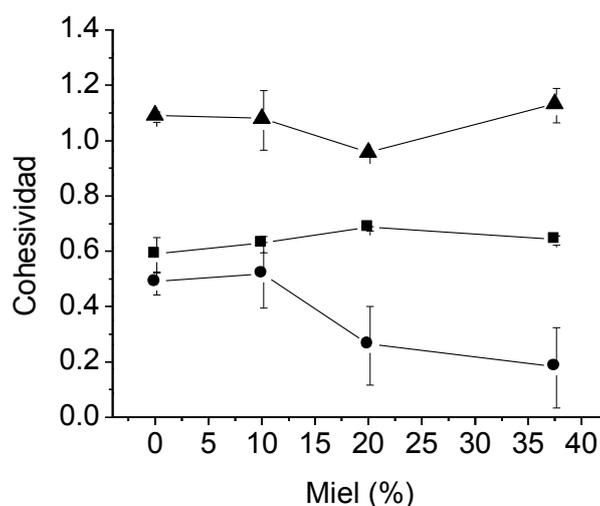


Figura 9.5. Cohesividad de geles de CPL en función de la concentración de miel. Contenido proteico de los geles: 10% p/p. pH de los geles: (■) 3,75; (●) 4,2; (▲) 7,0. Las barras muestran la desviación estándar ($LSD_{0,05} = 0,09$).

9.2.2. Geles con miel y harina de trigo.

Firmeza.

En la figura 9.6 se observa la firmeza de los geles de CPL en función de la concentración de miel y a diferentes pHs. La miel no modificó apreciablemente la firmeza de los geles de CPL, excepto a pH 7,0 y 20% de harina de trigo, donde se observó un pequeño incremento de dicho parámetro. Por otro lado, el aumento en la concentración de harina de trigo aumentó marcadamente la firmeza de los geles a todos los pHs ensayados. Este aumento es posible debido a la presencia de almidón gelatinizado y de una red discontinua de gluten, que contribuyen a definir el valor final de la firmeza de los geles.

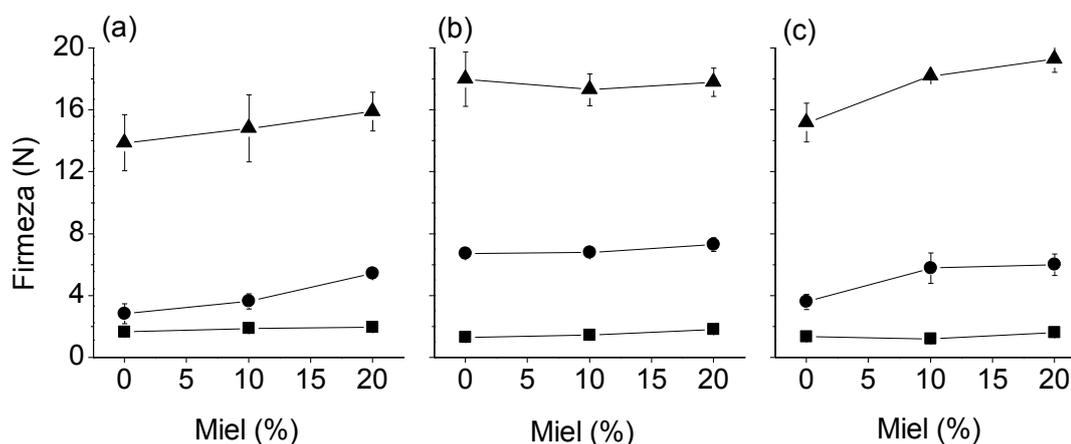


Figura 9.6. Firmeza (expresada en Newtons) de geles de CPL en función de la concentración de miel. Contenido de proteínas de suero de los geles: 10% p/p. Contenido de harina de trigo de los geles: (■), 0%; (●), 10%; (▲), 20% p/p. (a) pH 3,75; (b) pH 4,2; (c) pH 7,0. Las barras muestran la desviación estándar (LSD_{0,05} = 1,40).

Elasticidad.

El efecto de la concentración de miel, del contenido de harina de trigo y del pH sobre la elasticidad de los geles de CPL se muestra en la figura 9.7. La miel no presentó mayor influencia sobre la elasticidad de los geles, excepto a altas

concentraciones de harina de trigo, donde se observa una disminución de dicho parámetro con el aumento de la concentración de miel. Los azúcares interfieren en la formación de la red de gluten (Manley, 2000), lo que puede explicar que a altas concentraciones de miel no sea tan marcado el aumento de elasticidad provocado por la harina de trigo. Por el contrario, el aumento en la concentración de la harina de trigo aumentó la elasticidad de los geles de CPL, probablemente debido a la presencia de las proteínas de almacenamiento de la harina de trigo que forman el gluten, ya que una de las propiedades del gluten es la elasticidad. Como era de esperar, la elasticidad en los geles de pH 7,0 fue mayor que en los geles de pHs ácidos, dado que las reacciones de intercambio sulfhidrilo-disulfuro se ven favorecidas a pH neutro.

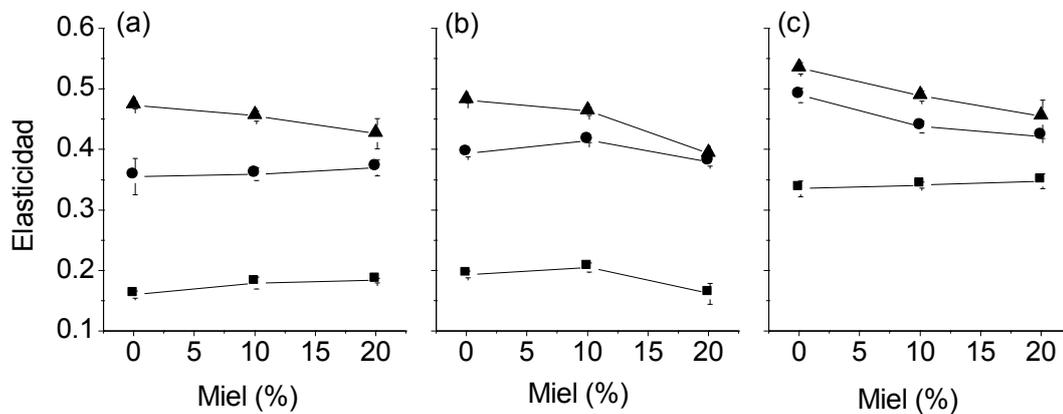


Figura 9.7. Elasticidad de geles de CPL en función de la concentración de miel. Contenido de proteínas de suero de los geles: 10% p/p. Contenido de harina de trigo de los geles: (■), 0%; (●), 10%; (▲), 20% p/p. (a) pH 3,75; (b) pH 4,2; (c) pH 7,0. Las barras muestran la desviación estándar ($LSD_{0,05} = 0,06$).

Tiempo de relajación.

La figura 9.8 muestra el tiempo de relajación de los geles de CPL en función de la concentración de miel. En coincidencia con resultados previos (Lupano 2000 a y Lupano y col. 1992) el tiempo de relajación se incrementó cuando el pH se modificó de 3,75 a 7,0.

En base a lo mencionado anteriormente, la miel, debido a su alto contenido de azúcares, tiene la posibilidad de formar enlaces de puentes de hidrógeno y de esta manera incrementar el comportamiento viscoso de los geles. De aquí que el tiempo de relajación disminuya con el aumento de la concentración de este componente, excepto en los geles de pH 3,75, los cuales ya presentaban características viscosas antes del agregado de miel.

El efecto de la harina de trigo sobre el tiempo de relajación fue diferente de acuerdo al pH del gel; así, en los geles preparados a pH 3,75 el tiempo de relajación aumentó cuando el contenido de harina de trigo se incrementó de 0 a 20%; sin embargo, a pH 4,2 la harina de trigo no tuvo ningún efecto sobre dicho parámetro. Resultados similares encontró Lupano (2000 a) en los sistemas CPL – gluten. A pH neutro el aumento en la concentración de harina de trigo disminuyó el tiempo de relajación. Probablemente la interacción entre los diversos componentes de la harina de trigo y las proteínas del suero a pH 7,0 sea tal que a altas concentraciones de harina de trigo se contrarreste el efecto del pH. Es posible que haya alguna reacción de intercambio sulfhidrilo-disulfuro entre las proteínas de almacenamiento de la harina de trigo y las de lactosuero, como se discutió anteriormente. En los geles con 20% de harina de trigo, el tiempo de relajación parece no depender del pH, siendo similar en todos los casos.

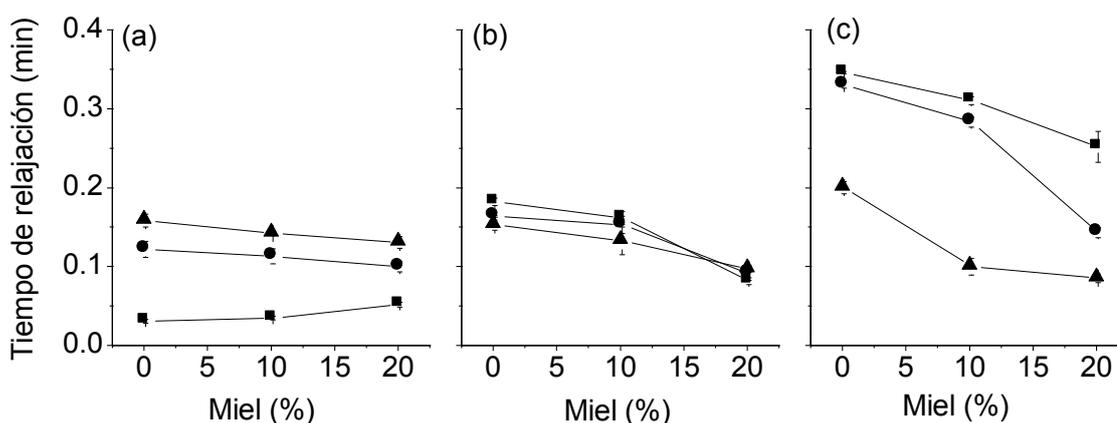


Figura 9.8. Tiempo de relajación de geles de CPL en función de la concentración de miel. Contenido de proteínas de suero de los geles: 10% p/p. Contenido de harina de trigo de los geles: (■), 0%; (●), 10%; (▲), 20% p/p. (a) pH 3,75; (b) pH 4,2; (c) pH 7,0. Las barras muestran la desviación estándar ($LSD_{0,05} = 0,07$).

Adhesividad.

La figura 9.9 muestra la adhesividad de los geles de CPL en función de la concentración de miel. Como se mencionó anteriormente la miel aumenta la adhesividad de los geles preparados a pH ácido, pero no la modifica a pH neutro, probablemente debido a que estos últimos son más cohesivos, lo que hace que tengan una menor capacidad para adherirse a otras superficies. Por otro lado la harina de trigo aumenta la adhesividad sólo a pH 4,2 y 7,0.

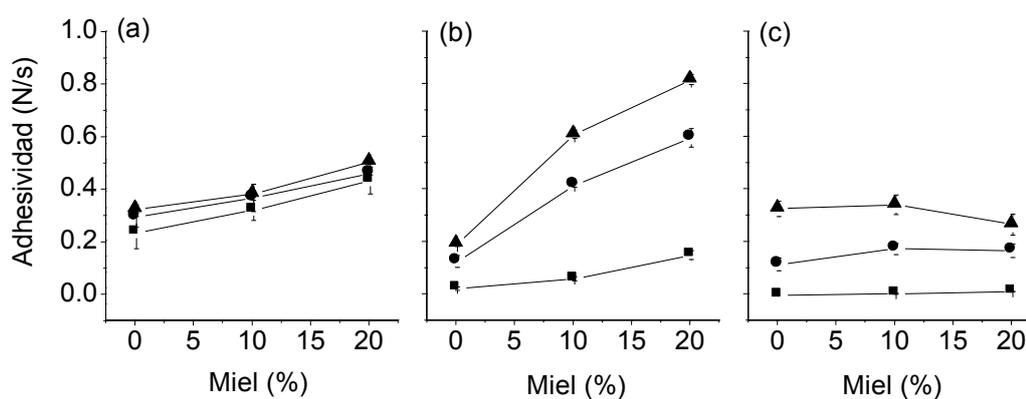


Figura 9.9. Adhesividad (expresada en Newtons/segundo) de geles de CPL en función de la concentración de miel. Contenido de proteínas de suero de los geles: 10% p/p. Contenido de harina de trigo de los geles: (■), 0%; (●), 10%; (▲), 20% p/p. (a) pH 3,75; (b) pH 4,2; (c) pH 7,0. Las barras muestran la desviación estándar ($LSD_{0,05} = 0,20$).

Cohesividad.

La cohesividad de los geles de CPL en función de la concentración de miel se muestra en la figura 9.10. Como se esperaba, y en base a lo dicho anteriormente, la cohesividad de los geles de pH 7,0 fue mayor, en la mayoría de los casos, que la de los geles ácidos. La harina de trigo aumentó la cohesividad de los geles de pH 3,75 y 4,2 probablemente al favorecer un aumento en la fuerza cohesiva que mantiene unida a las moléculas de estos geles por un aumento en las interacciones no covalentes, que como se mencionó en capítulos anteriores, son las responsables principales de la estructura de los geles ácidos. Por el contrario, la

harina de trigo disminuyó levemente la cohesividad de los geles de pH 7,0, probablemente debido a la interferencia mutua en la formación de puentes disulfuro que podría presentarse entre las proteínas del lactosuero y las proteínas de la harina de trigo, tal como se describió en el capítulo 4. De esta manera, en los geles neutros y a altas concentraciones de harina de trigo se obtienen valores de cohesividad similares a los de los geles ácidos a las máximas concentraciones de harina de trigo. Tal como se observó en el tiempo de relajación, en geles con 20% de harina de trigo la cohesividad no depende del pH.

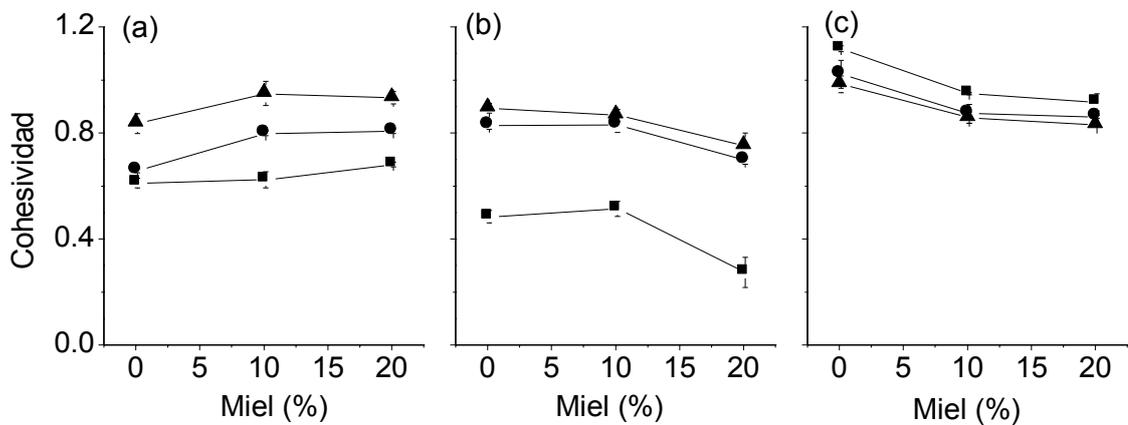


Figura 9.10. Cohesividad de geles de CPL en función de la concentración de miel. Contenido de proteínas de suero de los geles: 10% p/p. Contenido de harina de trigo de los geles: (■), 0%; (●), 10%; (▲), 20% p/p. (a) pH 3,75; (b) pH 4,2; (c) pH 7,0. Las barras muestran la desviación estándar ($LSD_{0,05} = 0,13$).

9.3. Conclusiones.

Los resultados arriba mostrados indican que la miel, la harina de trigo y el pH modifican en mayor o menor medida los diferentes parámetros de textura de los geles. La miel aumentó la adhesividad de los geles ácidos pero no la de los geles neutros, en los cuales predominan las propiedades cohesivas. Asimismo, la miel disminuyó el tiempo de relajación de los geles de pH 7,0 y 4,2 pero no el de los geles de pH 3,75, los cuales ya presentaban características viscosas antes del agregado de la miel. El resto de los parámetros tales como la firmeza, elasticidad y cohesividad no fueron modificados apreciablemente por la presencia de miel.

Por otro lado, la harina de trigo, salvo excepciones, modificó todos los parámetros de textura en todas las condiciones ensayadas. La firmeza y la elasticidad aumentaron cuando se aumentó la concentración de harina de trigo, esto podría explicarse considerando que el gluten y el almidón insertos en la matriz del gel contribuyen al aumento de la firmeza. Asimismo, la red de gluten, aunque discontinua, sería la responsable del aumento de la elasticidad de los geles. La harina de trigo incrementó la fuerza cohesiva que mantiene la estructura de los geles ácidos, y la adhesividad de los geles preparados a pH 4,2 y 7,0. Por último, la harina aumentó el tiempo de relajación de los geles de pH 3,75, pero disminuyó el tiempo de relajación de los geles preparados a pH neutro.

En los geles con 20% de harina de trigo, es ésta la que determina principalmente las propiedades de firmeza, elasticidad, tiempo de relajación y cohesividad de los geles, siendo éstas prácticamente independientes del pH.

*9. Propiedades reológicas de los
geles: Viscoelasticidad*

10.1. Introducción.

La propiedad viscoelástica de un alimento es uno de los factores que determinan la forma en que los consumidores evalúan la calidad del mismo. La viscoelasticidad de los alimentos consiste en una serie de propiedades físicas de éstos que tienen íntima relación con su estructura.

Los geles de proteínas de lactosuero son materiales viscoelásticos, y las medidas oscilatorias proveen un método no destructivo para determinar los componentes viscoso y elástico. En este tipo de ensayos se aplica una deformación oscilatoria de amplitud constante, y se mide como señal el esfuerzo de corte de respuesta.

Este capítulo tiene como objetivo caracterizar a los distintos tipos de geles por medio de medidas de propiedades dinámicas y determinar, comparando con los modelos empíricos, la naturaleza viscoelástica de los mismos, y de este modo poder predecir su comportamiento reológico dentro de un alimento.

10.2. Resultados y discusión.

10.2.1. Geles con miel.

Efecto de la temperatura de gelificación.

La figura 10.1 muestra la variación de los módulos elásticos (G') y viscoso (G'') con la temperatura ($\omega = 1$ rad/seg). Se realizaron barridos de frecuencia calentando la muestra previamente durante 45 minutos a 60, 70, 80 y 90°C, y determinando luego el valor de G' y G'' a dichas temperaturas y a una $\omega = 1$ rad/seg. A 60°C el valor del módulo de almacenamiento es similar en todas las condiciones ensayadas; sin embargo, cuando la temperatura se eleva G' aumenta, siendo este efecto más importante en los geles de pH 7,0. Puppo y col. (1998) obtuvieron resultados similares con geles de proteínas de soja. El cambio pronunciado en el valor de G' que sucede entre 70°C y 90°C en los geles de pH 7,0 con 0, 10 y 27,5% de miel concuerda con la temperatura de desnaturalización de la β -lactoglobulina (76 – 82°C de acuerdo a Bernal y col., 1985). Este importante

cambio en G' puede ser explicado teniendo en cuenta que, a medida que la β -lactoglobulina se desnaturaliza, los grupos sulfhidrilos expuestos comienzan a participar en reacciones de intercambio sulfhidrilo – disulfuro, que además son favorecidas a pH neutro. Esto concuerda con los resultados mostrados en el capítulo 9, donde se mostró que la elasticidad de los geles de pH 7,0 fue mayor que la de los geles ácidos. Los resultados corroboran el hecho que los puentes disulfuro juegan un rol importante en el comportamiento sólido de geles neutros. Las reacciones de intercambio sulfhidrilo – disulfuro prácticamente no tienen lugar a pHs ácidos, de aquí que el comportamiento de tipo sólido de los geles ácidos depende de interacciones no covalentes (puentes hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y electrostáticas). El pequeño incremento de G' con la temperatura en los geles ácidos se debería solamente a las uniones hidrofóbicas, que se favorecen con la temperatura.

El valor de G'' se incrementó entre 60°C y 90°C en geles ácidos con miel, mientras que en geles de pH 7,0 su valor no se modificó apreciablemente. La miel interviene en el comportamiento reológico de los geles a través de su capacidad para formar puentes hidrógeno. Estos puentes hidrógeno se rompen con la temperatura, explicando el aumento de G'' al pasar de 60 a 90°C en los geles ácidos. En los geles neutros, por otra parte, las propiedades reológicas están dadas fundamentalmente por los puentes disulfuro quienes, como se mencionó anteriormente, contribuyen al comportamiento de tipo sólido.

Los valores de G' en geles de pH 7,0 a altos contenidos de miel (32,5 y 37,5%) se incrementaron muy poco con la temperatura. Esto puede ser debido en parte al efecto de protección que la miel ejerce sobre la desnaturalización térmica de proteínas, tal como se mencionó en el capítulo 3 y a la interferencia de la miel en la formación de la estructura del gel.

Si comparamos el efecto de la miel sobre el componente elástico de los geles neutros (Fig. 10.1.c) con el efecto de la miel sobre la elasticidad de los geles (Fig. 9.2. Capítulo 9) (tanto el comportamiento elástico como la elasticidad de los geles están relacionadas con el carácter sólido de los mismos) observamos que la elasticidad de los geles disminuye ligeramente a altos contenidos de miel. Por el contrario, el efecto de la miel sobre G' en los geles de pH 7,0 es muy marcado a 80 y 90°C. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que en el primer caso las medidas se realizaron a temperatura ambiente, mientras que las medidas de G' se

analizaron a la temperatura de calentamiento de cada dispersión (60, 70, 80 y 90°C). Los puentes hidrógeno se rompen durante el calentamiento y se refuerzan durante el enfriamiento. Se puede pensar que en las medidas de elasticidad hay una contribución de la miel a través de puentes hidrógeno a la componente sólida del gel, que contrarrestaría, al menos en parte, el efecto de la miel de aumentar el carácter viscoso. Esta contribución por puentes hidrógeno no existiría en los geles en los que se determinó G' a 80 y 90°C.

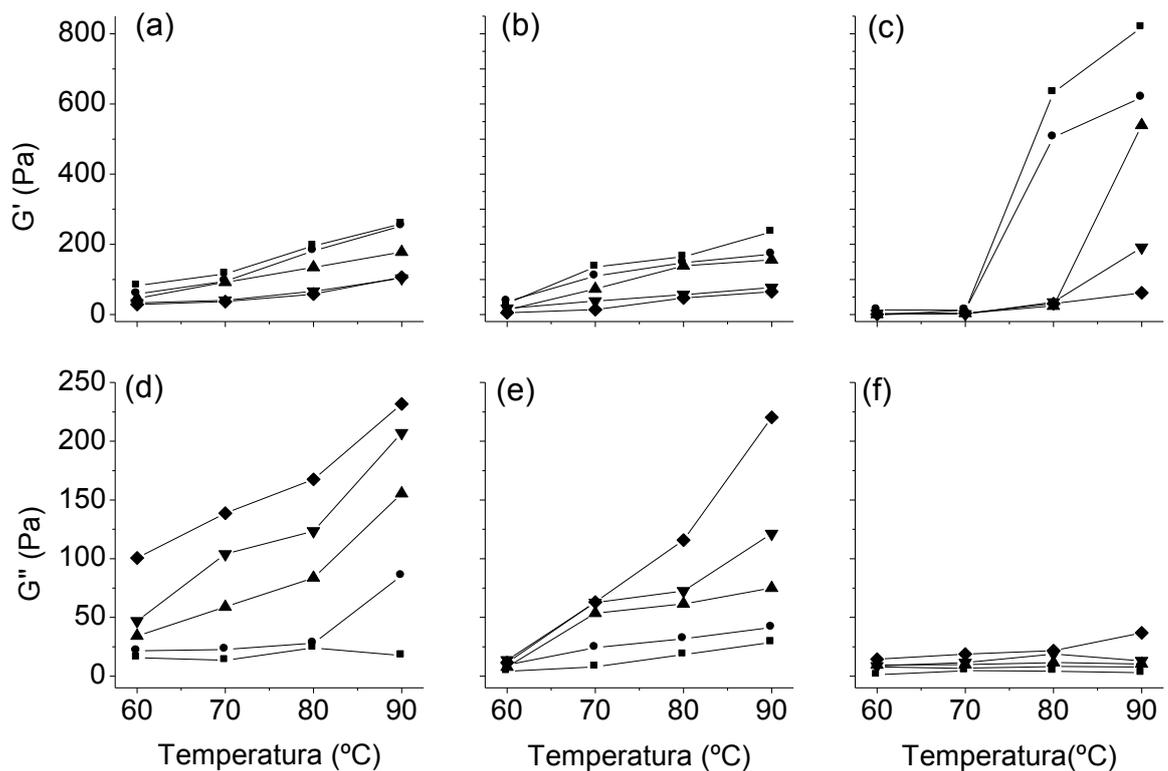


Figura 10.1. Módulos elástico y viscoso de geles de CPL en función de la temperatura. Contenido proteico de los geles: 10% p/p. (a y d) pH 3,75, (b y e) pH 4,2, (c y f) pH 7,0. Contenido de miel de los geles: (■) 0%; (●) 10%; (▲) 27,5%; (▼) 32,5%; (◆) 37,5% p/p.

Efecto de los barridos de frecuencia.

La figura 10.2 muestra el espectro mecánico (G' , G'' y η^* en función de la frecuencia de oscilación angular) de geles preparados a diferentes pHs y contenido de miel. Los resultados obtenidos muestran que G' fue mayor que G'' en todo el rango de frecuencias ensayadas, y que η^* disminuyó linealmente con la frecuencia

de oscilación; por lo tanto, y de acuerdo a los modelos de Giboreau y col. (1994) y Ross-Murphy (1995) todas las muestras se comportarían como materiales tipo gel. Resultados similares obtuvieron Dello Stafollo y col. (2004) en yogures adicionados con fibras, los cuales se comportaron como geles en todo el rango de frecuencias ensayadas. Dentro del rango de frecuencias de oscilación estudiadas, G' y G'' no variaron mucho en ninguna de las condiciones ensayadas, se observó solo un leve incremento en G' a medida que se incrementó la frecuencia de oscilación.

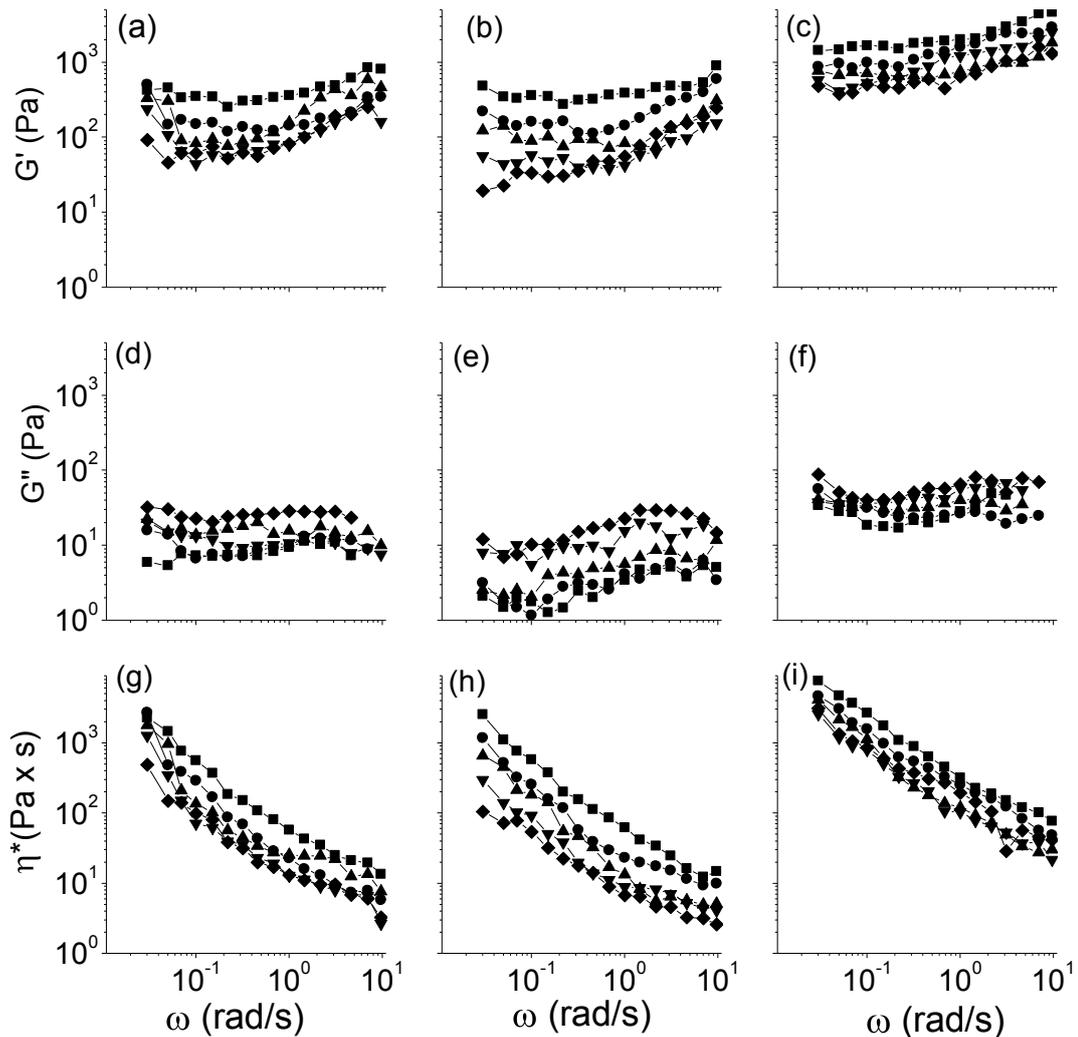


Figura 10.2. Módulo elástico, viscoso y viscosidad compleja de geles preparados a diferentes pHs y contenido de miel. Contenido proteico de los geles: 10% p/p. (a, d, g) pH 3,75; (b, e, h) pH 4,2; (c, f, i) pH 7,0. Contenido de miel de los geles: (■) 0%; (●) 10%; (▲) 27,5%; (▼) 32,5%; (◆) 37,5% p/p.

La tabla 10.1 muestra los valores de a y b calculados a cada pH y contenido de miel. Dichos valores se encontraron entre los correspondientes a un gel típico (5626 Pa \times s y 0,0371, para a y b , respectivamente) y una solución concentrada (16,26 Pa \times s y 0,84 para a y b respectivamente) (Steffe, 1996). Los resultados indican que cuanto más alta es la concentración de miel más bajo es el valor de a y más alto el de b . Este hecho sugiere, de acuerdo a este modelo, que la miel incrementa el comportamiento de tipo solución concentrada. Por otro lado, los geles neutros presentaron los valores de a más altos, indicando un comportamiento de tipo gel mayor que los geles ácidos, probablemente debido a la presencia de puentes disulfuro que, como se mencionó anteriormente, incrementan el comportamiento de tipo sólido.

pH	Miel (%)	a	b
3,75	0	465,25 \pm 30,30	0,08 \pm 0,03
	10	203,29 \pm 28,67	0,19 \pm 0,04
	27,5	236,32 \pm 33,89	0,18 \pm 0,10
	32,5	123,22 \pm 17,10	0,22 \pm 0,08
	37,5	100,96 \pm 16,36	0,35 \pm 0,09
4,2	0	443,56 \pm 28,63	0,14 \pm 0,04
	10	217,21 \pm 22,36	0,23 \pm 0,07
	27,5	124,49 \pm 13,81	0,34 \pm 0,06
	32,5	67,4 \pm 5,61	0,30 \pm 0,05
	37,5	70,40 \pm 3,35	0,54 \pm 0,03
7,0	0	2409,79 \pm 99,15	0,20 \pm 0,04
	10	1635,89 \pm 44,05	0,25 \pm 0,02
	27,5	1135,95 \pm 34,12	0,25 \pm 0,03
	32,5	847,83 \pm 59,05	0,28 \pm 0,03
	37,5	746,74 \pm 37,54	0,31 \pm 0,02

Tabla 10.1. Valores de a y b obtenidos por ajuste no lineal de la expresión $G' = a \omega^b$ donde G' es el módulo elástico y ω la frecuencia de oscilación.

La viscoelasticidad es representada, de acuerdo a Cooney y col. (1993), por la tangente del ángulo de defasaje ($\text{Tan } \phi = G'' / G'$) (figura 10.3). Valores de la Tan

ϕ mayores que 1 indican un predominio de las características viscosas, por el contrario, valores de $\text{Tan } \phi$ menores que 1 indican un predominio de las características elásticas. La miel incrementó el valor de la $\text{Tan } \phi$ en todas las condiciones ensayadas, indicando que este componente incrementa el comportamiento viscoso de los geles. Aquéllos geles con 0 y 10% de miel preparados a los tres pHs ensayados, y aquéllos con 27,5 y 32,5% de miel a pH 4,2 y 7,0 presentan valores de $\text{Tan } \phi$ por debajo de 1,0, revelando que en dichos geles predomina el comportamiento elástico. Por el contrario, los geles con el máximo contenido de miel presentaron valores de $\text{Tan } \phi$ mayores que 1,0 indicando, este resultado, que las características viscosas predominan en dichas muestras. Los geles ácidos presentaron valores de $\text{Tan } \phi$ mayores que los geles de pH 7,0; manifestando las características viscosas de los geles ácidos. Estos resultados están de acuerdo con los mostrados en el capítulo 9, donde se observó que el tiempo de relajación de los geles ácidos fue menor que el tiempo de relajación de los geles neutros, indicando un mayor comportamiento viscoso en los primeros.

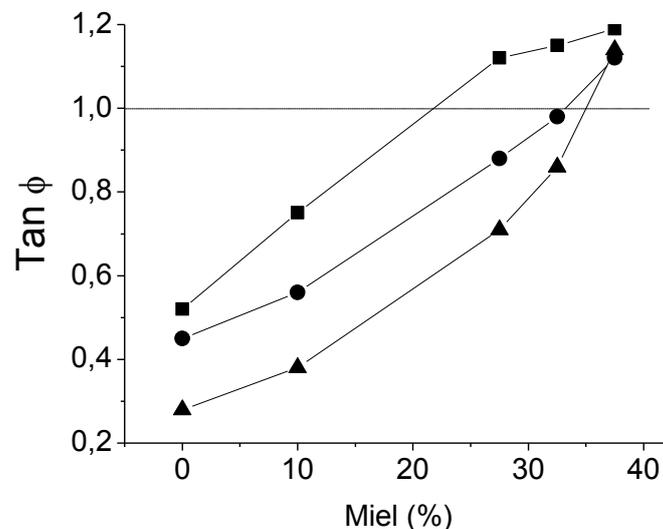


Figura 10.3. Tangente del ángulo de defasaje en función de la concentración de miel calculada a $\omega = 1$ rad/seg. Contenido proteico de los geles: 10% p/p. pH de los geles: (■) 3,75; (●) 4,2; (▲) 7,0.

Efecto de los barridos de tiempo.

La figura 10.4 muestra la variación de G' en función del tiempo. Dicho perfil fue similar al de G^* , por lo que la cinética de viscoelasticidad puede ser

representada solamente en términos del módulo elástico G' , el cual se incrementa con el tiempo. Resultados similares obtuvieron Verheul y col. (1998) con aislados de proteínas de lactosuero, Puppo y col. (1998) con geles de proteínas de soja y Nishinari y col. (1991) con geles de tofu. Estos perfiles de G' , característicos de la gelificación de proteínas nativas globulares, han sido también descriptos por Van Kleef y col. (1978).

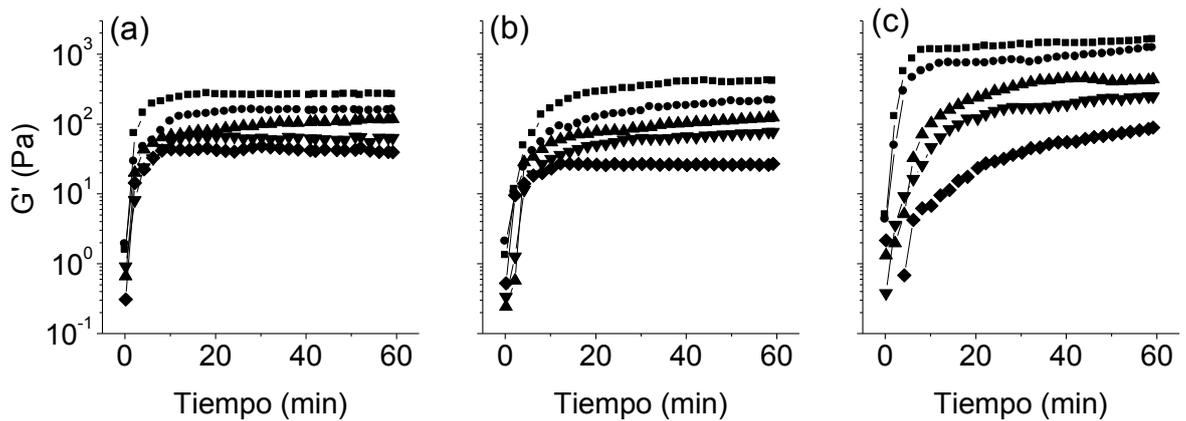


Figura 10.4. Variación de G' en función del tiempo. Contenido proteico de los geles: 10% p/p. (a) pH 3,75; (b) pH 4,2; (c) pH 7,0. Contenido de miel de los geles: (■) 0%; (●) 10%; (▲) 27,5%; (▼) 32,5%; (◆) 37,5% p/p. Temperatura a la que se realizó la medida: 87°C.

La mayoría de los geles ácidos alcanzaron el máximo valor de G' antes de los 15 minutos; sin embargo, en geles neutros, el valor máximo fue alcanzado más lentamente a medida que aumentaba la concentración de miel, indicando que la miel retrasa el proceso de gelificación. Este hecho puede ser confirmado analizando los resultados mostrados en la tabla 10.2, donde se observa que la miel modificó levemente el “gel time” (t^*) de los geles ácidos, pero lo incrementó apreciablemente en geles de pH 7,0 probablemente por interferencia en la formación de puentes disulfuro. Estos resultados confirman lo discutido en secciones anteriores, donde se sugirió que la miel interfiere en la formación de la red del gel. El t^* representa el instante en que una solución se vuelve un sólido viscoelástico o, en el modelo de gelificación de la polimerización, es el instante de tiempo en que se forma una red infinita (Aguilera, 1995).

pH	Miel (%)	t* (min).
3,75	0	0,29
	10	0,78
	27,5	1,46
	32,5	1,18
	37,5	1,10
4,2	0	0,58
	10	1,53
	27,5	2,71
	32,5	2,44
	37,5	1,83
7,0	0	0,17
	10	0,89
	27,5	10,39
	32,5	8,87
	37,5	12,2

Tabla 10.2. "gel time" de geles de CPL vs. contenido de miel ($LSD_{0,05} = 0.43$).

El tratamiento térmico favorecería dos tipos de fenómenos opuestos: a) ruptura de los puentes hidrógeno y disminución de las interacciones electrostáticas, debilitando de este modo las interacciones intermoleculares; y b) estabilización de las interacciones hidrofóbicas, lo que favorece la asociación molecular para dar una estructura tridimensional. Además, favorece el intercambio sulfhidrilo-disulfuro. El valor de G' resulta del balance de estos dos fenómenos; si predomina el primero de ellos el módulo elástico será pequeño, en cambio si domina el segundo G' alcanzará valores elevados (Chronakis, 1996). Basándose en estos hechos, se deduce que el tratamiento térmico de dispersiones de CPL, tanto a pH ácido como a pH neutro incrementa las interacciones hidrofóbicas entre moléculas de proteínas (figura 10.4). Esto corrobora lo discutido en la sección 10.2.1, donde se sugirió que el hecho de que la temperatura no aumentara el comportamiento viscoso en los geles sin miel se debía a la formación de uniones hidrofóbicas, favorecidas con la temperatura, además de la formación de puentes disulfuro en los geles neutros.

La figura 10.5 muestra la variación de la constante de gelificación (k) con el contenido de miel a los tres pHs ensayados. La miel no modificó significativamente

los valores de k de los geles preparados a pH 4,2, en los cuales la velocidad del proceso de gelificación fue similar en todas las concentraciones de miel. Por otro lado, la miel disminuyó los valores de k de los geles de pH 7,0 y pH 3,75, siendo este efecto más importante en los geles neutros. Estos resultados sugieren que la miel retrasa la velocidad del proceso de gelificación principalmente en geles de pH 7,0. Probablemente, como se mencionó anteriormente, la miel interfiera con el establecimiento de los puentes disulfuro que están involucrados en el proceso de formación de geles neutros.

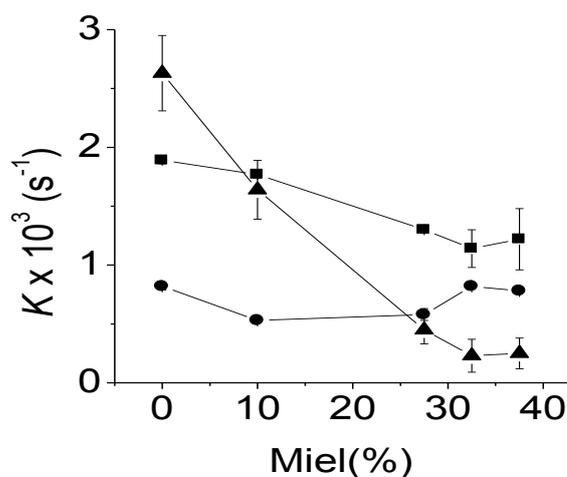


Figura 10.5. Constante de gelificación (k) versus concentración de miel. Contenido proteico de los geles: 10% p/p. pH de los geles: (■) 3,75; (●) 4,2; (▲)7,0. (LSD_{0,05} = 0,38).

10.2.2. Geles con miel y harina de trigo.

Efecto de la temperatura de gelificación.

La figura 10.6 muestra la variación de G' con la temperatura ($\omega = 1$ rad/seg). Al igual que en los geles que sólo contienen miel, a 60°C el módulo elástico no se modificó significativamente en ninguna de las condiciones ensayadas. Sin embargo, a temperaturas mayores o iguales a 70°C, y en coincidencia con la temperatura de desnaturalización de la β lactoglobulina, G' aumentó en muchos de los casos. Diversos estudios donde se utilizó HPLC en fase reversa sugieren que el desplegado de las proteínas del suero por el calor comienza a 40°C y continúa

lentamente hasta alcanzar un 10% de desnaturalización a 62°C y un 95% a 85°C (Parris y col., 1991). Esto explicaría el comportamiento de G' con la temperatura; sólo más allá de los 70°C las proteínas del suero, y especialmente la β -lactoglobulina (la cual es la proteína de gelificación primaria), se desnaturaliza lo suficiente para formar el gel y de esta manera incrementar el valor de G' . Sin embargo, no sólo el proceso de gelificación contribuye al valor final de G' , también hay que considerar la contribución de la gelatinización del almidón y la presencia de las proteínas de almacenamiento de la harina de trigo que forman el gluten, que son los responsables del pronunciado aumento de G' en las dispersiones con harina de trigo a todos los pHs ensayados. Es importante señalar que el agregado de harina incrementa diez veces los valores de G' de los geles, como se observa al comparar la fig. 10.6 con la fig. 10.1.

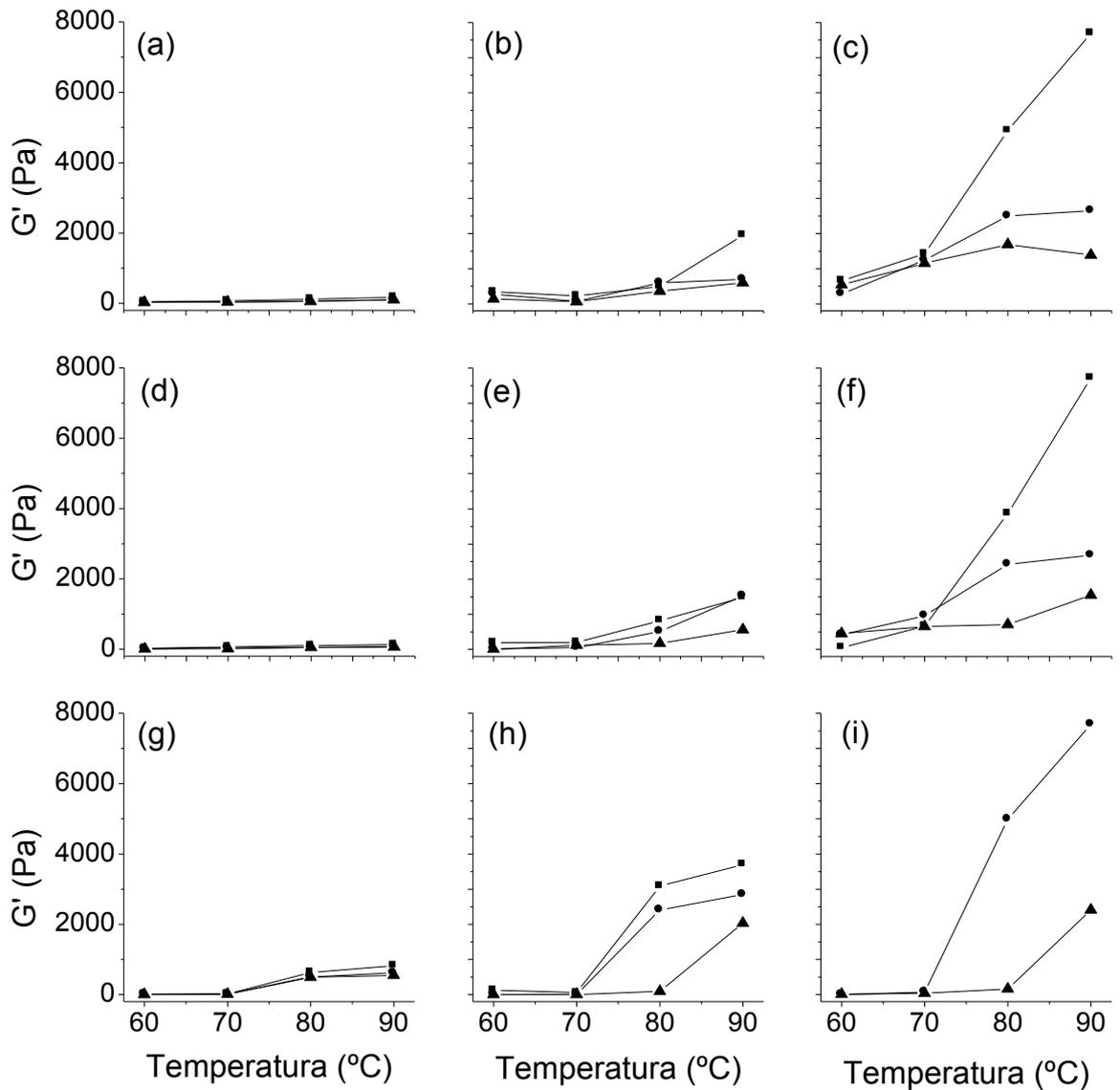


Figura 10.6. Módulo elástico de geles de CPL en función de la temperatura. Contenido de proteínas de suero de los geles: 10% p/p. pH de los geles: (a, b, c), 3,75; (d, e, f), 4,2; (g, h, i), 7,0. (a, d, g) 0% harina de trigo; (b, e, h) 10% harina de trigo; (c, f, i) 20% harina de trigo. Contenido de miel: (■), 0%; (●), 10%; (▲), 20%. Los valores de G' correspondientes a los geles de pH 7,0, 20% de harina de trigo y 0% de miel no se pudieron determinar debido a que por su dureza caen fuera del rango de medida del equipo.

La disponibilidad de agua es uno de los principales factores que retrasan la gelatinización del almidón. De aquí que, si hay un componente como la miel que tiene la capacidad de ligar agua fuertemente, la gelatinización del almidón se retrasará u ocurrirá de manera limitada. En la figura 10.6 se observa que a medida que el contenido de miel aumenta G' disminuye. Esto es un resultado esperado debido a que la miel limita la cantidad de agua disponible para la gelatinización; sin embargo, hay que tener en cuenta que éste no es el único factor que disminuye los valores de G' ; las propiedades viscosas propias de la miel y el efecto protector que tiene este componente sobre la desnaturalización térmica de las proteínas (capítulo 3) también influyen negativamente sobre el valor del módulo elástico.

La figura 10.7 muestra el efecto de la temperatura sobre el valor de G'' ($\omega = 1$ rad/seg). Como en el caso de los geles que sólo contienen miel, G'' aumentó en todas las condiciones ensayadas en presencia de este componente. La harina de trigo, por otra parte, modificó solo levemente el componente viscoso de los geles, observando en algunos casos un ligero aumento de éste en los geles con harina de trigo. Se concluye de estos resultados que la harina de trigo influye fundamentalmente en el valor de G' de los geles.

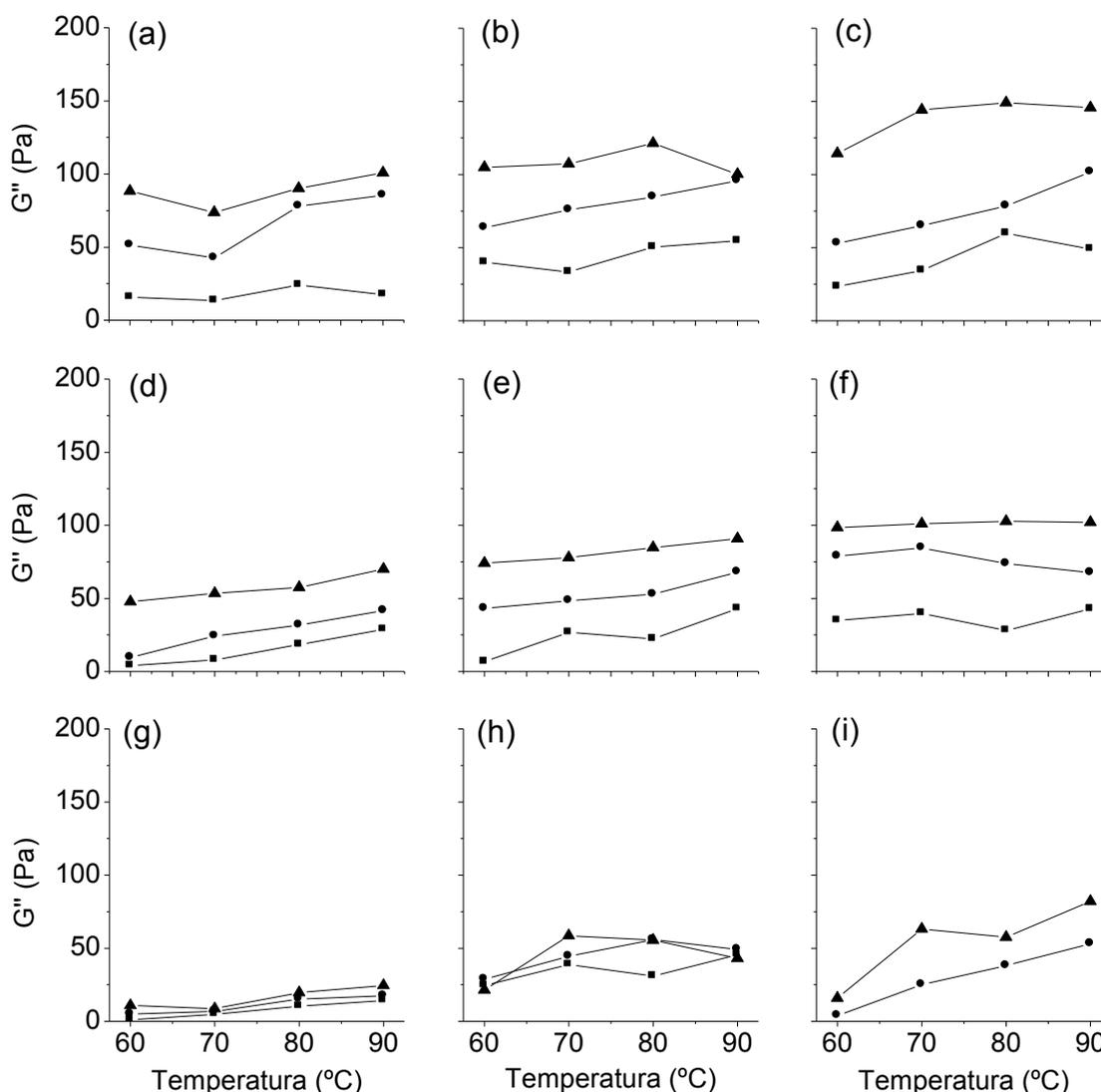


Figura 10.7. Módulo viscoso de geles de CPL en función de la temperatura. Contenido de proteínas de suero de los geles: 10% p/p. pH de los geles: (a, b, c), 3,75; (d, e, f), 4,2; (g, h, i), 7,0. Contenido de harina de trigo: (a, d, g) 0%; (b, e, h) 10%; (c, f, i) 20%. Contenido de miel: (■), 0%; (●), 10%; (▲), 20%. Los valores de G'' correspondientes a los geles de pH 7,0, 20% de harina de trigo y 0% de miel no se pudieron determinar debido a que por su dureza caen fuera del rango de medida del equipo.

Efecto de los barridos de frecuencia.

Las figuras 10.8, 10.9 y 10.10 muestran el espectro mecánico (G' , G'' y η^* en función de la frecuencia de oscilación angular) de geles preparados a diferentes

pHs, contenido de miel y contenido de harina de trigo. Dentro del rango de frecuencias de oscilación estudiadas no se producen cambios importantes en el módulo elástico (figura 10.8). Se observó un leve aumento de este parámetro a medida que aumenta la concentración de harina de trigo, y en geles neutros respecto a geles ácidos sin harina de trigo, esto último ya se había observado anteriormente. La miel, al igual que en los casos anteriores, disminuyó G' .

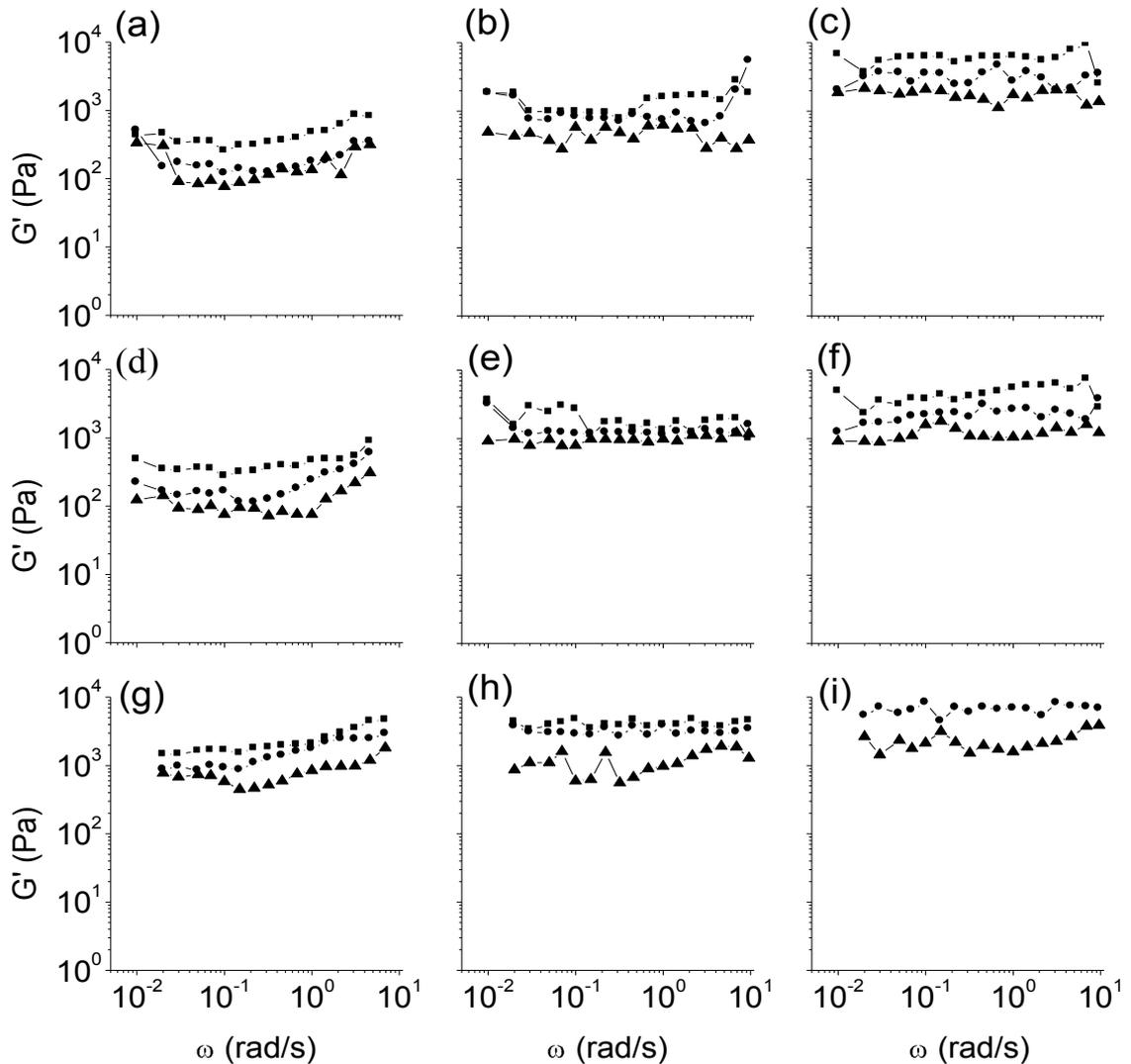


Figura 10.8. Módulo elástico de geles de CPL en función de la frecuencia de oscilación angular. Contenido de proteínas de suero de los geles: 10% p/p. pH de los geles: (a, b, c), 3,75; (d, e, f), 4,2; (g, h, i), 7,0. Contenido de harina de trigo (a, d, g) 0%; (b, e, h) 10%; (c, f, i) 20%. Contenido de miel: (■), 0%; (●), 10%; (▲), 20%. Los valores de G' correspondientes a los geles de pH 7,0, 20% de harina de trigo y 0% de miel no se pudieron determinar debido a que por su dureza caen fuera del rango de medida del equipo.

El módulo viscoso no presentó variaciones apreciables en todo el rango de frecuencias de oscilación ensayadas (figura 10.9) como tampoco a las distintas concentraciones de harina de trigo ensayadas.

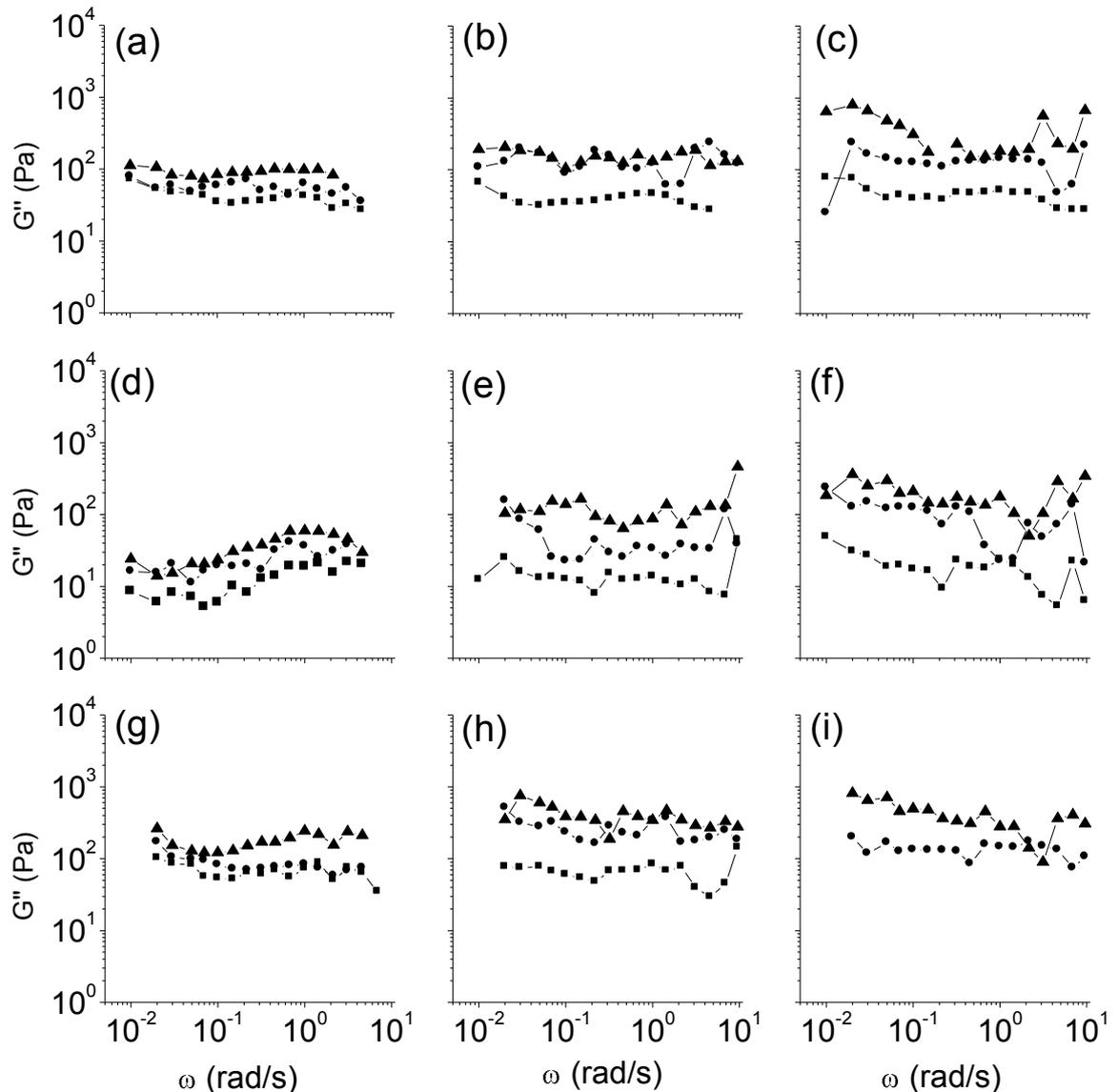


Figura 10.9. Módulo viscoso de geles de CPL en función de la frecuencia de oscilación angular. Contenido de proteínas de suero de los geles: 10% p/p. pH de los geles: (a, b, c), 3,75; (d, e, f), 4,2; (g, h, i), 7,0. Contenido de harina de trigo: (a, d, g) 0%; (b, e, h) 10%; (c, f, i) 20%. Contenido de miel: (■), 0%; (●), 10%; (▲), 20%. Los valores de G'' correspondientes a los geles de pH 7,0, 20% de harina de trigo y 0% de miel no se pudieron determinar debido a que por su dureza caen fuera del rango de medida del equipo.

Si se comparan los resultados de las dos figuras anteriores se puede observar que, excepto en algunos geles con alto contenido de miel donde G' es similar a G'' , G' es mayor que G'' en todo el rango de frecuencias de oscilación y condiciones ensayadas por lo que, de acuerdo al modelo de Giboreau y col. (1994) estas muestras se comportarían, desde el punto de vista reológico, como materiales tipo gel. Estos geles reflejan la existencia de una matriz tridimensional estable a altas frecuencias de oscilación (Clark y col., 1987; Giboreau y col., 1994).

La viscosidad compleja es una medida de la magnitud de la resistencia total de la muestra al esfuerzo de corte dinámico. La figura 10.10 muestra cómo dicho parámetro decrece linealmente con el aumento de la frecuencia de oscilación en todas las condiciones ensayadas.

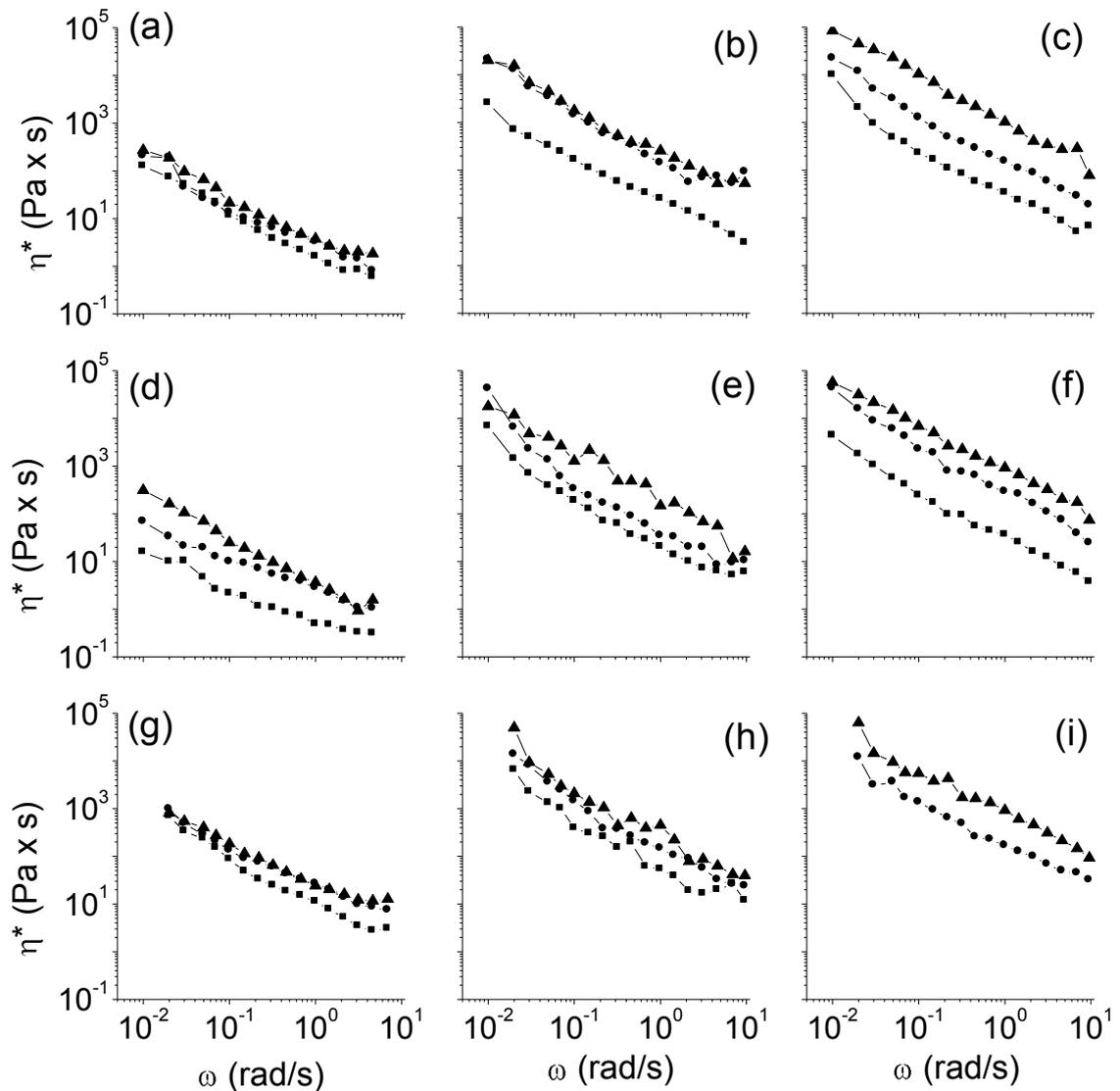


Figura 10.10. Viscosidad compleja de geles de CPL en función de la frecuencia de oscilación angular. Contenido de proteínas de suero de los geles: 10% p/p. pH de los geles: (a, b, c), 3,75; (d, e, f), 4,2; (g, h, i), 7,0. Contenido de harina de trigo: (a, d, g) 0%; (b, e, h) 10%; (c, f, i) 20%. Contenido de miel: (■), 0%; (●), 10%; (▲), 20%. Los valores de η^* correspondientes a los geles de pH 7,0, 20% de harina de trigo y 0% de miel no se pudieron determinar debido a que por su dureza caen fuera del rango de medida del equipo.

La tabla 10.2 muestra los valores de a y b calculados a cada pH, contenido de miel y contenido de harina de trigo. Dichos valores se encontraron entre un gel típico (5626 Pa·s y 0,0371, para a y b , respectivamente) y una solución concentrada (16,26 Pa·s y 0,84 para a y b , respectivamente) (Steffe, 1996). Al igual

que en los geles que sólo contienen miel se encontró que este componente disminuye los valores de *a* e incrementa los valores de *b*, sugiriendo de acuerdo a este modelo, que la miel incrementa el comportamiento de tipo solución. Como era de esperar, con la harina de trigo se observa el efecto opuesto, indicando nuevamente que este componente incrementa el comportamiento de tipo gel.

pH	Harina de trigo	Miel (%)	<i>a</i>	<i>b</i>
3,75	0	0	468,88 ± 9,68	0,28 ± 0,02
		10	178,25 ± 11,96	0,45 ± 0,06
		20	159,95 ± 13,74	0,39 ± 0,08
	10	0	1519,85 ± 25,60	0,14 ± 0,01
		10	1345,73 ± 18,34	0,21 ± 0,05
		20	997,29 ± 37,21	0,30 ± 0,01
	20	0	5592,08 ± 42,63	0,04 ± 0,02
		10	3244,51 ± 42,72	0,10 ± 0,07
		20	1815,95 ± 19,54	0,22 ± 0,02
4,2	0	0	494,57 ± 33,37	0,14 ± 0,04
		10	282,26 ± 22,73	0,23 ± 0,07
		20	148,70 ± 15,03	0,35 ± 0,06
	10	0	1667,86 ± 57,41	0,04 ± 0,01
		10	1238,96 ± 20,26	0,11 ± 0,04
		20	1009,67 ± 22,69	0,12 ± 0,03
	20	0	5277,18 ± 35,31	0,04 ± 0,01
		10	2611,48 ± 81,84	0,06 ± 0,02
		20	1111,5 ± 17,03	0,13 ± 0,03
7,0	0	0	2653,38 ± 99,32	0,25 ± 0,02
		10	1799,96 ± 44,35	0,27 ± 0,01
		20	794,32 ± 24,92	0,29 ± 0,03
	10	0	5605,74 ± 84,23	0,09 ± 0,03
		10	2259,89 ± 37,50	0,13 ± 0,02
		20	1262,55 ± 88,88	0,17 ± 0,04
	20	10	5693,07 ± 72,69	0,05 ± 0,01
		20	2247,07 ± 48,58	0,17 ± 0,04

Tabla 10.2. Valores de a y b obtenidos por ajuste de la expresión $G' = a \omega^b$ donde G' es el módulo elástico y ω la frecuencia de oscilación. Los valores de a y b correspondientes a los geles de pH 7,0, 20% de harina de trigo y 0% de miel no se pudieron determinar debido a que por su dureza caen fuera del rango de medida del equipo.

De acuerdo a Letang y col. (1999) la tangente del ángulo de defasaje ($\text{Tan } \phi = G''/G'$) puede ser considerada como un indicador de la organización estructural (interacciones intermoleculares) en un material; materiales altamente estructurados producen, generalmente, valores bajos de $\text{Tan } \phi$ a medida que G' predomina sobre G'' . Los resultados de la figura 10.11 muestran que tanto la miel como la harina de trigo modifican los valores de $\text{Tan } \phi$, la miel los aumenta y la harina de trigo los disminuye. La harina de trigo promovería la organización estructural a través del almidón y de las proteínas que forman el gluten. En todas las condiciones ensayadas, los geles neutros presentaron valores de $\text{Tan } \phi$ menores que 1, indicando que el comportamiento del gel es primariamente elástico. Este comportamiento está determinado por la presencia de puentes disulfuro, almidón gelatinizado y proteínas de almacenamiento de la harina de trigo capaces de formar gluten. Por el contrario, algunos geles ácidos, especialmente aquéllos con la más alta concentración de miel y la más baja de harina de trigo, tienen valores de $\text{Tan } \phi$ mayores que 1, indicando que predomina el comportamiento viscoso.

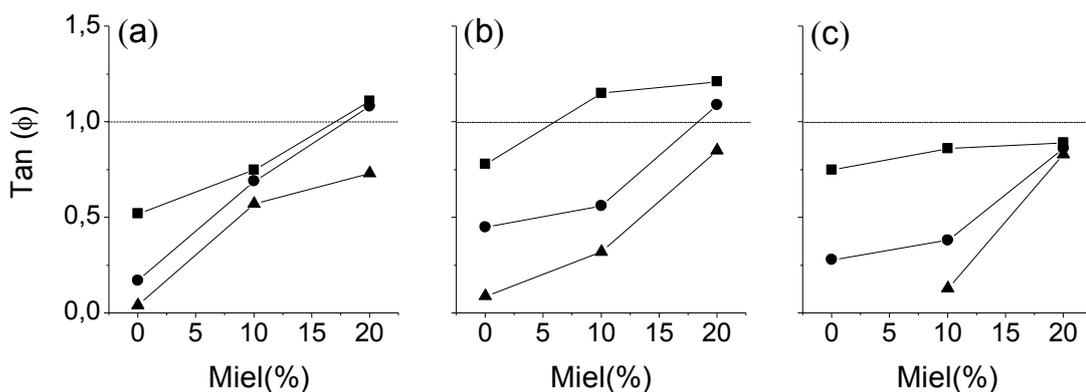


Figura 10.11. Tangente del ángulo de defasaje en función de la concentración de miel calculada a $\omega = 1$ rad/seg. Contenido de proteínas de suero de los geles: 10% p/p. pH de los geles: (a) 3,75; (b) 4,2; (c) 7,0. Contenido de harina de trigo: (■), 0%; (●), 10%; (▲), 20%. Los valores de la $\text{Tan } \phi$ correspondientes a los geles de pH

7,0, 20% de harina de trigo y 0% de miel no se pudieron determinar debido a que por su dureza caen fuera del rango de medida del equipo.

Efecto de los barridos de tiempo.

La figura 10.12 muestra la variación de G' en función del tiempo. Al igual que en el caso de los geles que sólo contienen miel, dicho perfil es similar al de G^* , por lo que la cinética de formación del gel puede ser representada solamente en términos del módulo elástico. Se observa igualmente que G' se incrementa con el tiempo. El incremento del contenido de harina de trigo aumentó los valores de G' . La miel, por el contrario contrarrestó el efecto mencionado, observándose que cuando el contenido de este componente aumenta, el valor final de G' disminuye.

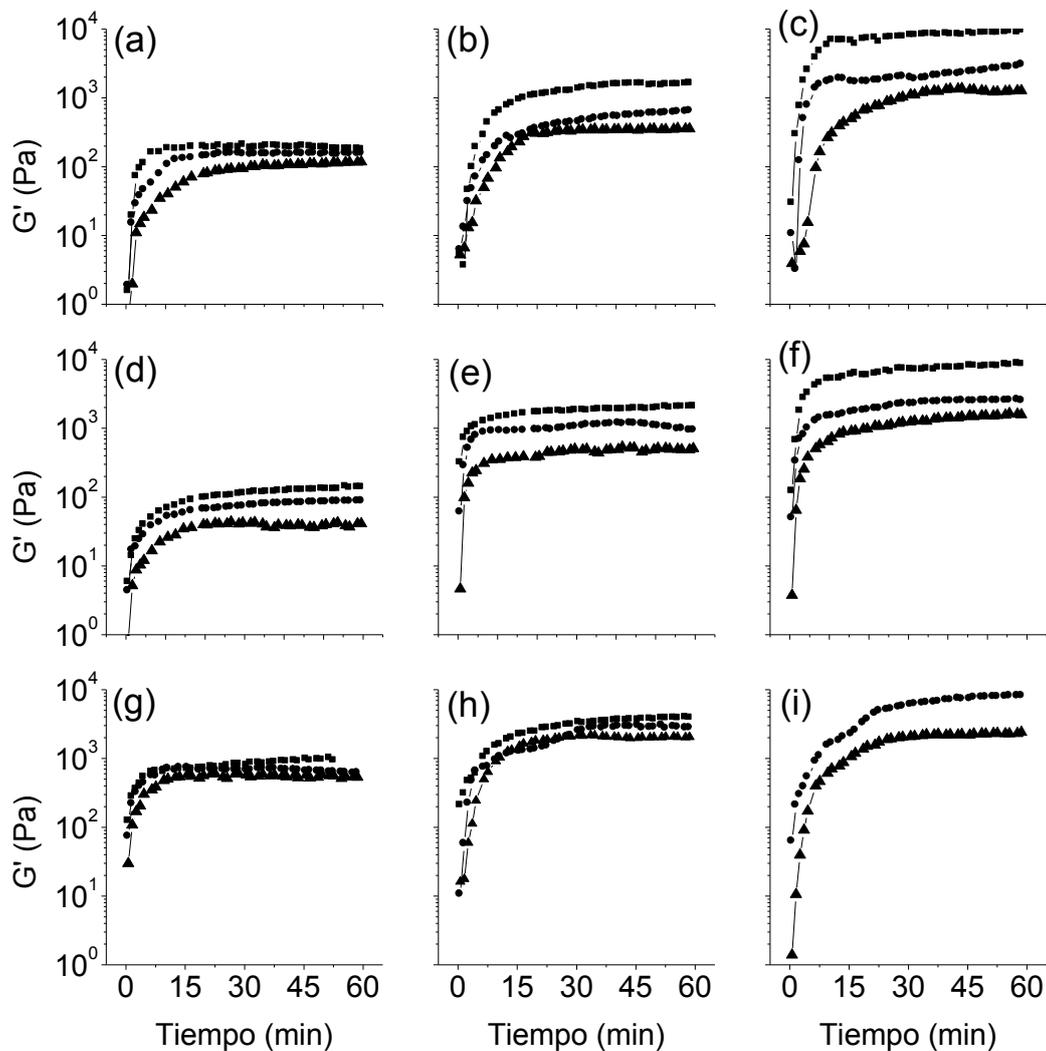


Figura 10.12. Variación de G' en función del tiempo. Contenido de proteínas de suero de los geles: 10% p/p. pH de los geles: (a, b, c), 3,75; (d, e, f), 4,2; (g, h, i), 7,0. Contenido de harina de trigo: (a, d, g) 0%; (b, e, h) 10%; (c, f, i) 20%. Contenido de miel: (■), 0%; (●), 10%; (▲), 20%. Los valores de G' correspondientes a los geles de pH 7,0, 20% de harina de trigo y 0% de miel no se pudieron determinar debido a que por su dureza caen fuera del rango de medida del equipo.

De los resultados mostrados en la figura 10.4 se concluyó que la miel retrasa el proceso de gelificación especialmente en geles de pH 7,0. Sin embargo, esto no se observa en presencia de harina de trigo (figura 10.12) la cual probablemente enmascare el efecto de la miel. Esto puede confirmarse analizando los resultados mostrados en la tabla 10.3, donde ni la miel ni la harina de trigo modificaron apreciablemente el “gel time” (t^*) de los geles ácidos. En los geles de pH 7,0 con 0% de harina de trigo, la miel incrementó el “gel time”; como se había observado anteriormente; sin embargo, en presencia de 10 y 20% de harina de trigo no se produjo ninguna variación de este parámetro confirmando de esta manera que la harina de trigo enmascara el efecto de la miel. La harina de trigo sola, por otra parte, no produjo ninguna tendencia en el “gel time”, como puede verse por los valores correspondientes a los geles sin miel de la tabla 10.3.

pH	Harina de trigo	Miel (%)	t^* (min)
3,75	0	0	0,29
		10	0,59
		20	1,18
	10	0	0,39
		10	0,81
		20	0,54
	20	0	0,31
		10	0,55
		20	0,87
4,2	0	0	0,18
		10	1,53
		20	2,24
	10	0	0,42
		10	1,02

		20	0,90
	20	0	0,70
		10	0,56
		20	0,47
7,0	0	0	1,92
		10	5,47
		20	7,41
	10	0	0,67
		10	1,52
		20	2,45
	20	0	1,09
		10	0,81
		20	3,09

Tabla 10.3. "gel time" de geles de CPL en función del contenido de miel y harina de trigo ($LSD_{0,05} = 0,39$).

10.3. Conclusiones.

De los resultados arriba descritos se puede concluir que la miel y la harina de trigo modifican el comportamiento reológico de los geles de CPL. Ambos componentes tienen efectos opuestos; la miel incrementa el comportamiento viscoso y la harina de trigo el comportamiento de tipo sólido en todas las condiciones ensayadas.

La miel retrasa el proceso de gelificación en geles de pH 7,0, interfiriendo probablemente en las reacciones de intercambio sulfhidrilo/disulfuro, lo que hace que sean necesarios tiempos más largos de tratamiento térmico para obtener geles neutros a medida que el contenido de miel se incrementa.

Como determinante del comportamiento de tipo sólido medido a la temperatura de gelificación se encuentra que en los geles con harina de trigo, el almidón gelatinizado y las proteínas de almacenamiento de la harina capaces de formar gluten juegan un rol muy importante, tanto a pH ácido como neutro. En relación a las proteínas de lactosuero, contribuyen al comportamiento de tipo sólido las uniones hidrofóbicas, y en los geles de pH 7,0, también los puentes disulfuro.

Cuando los geles se enfrían a temperatura ambiente, contribuyen también otras uniones no covalentes, como los puentes hidrógeno.

De acuerdo a los modelos de Giboreau y col. y Ross-Murphy tanto los geles ácidos como los geles neutros se comportan como materiales de tipo gel o geles fuertes respectivamente.

11. Evaluación sensorial de los geles.

11.1 Introducción.

En el mundo de hoy los cambios se suceden de manera acelerada y es importante que los productores de bienes y servicios estén constantemente a la escucha de sus consumidores / clientes. En el ámbito de los alimentos esto se refleja de manera muy directa, y el análisis cuantitativo y cualitativo de esta evolución se torna clave para el éxito de las empresas. En este contexto la evaluación sensorial presenta una herramienta muy importante para la gestión, tanto del desarrollo y la producción como de la comercialización de los productos alimenticios.

Nuestro primer acercamiento al mundo es a través de los sentidos. Hay experiencias que indican que ya en el útero materno estamos comunicados con el exterior por los sonidos que percibimos; posteriormente nuestros primeros contactos son a través del tacto, gusto y olor, sumándose a todos ellos los estímulos visuales y auditivos. Toda nuestra vida la pasamos analizando sensorialmente aquello que nos rodea: la elección de una tela por su textura y/o color, de un perfume por su fragancia, de una comida por su aspecto, olor, colores. Entramos en la casa de nuestros abuelos y al traspasar el umbral de la puerta nos recibe ese aroma único mezcla del jazmín que tienen junto a la ventana, con la sopa de verdura que hace la abuela, con el aserrín del taller del abuelo, y nos produce esa alegría interior de estar en un lugar amigo, nos retrotrae a nuestra infancia, nos invade de recuerdos. Asimismo, quién no reconoce el olor a “dentista” o a “hospital” y se tensa un poco al percibirlo. Es decir, tenemos “memoria sensorial”, que generalmente va asociada a sentimientos. Nos alejamos de los recipientes de residuos cuando nos llega su olor nauseabundo por el desagrado que nos provoca, es decir “reaccionamos” ante esta agresión. Podemos diferenciar distintas intensidades y distinguir en un bosque los distintos tonos de verde y en un alimento saber si está más o menos salado que lo acostumbrado, y así podríamos continuar y armar una larga lista de experiencias sensoriales. Todas estas percepciones pueden ser reconocidas, evaluadas y medidas mediante un test de evaluación sensorial (Yaennes, 2002).

El objetivo de este capítulo es analizar las opiniones de los potenciales consumidores sobre la aceptación de los geles de CPL y una tarta de limón, cuyo

relleno fue preparado con uno de los geles de lactosuero acidificado con jugo de limón.

11.2 Resultados y discusión.

La figura 11.1 muestra cómo se modifican los atributos sensoriales considerados en función de la concentración de miel. Se encontró que un aumento en la concentración de miel mejora, a todos los pHs ensayados, la opinión de los panelistas sobre los distintos atributos sensoriales. Asimismo, se prefirieron en todos los casos los geles neutros por sobre los geles ácidos.

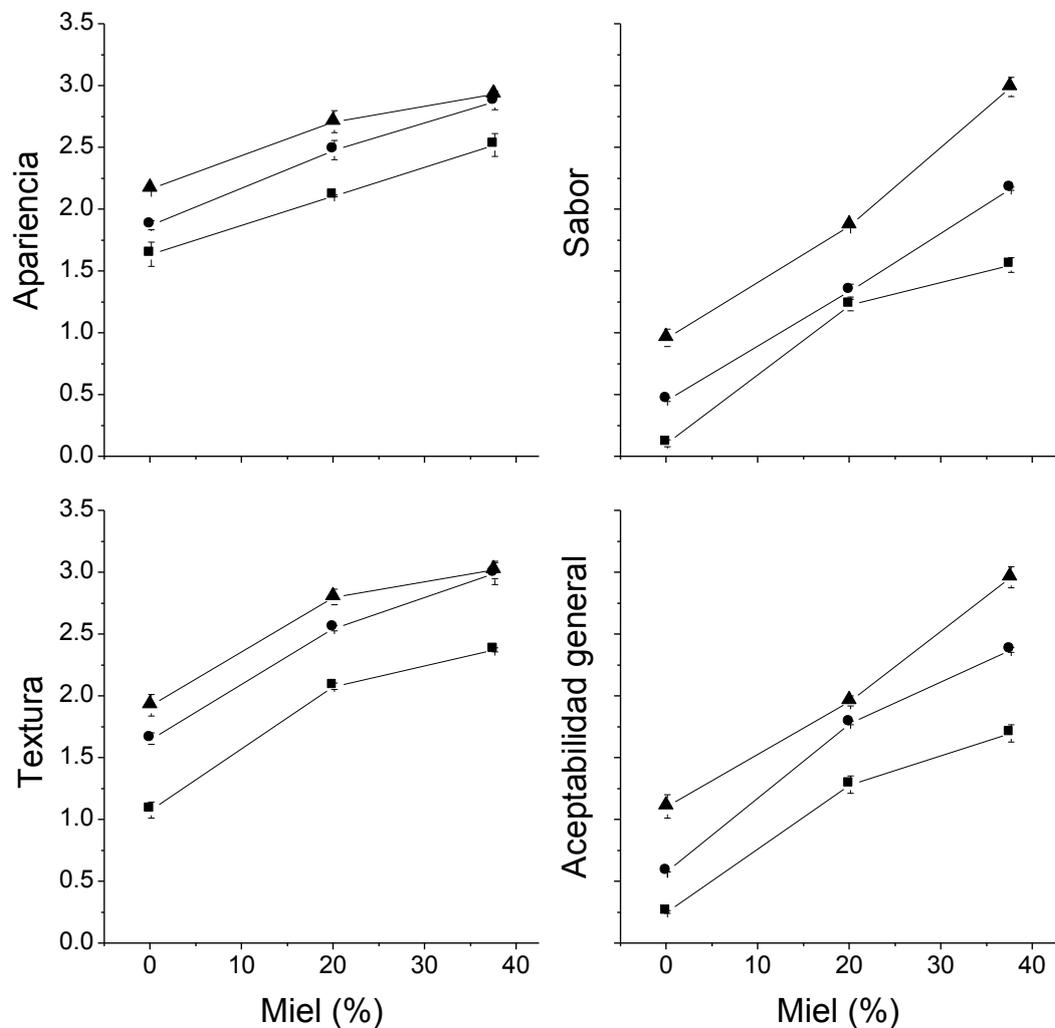


Figura 11.1. Variación de los atributos sensoriales considerados, en función de la concentración de miel. Contenido proteico de los geles: 10% p/p. pH de los geles: (■) 3,75; (●) 4,2; (▲) 7,0. Las barras muestran la desviación estándar.

La figura 11.2 muestra una foto de los geles evaluados por los panelistas.

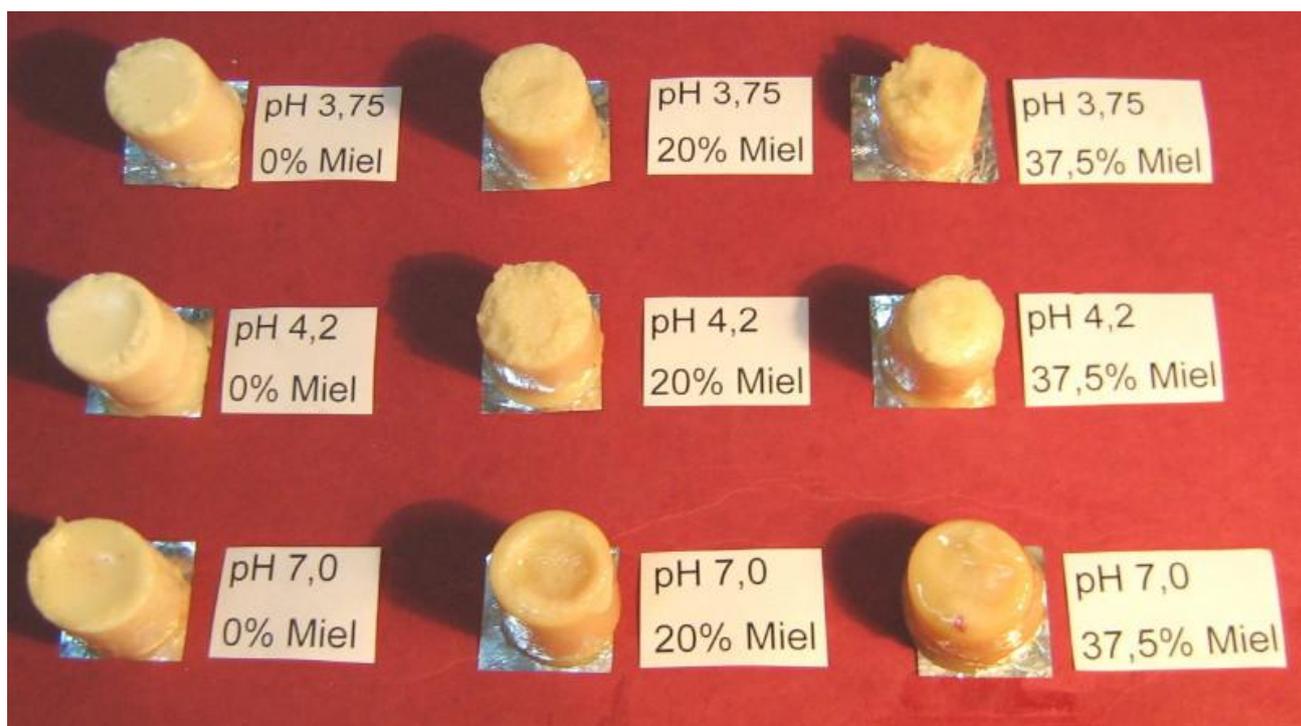


Figura 11.2. Geles de CPL preparados a diferentes pHs y concentraciones de miel.

En la figura 11.3 se observan los resultados de las opiniones de los panelistas sobre la tarta de limón. Se observa que la opinión sobre la apariencia se repartió en proporciones similares entre aceptable, bueno y muy bueno. Sin embargo, cuando se analizan los resultados para el sabor aparece un porcentaje de evaluadores que lo consideran pobre, de todos modos un 73% lo consideró entre aceptable y bueno y un 15% muy bueno. Casi la mitad de los panelistas consideró a la textura como buena, repartiéndose el resto de las opiniones entre aceptable y muy buena casi por partes iguales. La aceptabilidad general intenta englobar en un solo parámetro la conclusión final de cada panelista sobre todos los otros atributos. Para esto se encontró que el 50% de los evaluadores considera a la tarta de limón como buena y un 15% como muy buena manifestando de este modo la aceptación global del producto por parte de más de la mitad de los encuestados.

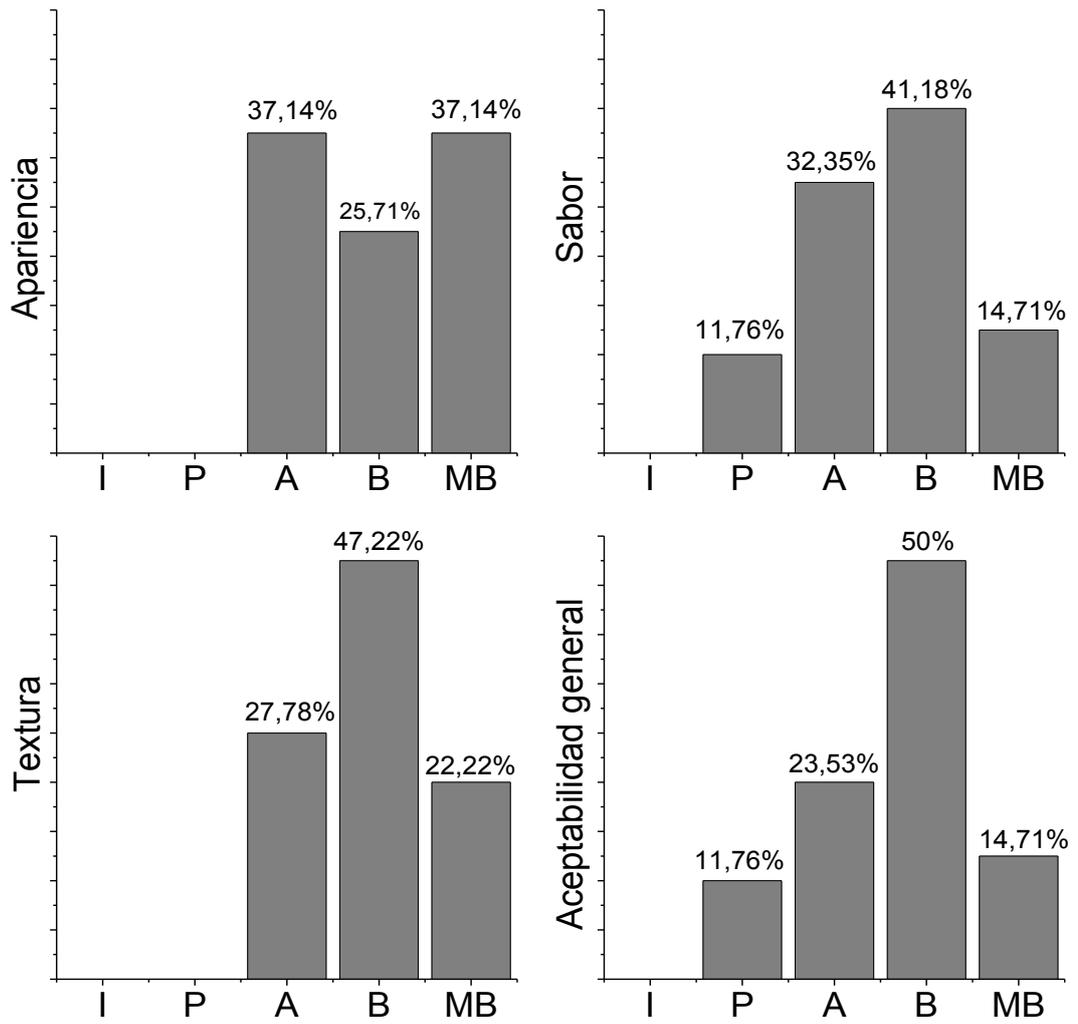


Figura 11.3. Resultados de las opiniones de los panelistas sobre la tarta de limón. I: inaceptable, P: pobre, A: aceptable, B: bueno, MB: muy bueno.

La figura 11.4 muestra una foto de la tarta de limón evaluada por los panelistas.



11.3 Conclusiones.

De los resultados mostrados se desprende que la miel mejoró la apariencia, sabor, textura y aceptabilidad general de los geles a todos los pHs ensayados. Por otro lado, los geles de pH neutro fueron los más aceptados, si bien no se observaron diferencias significativas entre los geles de pH neutro y de pH 4,2 en la apariencia y textura a la máxima concentración de miel. Este hecho pone de manifiesto que la miel igualaría la aceptación de estos parámetros entre el gel de pH 4,2 y el gel neutro.

En relación a la tarta de limón, su sabor, textura y aceptabilidad general fueron consideradas como buenas por aproximadamente la mitad de los evaluadores. La tarta de limón se tomó como ejemplo de la utilización de estos geles en la formulación de postres.

12. Evaluación nutricional de los geles.

12.1. Introducción.

La necesidad de hacer frente al ritmo de vida en grandes ciudades hizo que la manera en que nos alimentamos cambie más en 50 años que en siglos de historia. En la actualidad la mayoría de las personas invierte alrededor de 2 horas por día viajando y más de 8 horas trabajando. Esto genera que, a la hora de ingerir alimentos, nuestras opciones se inclinen por aquellas comidas que nos demanden menor cantidad de tiempo tanto en la preparación como en el consumo. En medio de este panorama las elecciones del menú diario tienden a estar compuestas por aquellos alimentos que menos nos benefician, o sea alimentos nutricionalmente pobres.

En la actualidad, el concepto clásico de nutrición equilibrada como aquella que aporta a través de los alimentos las correctas proporciones de los nutrientes básicos, tales como hidratos de carbono, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales como para satisfacer las necesidades orgánicas particulares, tiende a ser sustituido por el de nutrición funcional, que además de nutrir se refiere a la potencialidad que tienen algunos alimentos para promocionar la salud, mejorando el bienestar y reduciendo el riesgo de desarrollar ciertas enfermedades. Tales alimentos son llamados “alimentos funcionales”.

El concepto de alimentos funcionales es la principal innovación detrás de la cual se está encolumnando en el mundo la industria de los alimentos. Este concepto no es nuevo, fue acuñado en Japón en la década del 80, pero recién 20 años después empieza a popularizarse. Los ejemplos más básicos que tenemos en la Argentina para graficar esta tendencia en ascenso hay que buscarlos en el segmento de los lácteos, por ejemplo, en yogures que mejoran distintos aspectos relacionados con la salud. En otros países del mundo ya existen más de 1000 productos diferentes dentro de este segmento.

12.2 Resultados y discusión.

12.2.1. Propiedades nutricionales de los CPL.

El principal atributo nutricional de los CPL es su contenido de proteínas que, de acuerdo al método de obtención, puede variar entre un 35 a 80% (ver capítulo 1, página 6). La proporción del resto de los componentes, lactosa, lípidos, humedad y cenizas varía de acuerdo al porcentaje de proteínas de cada CPL en particular. En el caso del presente trabajo se utilizó un CPL cuya composición es la siguiente: 49,3% de proteínas, calculado como: [nitrógeno total (8,0%) – nitrógeno no proteico (0,3%)] x 6,38, 5,6% de lípidos, 5,1% de humedad, 6,0% de cenizas y 32,3% de lactosa (estimada por diferencia). Este CPL en particular proporciona 376,8 Kcal/100g.

12.2.2. Calidad de las proteínas de lactosuero.

Tradicionalmente las proteínas de lactosuero se usaban principalmente por sus propiedades funcionales en diversos alimentos más que por sus propiedades nutricionales. Sin embargo, en los últimos años, los tecnólogos de alimentos comenzaron también a focalizar su atención sobre la calidad nutricional de dichas proteínas.

El valor nutricional o calidad de una proteína es útil para establecer la capacidad de ésta para satisfacer las necesidades del organismo. La calidad de una proteína se puede evaluar con distintos parámetros, entre ellos:

- a) *Índice químico*: está dado por el menor cómputo químico de la proteína en estudio, y el aminoácido que presenta el menor cómputo químico se denomina aminoácido limitante. El cómputo químico es la cantidad de un aminoácido esencial que contiene una proteína en relación a la cantidad de ese mismo aminoácido en una proteína de referencia.
- b) *Valor biológico*: determina la proporción de nitrógeno proteico absorbido que es retenido por el organismo. Es una medida de cuánto de lo absorbido es utilizado para sintetizar las proteínas propias. El valor biológico aumenta cuando los aminoácidos que aporta la proteína en estudio son los necesarios y están en la proporción correcta para la síntesis de proteínas propias.

Las proteínas del lactosuero son proteínas de alto valor biológico, que satisfacen los requerimientos de aminoácidos esenciales del organismo. La Figura 12.1 muestra el contenido de aminoácidos esenciales de proteínas de CPL, trigo, maíz y arroz, expresados como porcentaje del patrón de referencia FAO (Hambreus, 1982).

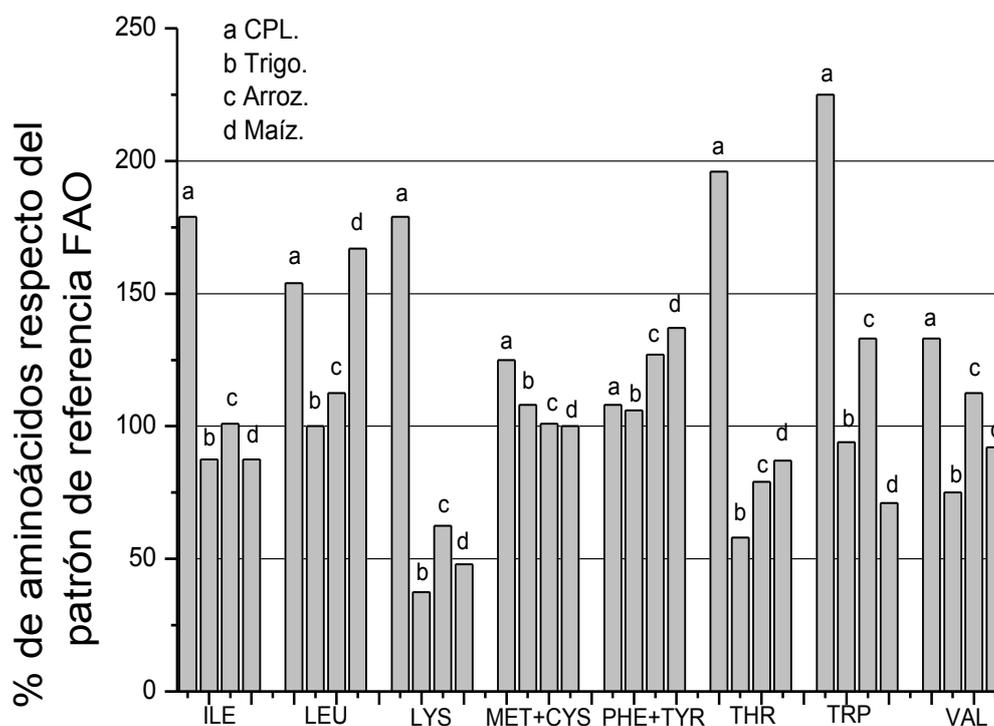


Figura 12.1. Contenido de aminoácidos esenciales de proteínas de CPL, trigo, maíz y arroz, expresados como porcentaje del patrón de referencia FAO (Hambreus, 1982).

Como se observa en la figura 12.1, el CPL tiene un excedente de todos los aminoácidos esenciales comparado con el patrón FAO. Se destaca el alto contenido de los aminoácidos isoleucina, lisina, treonina y triptofano. Las proteínas de trigo son pobres en lisina y treonina, mientras que las de maíz lo son en lisina y triptofano. Por otro lado, las proteínas del arroz tienen una composición de aminoácidos esenciales relativamente bien balanceada, aunque los contenidos de lisina y treonina son algo bajos. (Hambreus, 1982).

Tabla 12.1. Necesidades de aminoácidos esenciales en el hombre en (mg/día) según la FAO/OMS (1985).

Aminoácido	Niño de 40 kg	Adulto de 70 kg
Ile	1120	700
Leu	1760	980
Lys	1760	840
Met + Cys	880	910
Phe + Tyr	880	980
Thr	1120	490
Trp	132	245
Val	1000	700
His	640	630

La composición proteica de los geles viene dada prácticamente por el aporte de las proteínas de lactosuero, despreciándose las proteínas aportadas por la miel. En la tabla 12.2 se muestran los mg de cada aminoácido en un gramo de proteína de suero de leche.

Tabla 12.2. Miligramos de cada aminoácido en un gramo de proteína de suero de leche, (Hambreus, 1982).

Aminoácido	mg de aminoácido/g de proteína de suero de leche
Ileu	76
Leu	118
Lys	113
Met + Cys	52
Phe + Tyr	70
Thr	84
Trp	24
Val	72
His	17

En base a los datos de la tabla 12.1 y 12.2 se puede estimar cuánto aportan 100g de gel con 10% de proteínas (10 gramos) a las necesidades diarias de aminoácidos esenciales.

Tabla 12.3. Porcentaje de las necesidades diarias de aminoácidos esenciales cubiertas por 100 gramos de gel.

Aminoácido	mg/100g de gel	% de las necesidades diarias cubiertas	
		Niños de 40 kg	Adulto de 70 kg
Ileu	760	68%	109%
Leu	1180	67%	120%
Lys	1130	64%	135%
Met + Cys	520	59%	57%
Phe + Tyr	700	80%	71%
Thr	840	75%	171%
Trp	240	182%	98%
Val	720	72%	103%
His	170	26%	27%

Si se observa la tabla 12.3 se aprecia que 100 gramos de gel proveen en la mayoría de los casos más del 100% (dependiendo del aminoácido) de los requerimientos diarios de aminoácidos esenciales para un adulto de 70 Kg. En el caso de los niños, 100 gramos de gel proveen entre 59% y 182% (dependiendo del aminoácido) de los requerimientos diarios de aminoácidos esenciales.

12.2.3. Las proteínas de lactosuero y sus efectos positivos sobre la salud.

Durante cientos de años diferentes culturas utilizaron el suero de leche en la prevención y tratamiento de enfermedades como parte de la medicina popular. Más aún, en el siglo XVII Baricellius (1603) hacía referencia a los efectos benéficos que tiene el suero de leche sobre la salud. Durante este período de la historia, el lactosuero se prescribía para el tratamiento de numerosas dolencias, incluyendo infecciones agudas y gastrointestinales (Mc Intosh y col. 1998).

Las proteínas del lactosuero no solamente cumplen un rol muy importante en el aspecto nutricional, dado que son una excelente fuente de aminoácidos esenciales (Regester y col., 1996), sino también por sus acciones fisiológicas *in vivo*. Por otro lado, el creciente interés por los alimentos que ofrecen un beneficio para la salud tiene sus orígenes en el fuerte deseo de los consumidores de obtener un efecto positivo en la salud a través de los alimentos, y en los costos sociales y económicos que acarrea una dieta pobre e inapropiada. En medio de este panorama se generan para la industria de alimentos muchas oportunidades, entre ellas, el desarrollo de productos alimenticios, basados en proteínas del suero de leche, dirigidos a un mercado no tradicional como el sector de los alimentos funcionales (Mc Intosh y col. 1998).

Los geles de CPL adicionados con miel no solamente tienen la capacidad de nutrir sino que también influirían positivamente sobre algunos aspectos de la salud. En comparación con otras proteínas, las proteínas del suero tienen la capacidad de optimizar ciertos aspectos claves del sistema inmunológico. Aunque los mecanismos exactos todavía no se conocen completamente, dichas proteínas modularían la función inmunológica incrementando la producción de glutatión (GSH) en diferentes tejidos, y preservarían las reservas de glutamina muscular (Cribb, 2004). El GSH se sintetiza dentro de las células a partir de 3 aminoácidos: cisteína, glutamato y glicina (Wu y col., 2004). Sin embargo, la cisteína es el aminoácido limitante en la producción de GSH (Townsend y col., 2003). Las proteínas del suero son muy ricas en cisteína, y los CPL generalmente tienen una cantidad de dicho aminoácido 4 veces superior a otras proteínas de alta calidad (Bucci y col., 2000). En diversos trabajos se demostró que los CPLs son donantes efectivos de cisteína que mantienen la concentración de GSH dentro de las células (Bounous y col., 1989 y Kent y col, 2003). La proteínas del suero son también una excelente fuente natural de aminoácidos de cadena ramificada (Walzem y col., 2002), los cuales son usados por el músculo para la síntesis de glutamina (Ha y col. 2003). Dicha glutamina es exportada constantemente hacia la sangre dado que es el combustible metabólico esencial del sistema inmunológico (Rowbottom y col., 1996).

En estudios llevados a cabo en ratones a los que se les complementó la dieta con CPL se encontró una menor incidencia y tamaño en los tumores de colon (Bounous y col., 1988). Estos hallazgos fueron corroborados años más tarde por

otros investigadores que encontraron que el CPL tiene 2 veces más efecto protector contra el desarrollo de tumores intestinales que las proteínas de soja (McIntosh y col., 1995). Otros grupos también encontraron propiedades anticarcinógenas de las proteínas del suero en glándulas mamarias de ratas (Hakkak y col., 2000) y en células prostáticas humanas (Kent y col., 2003).

Debido a estos hallazgos la suplementación con proteínas de lactosuero está comenzando a ser vista como una terapia no farmacéutica adjunta al tratamiento tradicional del cáncer (Bounous, 2000).

12.2.4. Propiedades nutricionales de la miel.

Dentro de los principales componentes alimenticios que se destacan en la miel por su cantidad, se encuentran los hidratos de carbono. De aquí deriva la principal propiedad nutritiva de la miel, que es un alimento de alto poder energético que proporciona entre 300 y 320 Kcal/100g. En cambio no sucede lo mismo con las proteínas: la miel contiene aproximadamente un 0,26% (N x 6,25) de proteínas, que proviene, casi en su totalidad, del polen presente en la miel. En cuanto a los aminoácidos presentes se cuentan 18, predominando sobre todo la prolina, pero tienen escaso significado nutritivo, ya que el peso total de los mismos por 100g es de sólo algunos miligramos.

Situación similar presentan las vitaminas y las sales minerales, que aún estando presentes en bastante número, sus cantidades son insignificantes. Teniendo en cuenta las necesidades vitamínicas diarias recomendadas en la alimentación humana y el contenido vitamínico en las cantidades de miel que normalmente se consume por día, este contenido es de poca importancia.

De lo expuesto se deduce que la miel es una buena fuente de energía, rápidamente aprovechable debido a su alto contenido en fructosa y glucosa que son absorbidas directamente por el organismo.

12.2.5. La miel y sus efectos positivos sobre la salud.

Desde el punto de vista terapéutico, el poder de la miel es mítico. La farmacopea antigua la integraba en numerosas preparaciones medicinales que eran destinadas a curar las afecciones más diversas. Se sabe que la miel ha sido utilizada en medicina naturista para el tratamiento de heridas y como antiinflamatorio. Una de las propiedades más destacadas es su efecto antibacteriano. Los primeros investigadores que trabajaron en este tema (Dold y col., 1937), llamaron “inhibina” a las sustancias con actividad antibiótica de la miel. Se mide por el efecto que produce una muestra de miel diluida sobre el crecimiento de bacterias inoculadas sobre una placa. El efecto “inhibina” se debe, al menos en parte, al peróxido de hidrógeno producido y acumulado en la miel diluida por la enzima glucosa oxidasa presente en dicho producto, durante su acción sobre la glucosa de la miel. Estas propiedades antisépticas, unidas a su poder emoliente, hacen que la miel sea un excelente cicatrizante y protector de la piel, siendo empleada tópicamente en quemaduras, heridas y grietas (White y col., 1962).

Clínicamente a la miel se le atribuyen propiedades cardiotónicas, antitusivas, digestivas, diuréticas y laxantes, entre otras (Salas Llinares, 1986).

12.2.6. Propiedades nutricionales de los geles de CPL.

La tabla 12.4 muestra las características nutricionales de los geles de CPL evaluados y del relleno tradicional de una tarta de limón. Comparando los valores nutricionales de los geles 4 (usado para la tarta de limón) y 5 (relleno tradicional de la tarta de limón) se observa que a pesar de que el gel 4 aporta más kilocalorías, el gel 5 tiene un aporte lipídico de casi el doble y un aporte proteico 10 veces menor que el 4. El Ca aportado por el gel 4 (38% de la DDR) es muy superior al aportado por el gel 5.

Tabla 12.4. Información nutricional de los geles. Gel 1: 0% de miel, gel 2: 20% de miel, gel 3: 37,5% de miel, gel 4 (usado para la tarta de limón): 27,5% de miel, gel 5 relleno tradicional de la tarta de limón.

Gel (100g)	Proteínas (g)	Lípidos (g)	Glúcidos (g)	Agua (g)	Kcal.	Ca (%DDR)⁽¹⁾
1	10	1,1	6,6	82,3	76,3	38
2	10	1,1	22,2	66,7	138,7	38
3	10	1,1	35,9	53	193,5	38
4	10	1,1	28,1	60,8	162,3	38
5	0,9	1,9	23,3	72	103,8	1

⁽¹⁾DDR: dosis diaria recomendada basada en un adulto de 70 Kg.

12.3. Conclusiones.

Los geles de CPL adicionados con miel presentan algunas características nutricionales importantes como la de aportar proteínas de alto valor biológico que cubren altos porcentajes de las necesidades diarias de aminoácidos esenciales, dependiendo de la etapa de la vida. Sumado a lo anterior, un bajo aporte de lípidos los coloca en una posición ventajosa a la hora de diseñar una dieta de bajo contenido lipídico.

Por otro lado, las investigaciones sobre el impacto positivo que poseen las proteínas del lactosuero y la miel sobre diversos aspectos de la salud colocaría a los geles de CPL adicionados con miel en la categoría de alimentos funcionales.

*13. Estudio microbiológico
de los geles.*

13.1 Introducción.

La presencia de microorganismos en alimentos no representa necesariamente un indicador de peligro para el consumidor. Excepto para unos pocos productos estériles, cada bocado de comida que ingerimos contiene una gran cantidad de levaduras, hongos y bacterias. Los alimentos se vuelven potencialmente peligrosos para el consumidor sólo cuando los principios de higiene y sanidad no son respetados. Si un alimento estuvo expuesto a condiciones que podrían permitir la entrada y/o crecimiento de agentes infecciosos o toxigénicos, el alimento se vuelve un vehículo para la transmisión de enfermedades. La detección de estos peligros depende del examen de muestras de alimentos para encontrar los agentes causales (Kramer, 1991).

13.2 Resultados y discusión.

El estudio de los microorganismos presentes en el CPL y la miel mostraron en ambos casos un recuento microbiano total y de hongos y levaduras menor a 30 unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g). Estos resultados indican que la materia prima para la formación de geles tiene una carga microbiana baja.

En la tabla 13.1 se muestran los valores de actividad acuosa (a_w) de los geles analizados.

Gel	Actividad acuosa
pH 3,75	0,938
pH 4,2	0,933
pH 7,0	0,926

Tabla 13.1. Actividad acuosa de los geles con 37,5% de miel.

Estos valores indican que los geles son buenos sustratos para el crecimiento microbiano. Sin embargo, los resultados de la tabla 13.2 muestran que no existe un

desarrollo microbiológico significativo en los geles ensayados a distintos tiempos de almacenamiento a 4°C.

t _{4°C}	1 día		5 días		30 días		60 días	
	RMT	RHL	RMT	RHL	RMT	RHL	RMT	RHL
gel pH 3,75	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
gel pH 4,2	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
gel pH 7,0	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30

Tabla 13.2. Unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) en geles almacenados a 4°C durante diferentes períodos de tiempo. t_{4°C} es el tiempo de almacenamiento a 4°C, RMT es el recuento microbiano total y RHL es el recuento de hongos y levaduras.

Los resultados muestran que hasta 60 días de almacenamiento en las condiciones especificadas no existe desarrollo microbiológico en ningún caso. Estos resultados eran de esperar debido a dos factores: la materia prima para la obtención de los geles tiene un recuento microbiológico muy bajo, y el método de obtención de los geles implica un calentamiento de la dispersión acuosa de CPL y miel durante 45 minutos a 87°C.

13.3 Conclusiones.

Los geles de proteínas de lactosuero adicionados con miel pueden considerarse desde el punto de vista microbiológico como aptos para el consumo humano ya que en las condiciones de preparación y almacenamiento descritas no presentan un desarrollo microbiológico significativo.

14. Discusión general.

14.1 Características de los geles de CPL.

Los resultados obtenidos en geles con distintos pHs se resumen en la tabla 14.1.

	pH del gel.		
	3,75	4,2	7,0
Principales uniones que estabilizan la estructura del gel.	Interacciones no covalentes.	Interacciones no covalentes.	Interacciones covalentes (puentes disulfuro) y no covalentes.
Temperatura de desnaturalización de las proteínas del gel.	Alta.	Alta.	Baja.
Estructura microscópica.	Estructura particulada de tamaño de poro pequeño.	Estructura particulada de tamaño de poro grande.	Estructura particulada de tamaño de poro pequeño.
CRA.	Intermedia.	Baja.	Alta.
Elasticidad.	Baja.	Baja.	Alta.
Tiempo de relajación.	Bajo.	Intermedio.	Alto.
Adhesividad.	Alta.	Intermedia.	Baja.
Cohesividad.	Baja.	Baja.	Alta.
Comportamiento elástico (G').	Bajo.	Bajo.	Alto.
Comportamiento viscoso (G'').	Alto.	Alto.	Bajo.
Tan Φ^1 .	Alto.	Intermedio.	Bajo.
K (cte. de	Intermedio.	Bajo.	Alto.

gelificación).			
Apariencia.	Menor aceptación.	Intermedia.	Mayor aceptación.
Sabor.	Menor aceptación.	Intermedio.	Mayor aceptación.
Textura.	Menor aceptación.	Intermedia.	Mayor aceptación.
Aceptabilidad general.	Menor aceptación.	Intermedia.	Mayor aceptación.

⁽¹⁾ Tangente del ángulo de defasaje = $\text{Tangente } G''/G'$.

Tabla 14.1. Resumen de los resultados obtenidos en geles de distinto pH. Las categorías “Menor aceptación”, “intermedia” y “Mayor aceptación” hacen referencia a la comparación de los geles entre ellos.

Los ensayos de solubilidad de los geles en AD, B y BSU y el posterior análisis electroforético permite inferir el tipo de uniones que estabilizan la matriz y las fracciones proteicas involucradas en la misma. Los resultados obtenidos muestran que en los geles de pH ácido las interacciones no covalentes son las responsables de la estabilización de la matriz del gel, mientras que, en los geles neutros intervienen también las interacciones covalentes por puentes disulfuro. Los geles de pH 3,75 tendrían una matriz estabilizada fundamentalmente mediante interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y puentes hidrógeno aportadas por la β -Lg, mientras que la α -La intervendría sólo a través de interacciones electrostáticas. Por el contrario, a pH 4,2 ambas proteínas contribuyen con todas las interacciones no covalentes mencionadas. A pH 7,0 las proteínas del suero participarían en la estabilización de la matriz del gel mediante interacciones covalentes y no covalentes.

Los resultados obtenidos de los ensayos de DSC indican que el proceso de desnaturalización térmica de proteínas de suero de leche está influenciado por el pH del medio al cual se realizaron las pruebas. Los geles de pH neutro presentan valores de T_p menores que los geles ácidos.

La distribución de especies proteicas y la interacción entre éstas es la responsable de las diferencias observadas en la estructura analizada por MEB. Las observaciones microscópicas revelan que tanto los geles ácidos como los neutros presentan una estructura particulada donde dichas partículas tienen un tamaño del orden de los 0,5 μm . Sin embargo, los geles de pH 4,2 presentan una estructura

más agregada con poros más grandes que los geles de pH 3,75 y 7,0 probablemente debido a la cercanía al pI de las proteínas del suero, de manera que éstas tienden a agregarse al disminuir la repulsión electrostática. Esta estructura más agregada produce una disminución en la capacidad de retención de agua (CRA) de los geles de pH 4,2 debido a que disminuyen las posibilidades de formar puentes hidrógeno con el agua.

La CRA de los geles es afectada por las condiciones de pH al cual los geles fueron preparados. Los geles de pH 7,0 presentan la CRA más alta y los de pH 4,2 la más baja, por los motivos arriba explicados. Por otro lado, la CRA de los geles de pH 3,75 es intermedia entre los geles de pH 4,2 y 7,0.

La presencia de puentes disulfuro en los geles de pH 7,0 determina valores de elasticidad y cohesividad elevados con respecto a los geles ácidos. Los puentes disulfuro incrementan la fuerza de cohesión intermolecular que mantienen la estructura de dichos geles. Si una muestra del material en estudio es deformada, y esa deformación se mantiene a un nivel constante, el estrés desarrollado durante la deformación relaja gradualmente (Bloksma, 1978). El tiempo que la muestra tarda en relajarse es un indicador del comportamiento viscoso de la misma. Si el tiempo de relajación es alto, tal como sucede con los geles neutros, la muestra tiene un comportamiento viscoso pobre; en cambio, si el tiempo de relajación es bajo (geles ácidos) la muestra tiene un comportamiento viscoso importante.

Del análisis de los valores obtenidos para el módulo de almacenamiento, módulo de pérdida y tangente del ángulo de defasaje se desprende que en los geles de pH 7,0 predominan las propiedades elásticas por sobre las viscosas. En cambio, en los geles ácidos predominan las propiedades viscosas.

La constante de gelificación (K) es un indicador de cuán rápido sucede el proceso de gelificación. Los resultados muestran que las dispersiones de pH 7,0 son las primeras en gelificar, luego le siguen las dispersiones de pH 3,75, y por último las dispersiones de pH 4,2. Estos resultados concuerdan con los valores obtenidos para el "gel time" (t^*), observando que los geles de pH 4,2 presentaron, a bajas concentraciones de miel, los valores más altos de dicho parámetro. A pH 4,2, en las cercanías del pI de la β -Lg y α -La, las proteínas tienden a agregarse al disminuir la repulsión electrostática; probablemente este hecho retrase el proceso de gelificación con el consecuente aumento del "gel time" (t^*).

Los resultados de la evaluación sensorial llevados a cabo con el objetivo de evaluar la opinión de la gente sobre los geles mostraron en todos los casos que los geles de pH 7,0 fueron los más aceptados desde todo punto de vista (apariencia, sabor, textura y aceptabilidad general).

La tarta de limón tuvo una aceptabilidad general entre buena y muy buena para el 65% de los encuestados, lo que sumaría una posibilidad de uso para los geles ácidos.

14.2 Efecto de la miel.

La miel contiene glucosa y fructosa en altas concentraciones, las cuales tienen la capacidad de formar puentes hidrógeno y de esta manera modificar las propiedades de los productos a los cuales se agrega.

La miel:

- Aumenta la resistencia de las proteínas del suero a la desnaturalización por calor a todos los pHs ensayados, teniendo un efecto más marcado a pH 7,0, donde la sensibilidad de dichas proteínas a la desnaturalización térmica es mayor.
- Aumenta la temperatura de gelatinización del almidón pues compite con éste por las moléculas de agua disponibles para dicho proceso.
- Disminuye el tamaño de los poros de los geles.
- Aumenta la capacidad de retención de agua por formación de puentes hidrógeno con las moléculas de agua. A altos contenidos de miel las diferencias en la CRA debidas al pH tienden a desaparecer.
- No modifica prácticamente la solubilidad de los componentes proteicos de los geles.
- Aumenta los parámetros de Hunter *a* (rojo) y *b* (amarillo) y disminuye *L* (luminosidad) a todos los pHs ensayados, como consecuencia del propio

color de la miel y por las reacciones de Maillard que se ven favorecidas por la presencia de los azúcares reductores de la miel.

- No modifica la firmeza ni la cohesividad de los geles.
- Disminuye levemente la elasticidad de los geles, especialmente a altas concentraciones y a todos los pHs ensayados.
- Disminuye el tiempo de relajación en los geles de pH 7,0 y 4,2 por disminuir el comportamiento sólido de estos geles. Sin embargo los geles de pH 3,75 presentan características viscosas antes del agregado de miel por lo que el agregado de este componente no modifica su comportamiento.
- Aumenta la adhesividad de los geles ácidos pero no modifica la de los geles neutros.
- Disminuye el módulo elástico (G') a todos los pHs ensayados siendo su efecto más notorio a pH 7,0.
- Aumenta el módulo viscoso (G'') a pH ácido y casi no modifica este parámetro a pH neutro.
- Aumenta la tangente del ángulo de defasaje ($\text{Tan } \phi$) a todos los pHs y a altas concentraciones reduce las diferencias debidas al pH en los valores de dicho parámetro.
- Aumenta ligeramente el “gel time” (t^*) y la constante de gelificación de geles ácidos.
- Aumenta apreciablemente el “gel time” (t^*) y la constante de gelificación de geles neutros.
- Mejora todos los atributos sensoriales evaluados.

14.3. Efecto de la harina de trigo.

La harina de trigo tiene dos componentes mayoritarios: el almidón y las proteínas de almacenamiento: gliadinas y gluteninas. Estos dos componentes modifican de una manera u otra las propiedades funcionales y estructurales de los geles de CPL. El almidón durante la preparación del gel (calentamiento en agua) gelatiniza, y las proteínas de almacenamiento sufren modificaciones estructurales.

La harina de trigo:

- Disminuye la temperatura de desnaturalización (T_p) de las dispersiones de CPL a todos los pHs ensayados.
- Forma una red de gluten discontinua debido al hecho de que las proteínas del suero rompen la estructura del gluten.
- Genera una estructura microscópica heterogénea debido a la presencia de gránulos de almidón y de proteínas de la harina de trigo.
- Disminuye la solubilidad de las proteínas de suero en geles.
- Aumenta la capacidad de retención de agua debido a la capacidad del almidón y de las proteínas de almacenamiento de ligar agua.
- Aumenta los parámetros de Hunter *a* (rojo) y *b* (amarillo) y disminuye *L* (luminosidad) probablemente debido a un cierto grado de hidrólisis del almidón en las condiciones de gelificación. Esta hidrólisis genera los azúcares reductores responsables de las reacciones de Maillard.
- Aumenta la firmeza en todas las condiciones ensayadas debido a la presencia de almidón gelatinizado y a las proteínas que forman el gluten.
- Aumenta la elasticidad.

- Aumenta levemente el módulo elástico (G') y no modifica el módulo viscoso (G'').
- Disminuye los valores de la tangente del ángulo de defasaje ($\tan \phi$) lo que indica que promueve la organización estructural intermolecular.
- No modifica los valores del “gel time” (t^*) per se; sin embargo, enmascara el efecto de la miel sobre dicho parámetro.

Conclusiones.

Los geles de CPL poseen propiedades estructurales y funcionales que dependen, entre otros factores, del pH al cual fueron preparados, y de la presencia de otros componentes como miel y harina de trigo. Los geles ácidos tienen la textura de un producto untable, característica que podría aprovecharse como una alternativa más a los quesos untables existentes en el mercado. Por otro lado, la textura de los geles de pH 7,0 es similar a la de los postres tipo flan, lo que agregaría una posibilidad de uso para estos geles.

Como fue descrito por otros autores, la estructura de los geles ácidos está estabilizada por interacciones no covalentes, mientras que en la estructura de los geles neutros, además de las interacciones no covalentes mencionadas, participan también las covalentes como los puentes disulfuro. Los resultados obtenidos en esta tesis permiten concluir que en los geles preparados a pH 3,75 la β -lactoglobulina interviene en la estructura de los geles por medio de interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y puentes hidrógeno, mientras que la α -lactoalbúmina lo hace principalmente a través de interacciones electrostáticas. En los geles preparados a pH 4,2 ambas proteínas contribuyen al mantenimiento de la estructura con uniones electrostáticas, puentes de hidrógeno e hidrofóbicas.

Las propiedades térmicas de las dispersiones de CPL, como la temperatura de desnaturalización de sus proteínas, son afectadas por el pH, la miel y la harina de trigo. La miel aumenta la temperatura de desnaturalización proteica de las dispersiones; por el contrario, la harina de trigo la disminuye.

A pH 4,2 se forman geles de tamaño de poro grande y de capacidad de retención de agua inferior a la de los geles de pH 3,75 y 7,0. Estos últimos presentan un tamaño de poro pequeño. La miel disminuye el tamaño de poro de los geles a todos los pHs ensayados. Por otro lado, la harina de trigo modifica la estructura microscópica de los geles debido a la presencia de gránulos de almidón y de proteínas capaces de formar gluten. El agregado de miel y harina de trigo a los geles aumenta la capacidad de retención de agua de éstos a todos los pHs ensayados.

Con respecto a la textura, los geles ácidos son más viscosos y más adhesivos que los neutros; en cambio, estos últimos son más elásticos y cohesivos que los ácidos.

La harina de trigo aumenta la firmeza de todos los geles. El agregado de miel aumenta el comportamiento viscoso de los geles a todos los pHs ensayados, mientras que la harina de trigo aumenta el comportamiento elástico.

El proceso de gelificación se da a mayor velocidad en los geles de pH 7,0; la menor velocidad se registra en los de pH 4,2. El agregado de miel disminuye sensiblemente la velocidad de gelificación de los geles neutros, pero casi no afecta la de los geles ácidos.

Tanto la miel como la harina de trigo modifican el color de los geles, haciéndolos más oscuros e incrementando los tonos rojos y amarillos.

Los atributos sensoriales de los geles de pH 7,0 son superiores a los de los geles ácidos, y la miel mejora la aceptabilidad sensorial de todos los geles. Los geles ácidos tienen mejor aceptación cuando forman parte del relleno de una tarta de limón.

Los geles de CPL son alimentos funcionales, que aportan proteínas de alto valor biológico. Estas proteínas cubren altos porcentajes de las necesidades diarias de aminoácidos esenciales, y proporcionan además otros beneficios sobre diversos aspectos de la salud.

Los geles a los tres pHs indicados y con 37,5% de miel no presentan un desarrollo microbiológico significativo cuando se los almacena a 4°C por un período de hasta 60 días, lo que los convierte en microbiológicamente aptos para el consumo humano.

En base a estos resultados los geles de CPL podrían utilizarse en la formulación de algunos alimentos, aprovechando sus propiedades nutricionales y las distintas propiedades funcionales y estructurales que desarrollan de acuerdo a las condiciones en las que fueron preparados.

Referencias.

Referencias.

Aguilera, M. (1995). Gelation of whey proteins. *Food Technology*, 10. 83-89.

Almdal, K.; Dyre, J.; Hvidt, S. y Kramer, O. (1993). Towards a phenomenological definition of the term gel. *Polym. Gels Networks*, 1, 5-17.

Anandharamakrishnan, C.; Rielly, C. y Stapley, A. (2008). Loss of solubility of α -Lactalbumin and β -lactoglobulin during the spray drying of whey proteins. *LWT*, 41, 270-277.

Baeza, R.; Pilosof, A. (2001). Mixed biopolymer gels systems of β -lactoglobulin and non-gelling gums. *Food Colloids-Fundamental of Formulation*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry. 392-403.

Barbut, S. (1995). Effect of sodium level on the microstructure and texture of whey protein isolate gels. *Food Research International*, 28: 437-443.

Baricellius, J. C. (1603). The first little work concerning the qualities and use of milk. *Naples-Lazarum Scoriggium*.

Belitz, H. y Grosch, W. (1988). *Química de los alimentos*. 2ª Ed. Editorial Acribia, SA. 50080. Zaragoza. España.

Bernal, V. y Jelen, P. (1985). Thermal stability of whey proteins-A calorimetric study. *J Dairy Sci.*, 68, 2847-2852.

Bloksma, A.H. (1978). Rheology and chemistry of dough. En Y. Pomeranz, *Wheat. Chemistry and technology* (pp. 523-584). St. Paul, Minnesota: Am. Assoc. Cereal Chem., Inc.

Bonifaccia, G.; Chirico, M.; Stacchini, P. y Zanasi, F. (1984). Contenido in aminoacidi liberi nel miel. *Riv. Soc. Ital. Sci. Alimet.* 13, 1, 47-50.

- Bounous, G. (2000). Whey protein concentrate and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Research*, 20, 4785-4792.
- Bounous, G.; Papenburg, R.; Kongshavn, P.; Gold, P. y Fleiszer, D. (1988). Dietary whey proteins inhibits the development of dimethylhydrazine induced malignacy. *Clinical Investigation Medicine*, 11, 213-217.
- Bounus, G.; Batist, G.; y Gold, P. (1989). Immunoenhancing property of dietary whey protein in mice: role of glutathione. *Clinical Investigation Medicine*, 12, 3, 154-161.
- Bourne, M. C. (1982). Principles of objective texture measurements. En: *Food texture and viscosity: concept and measurement*. Academic Press, N. Y. Cap 3, páginas 44-117.
- Bourne, M. C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32, 62-66, 72.
- Boye, J.; Alli, I; Ramaswamy, H. y Raghavan, V. (1997). Interactive effects of factors affecting gelation of whey proteins. *Journal of Food Science*, 62, 1, 57-65.
- Breton, B. C. (2004). The Early History and Development of the Scanning Electrón Microscope, Cambridge University Engineering Department.
- Bucci, L.; y Unlu, L. (2000). Proteins and aminoacids in exercise sports. En: Energy Yielding Macronutrients and Energy Metabolism in Sport Nutritions. Driskell J and Wolinsky I. Eds. CRC Press. Boca Raton FL. p 197-200.
- Calvo, C. (1999). Uso de los colorantes en el campo de la alimentación. En: *Alimentación, Equipos y Tecnología*; N° 3: 79-88.

- Capitani, C, Perez O., Bertoldo Pacheco M., Pilosof, A. (2007). Influence of complexing carboxymethylcellulose on the thermostability and gelation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 21, 1344-1354.
- Cheftel, J.C. y Lorient, D. (1982) Les propriétés fonctionnelles des protéines laitières et leur amélioration. *Lait*, 62, 436-483.
- Cheftel, J.C.; Cuq, J. L. y Lorient, D. (1993). Aminoácidos, péptidos y proteínas. En "Química de los alimentos". Ed. Fennema, O. R. Acribia, España, Cap.5, Págs. 275-414.
- Chronakis, I. (1996). Network formation and viscoelastic properties of commercial soy protein dispersions: effect of heat treatment, pH and calcium ions. *Food Research International*, 29, 123-134.
- Clark, A. (1991). Structural and mechanical properties of biopolimer gel modulus. *Food Polymers, Gels and Colloids*. Royal Society of Chemistry, Special Publ. No 82. p. 322 – 398.
- Clark, A.y Ross-Murphy, S. (1987). Structural and mechanical properties of biopolymers gels. *Adv. Polym. Sci.*, 83, 60-192.
- Clark, A.; Judge, F.;Richards, J.; Stubbs, J.; and Sugget, A. (1981). *Int. J. Peptide Protein Res.*, 17, 380-392.
- Código Alimentario Argentino. (2004). Capítulo 10: Alimentos azucarados. Reglamento Técnico MERCOSUR de Identidad y Calidad de la Miel. Página 11.
- Código Alimentario Argentino. (2004). Capítulo 9: Alimentos Farináceos – Cereales, Harinas y Derivados. Página 10. Artículo 661.
- Código Alimentario Argentino. (2004). Capítulo 9: Alimentos Farináceos – Cereales, Harinas y Derivados. Página 9. Artículo 657.

- Considine, D. y Considine, G. (1982). Foods and food production encyclopedia. Eds. Considine, D.M. and Considine, G.D., pp. 950-960. Van Nostrand Reinhold Company Inc., New York.
- Cooney, M.; Rosemberg, M. y Shoemaker, C. (1993). Rheological properties of whey proteins concentrate gels. *Journal of Texture Studies*, 24, 325-334.
- Crane, E. (1980). El libro de la miel. Brevarios. Fondo de Cultura Económica.
- Crane, E. (1975). Honey a comprehensive survey. Heinemann. London. Ed.
- Crane, E; y Walker, P. (1985). Important honeydew sources and their honeys. *Bee World*, 66, 3, 105-112.
- Creamer, L; Bienvenue A.; Nilsson H., Paulsson M.; Wanroij M.; Lowe E.; Anema S.; Boland M. y Jimenez-Flores R. (2004). Heat – induced redistribution of disulfide bonds in milk proteins. Bovine β - lactoglobulin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 7660-7668.
- Cribb, P. (2004). Whey proteins and immunity. En: Applications Monograph Immunity. U.S. Dairy Export Council.
- Dello Staffolo, M.; Bertola N.; Martino M. y Bevilacqua A. (2004). Influence of dietary fiber addition on sensory and rheological properties of yogurt. *International Dairy Journal*, 14, 263-268.
- Dobraszczyk, B. (1997). The rheological basis of dough stickiness. *J. Texture Studies*, 28, 139-162.
- Dumay, E. (1988). Dénaturation thermique de la β -lactoglobuline et propriétés gélifiantes des concentrés protéiques de lactosérum. En D. Lorient, B. Colas y M. Le Meste, Propriétés Fonctionnelles des Macromolécules Alimentaires (pp. 67-87). Paris: Technique et Documentation.

- Eigel, W. N., Butler, J. E., Ernstrom, C. A., Farrel, H. M., Jr., Harwalker, V. R., Jenness, R., and Whitney, R. (1984). Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision, *J. Dairy Sci.*, 67, 1599.
- Euston S., Rehman S., Costello G. (2007). Denaturation and aggregation of β lactoglobulin – a preliminary molecular dynamics study. *Food Hydrocolloids*, 21, 1081-1091.
- Fitzsimons S., Mulvihill D. y Morris E. (2007). Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids*, 21, 638-644.
- Francis, F. (1987). Lesser-Known Food Colorants. *Food Tech.*, 40, 7, 62-68.
- Gault, P., y Fauquant, J. (1992). Aptitude à la gélification thermique de la β -lactoglobuline: influence du pH, de l'environnement ionique et de la présence des autres protéines du lactosérum. *Lait*, 72, 491-510.
- Ghiasi, K.; Hosenev, R. y Varriano-Marston, E. (1982). Effects of flour components and dough ingredients on starch gelatinization. *Cereal Chemistry*, 60, 58-61.
- Giboreau, A.; Cuvelier, G. y Launay, B. (1994) Rheological behaviour of three biopolymers/water systems, with emphasis on yield stress and viscoelastic properties. *Journal of Texture Studies*, 25, 119-137.
- Grinberg, V. ; Grinberg, N. ; Bikbov, T. y Mashkevich, A. (1992). Thermotropic gelation of food proteins. *Food Hydrocolloids*, 6, 69-96.
- Ha, E. y Zemel, M. (2003). Functional properties of whey, whey components, and essential aminoacids: mechanisms underlying health benefits for active people. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14, 251-258.
- Hakkak, R.; Korourian, S.; Shelnutt, S.; Lensing, S.; Ronis, M. y Badger, T. (2000). Diets containing whey proteins or soy proteins isolate protect against 7, 12-

- dimethylbenz (a) anthracene induced mammary tumors in female rats. *Cancer Epidemiology Biomarkers*, 9, 1, 113-117.
- Hambraeus, L. (1982). Developments in dairy chemistry-1. Ed. P. F. Fox. Applied Science Publishers, Essex, England.
- Harwalkar, V. R. y Kalab, M. (1985). Thermal denaturation and agregation of beta lactoglobulin in solution. Electron microscopy study. *Milchwissenschaft*, 40, 2, 65-68.
- Heertje, I. (1993). Structure and function of food products: a review. *Food Structure*, 12, 343-364.
- Jaenicke, R. (1991). Protein folding: Local structures, domains, subunits and assemblies. *Biochemistry*, 30, 3147-3161.
- Jong S.; Klok J.; Van de Velde F. (2009). The mechanism behind microstructure formation in mixed whey protein-polysaccharide cold set gels. *Food Hydrocolloids*, 23, 755-764.
- Jovanovich G.; Campaña L.; Cardós M. y Lupano C. (2003). Correlation between starch damage, alveograph parameters, water absorption and gelatinization. Enthalpy in flours obtained by industrial milling of argentinian wheats. *Journal of Food Technology*, 1, 168-172.
- Ju, Z.; Hettiarachchy, N. y Kilara, A. (1999). Thermal properties of whey protein aggregates. *J. Dairy Sci.*, 82, 1882-1889.
- Kang, I.; Matsumara, Y. y Mori, T. (1991). Characterization of texture and mechanical properties of heat-induced soy protein gels. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 55, 115-123.
- Kasarda, D.; Nimmo, C. y Kohler, G. (1978). Proteins and the aminoacid composition of wheat fractions. En: "Wheat, Chemistry and technology". Pág.

227. Editor: Y. Pomeranz. American Association of cereal Chemists, Inc. St. Paul. Minnesota.

Kent, K.; Harper, W. y Bomser, J. (2003). Effect of whey protein isolate on intracellular glutathione and oxidant induced cell death in human prostatic epithelial cells. *Toxicology in vitro*, 17, 1, 27-33.

Kohnhorst, J. y Mangino, M. (1985). Prediction of the strength of whey protein gels based on composition. *J. Food Sci.*, 50, 1403-1405.

Kramer, S. (1991). Microorganisms in foods, their significance and methods of enumeration. Publicado por: International Commission of Microbiological Specifications for Foods. University of Toronto. Segunda edición, Volumen 1, páginas 3 y 4.

Kulmyrzaev, A.; Byant, C. y McClements, D. (2000). Influence of sucrose on thermal denaturation, gelation, and emulsion stabilization of whey proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1593-1597.

La Grange, V. y Sanders, S. (1988). Honey in Cereal-based New Food Products. *Cereal Foods World*, 33, 10, 833-838.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Larmond, E. (1976). Sensory measurement of food texture. En J.M. de Man, P.W. Voisey, V.F. Rasper, & D.W. Stanley, *Rheology and texture in food quality* (pp. 535-545). Westport, Connecticut: The AVI Publishing Company, Inc., USA.

Lehninger, Nelson, Cox. Principios de bioquímica segunda edición. Páginas 141-142 capítulo 6. Ediciones Omega, Plato 26-08006 Barcelona.

- Letang, C.; Piau, M. y Verdier, C. (1999). Characterization of wheat flour-water doughs. Part I: Rheometry and microstructure. *Journal of Food Engineering*, 41, 121-132.
- Louveaux, J. (1985). Le Mie. *Cah. Nutr. Diet.*, 20, 1, 5-70.
- Lund, D. (1983). Applications of differential scanning calorimetry in foods. En: Physical properties of foods, pp 125-143. Peleg, E. B. Bagley (Eds.), AVI Publishing CO, Westport, Connecticut.
- Lupano, C. (2000 a). Some aspects on gelling properties of whey proteins in acidic conditions. En *Research Advances in Agricultural and Food Chemistry, Vol. 1* (pp. 93-100). Kerala, India: Global Research Network.
- Lupano, C.; Dumay, E. y Cheftel, J. (1992). Gelling properties of whey protein isolate: influence of calcium removal by dialysis or diafiltration at acid or neutral pH. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 27, 615-628.
- Lupano, C.; Renzi, L. y Romera, V. (1996). Gelation of whey protein concentrate in acidic conditions: effect of pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3010-3014.
- Lupano, C. y González, S. (1999). Gelation of whey protein concentrate-cassava starch in acidic conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 918-923.
- Lupano, C. (2000 b). Gelation of mixed systems whey protein concentrate-gluten in acidic conditions. *Food Research International*, 33, 691-696.
- Mabrey, S. y Sturtevant, J. (1978). *Methods Membr. Biol.*, 9, 237.
- Mahaut, M. (1992). Aplicaciones de la ósmosis inversa, ultrafiltración y microfiltración en la industria láctea. *Revista Argentina de Lactología*. Año IV, N° 6, 19-44.

- Manley, D. (2000). Wheat flour and vital wheat gluten. En '*Technology of biscuits, crackers and cookies, 3rd edition*' Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, p. 87 – 135.
- Matsudomi, N., Rector, D. y Kinsella, J. E. (1991). Gelation of bovine serum albumin and β -lactoglobulin: effects of pH, salts and thiol reagents. *Food Chemistry*, 40, 55-69.
- Mayorga, O. (1995). Differential Scanning Calorimetry. Instrumental facts. *Methods in Molecular Biology*, 22, 109-124.
- Mc Intosh, G.; Royle, P.; Le Leu, R.; Regester, G.; Johnson, M.; Grinsted, R.; Kenward, R, y Smithers, G. (1998). Whey proteins as functional foods ingredients?. *International Dairy Journal*, 8: 425-438.
- Mc Intosh, G.; Regester, G.; Le leu, R.; Royle, P. y Smithers, G. (1995). Dairy proteins protect against dimethylhydrazine induced intestinal cancer in rats. *Journal Nutrition*, 125, 4, 809-816.
- McGuire, R. (1992). Reporting of objective color measurements. *HortScience*, 27, 12, 1254-1255.
- Meza, B.; Verdini, R.; Rubiolo A. (2009). Viscoelastic behaviour of heat treated whey protein concentrate suspensions. *Food Hydrocolloids*, 23, 661-666.
- Mleko, S.; Achremowicz, B. and Foegeding E. (1994). Effect of protein concentration on the rheological properties of whey protein concentrate gels. *Milchwissenschaft*, 49, 5, 266-268.
- Morr, C. y Ha, E. (1993) Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 6, 431-476.

- Morris, E. (1999) Food Gels. Páginas 291-359. P. Harris (Ed). Elsevier Applied science London.
- Mulvihill, D. y Kinsella, J. (1988). Gelation of β -lactoglobulin: effect of sodium chloride and calcium chloride on the rheological and structural properties of gels. *J. Food. Sci.*, 53, 231-236.
- Namiki, M. y Hayashi, T. (1983). A new mechanism of the Maillard reaction involving sugar fragmentation and free radical formation. En G.R. Waller, & M.S. Feather. *The Maillard reaction in foods and nutrition* (pp. 21-46). Washington, D.C.: American Chemical Society.
- Nishinari, K.; Kohyama, K.; Zhang, Y.; Kitamura, K.; Sugimoto, T.; Saio, K. y Kawamura, Y. (1991). Rheological study on the A₅ subunit on the gelation characteristics of soybean proteins. *Agricultural Biological. Chemistry*, 54, 1013-1016.
- Parris, N. y Baginsky, M. (1991). A rapid method for the determination of whey protein denaturation. *J. Dairy Sci.*, 73, 45-53.
- Peleg, M. (1979). Characterization of the stress relaxation curves of solid foods. *Journal of Food Science*, 44, 277-281.
- Pereyra González, A.; Bertoni, M.; Grose, G y Cataneo, P. (1994). Composición en ácidos grasos de la fracción lipídica en miel de abeja de producción nacional. *La alimentación latinoamericana* N° 200.
- Piana, G.; Ricciardelli, D. e Isola, A. (1989). La miel. Ediciones Mundi Prensa. Castello 37. 28001. Madrid.
- Pilosof, A., (2003). Reciclando los desechos de la leche. *Industria & Química*. N° 346.

- Pomeranz, Y. Composition and functionality of wheat-flour components. En Y. Pomeranz, *Wheat. Chemistry and technology* (pp.1-2). American Association of cereal Chemists, Inc. St. Paul. Minnesota. 1978.
- Pomeranz, Y. (1978). Composition and functionality of wheat-flour components. En Y. Pomeranz, *Wheat. Chemistry and technology* (pp. 585-674). St. Paul, Minnessota: Am. Assoc. Cereal Chem., Inc.
- Privalov, P. y Khechinashvili, N. (1978). *J. Mol. Biol.*, 122, 447.
- Privalov, P. Y Pothekin S. (1986). *Methods Enzymol.*, 131, 451.
- Puppo, M. y Añon, M. (1998). Effect of pH and protein concentration on rheological behavior of acidic soybean protein gels. *Journal of Agriultural and Food Chemistry*, 46, 3039-3046.
- Quéguiner, C.; Dumay, E.; Cavalier, C. y Cheftel, J. (1989). Reduction of *Streptococcus thermophilus* in a whey protein isolate by low moisture extrusion cooking without loss of functional properties. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 24, 601-612.
- Rabiey, L.; Britten Michel. (2009). Effect of protein composition on the rheological properties of acid-induced whey protein gels. *Food Hydrocolloids*, 23, 973-979.
- Regester, G.; Mc Intosh, G.; Lee, V. y Smithers, G. (1996). Whey proteins as nutritional and functional food ingredients. *Food Australia*, 48, 123-127.
- Ross-Murphy, S. (1991). Physical gelation of synthetic and biological macromolecules. En: *Polymer Gels: Fundamentals and Biomedical Applications*, pp. 21-40. Eds. D. DeRossi, K Kajiwara, Y. Osada and A. Yamanuchi. New york: Planum Press.
- Ross-Murphy, S. (1995). Rheology of biopolymers solutions and gels. En Dickinson, E. (Ed), *New Physicochemical techniques for the characterization of complex*

food systems (Chapter 6) (pp 130-156). Glasgow, U.K: Blackie Academic & Professional.

Rowbottom, D.; Keast, D. y Morton A. (1996). The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. *Sports Medicine*, 21, 2, 80-97.

Ruegg, M.; Moor, U. y Blanc, B. (1977). A calorimetric study of thermal denaturation of whey protein in simulated milk ultrafiltrate. *J. Dairy Res.*, 44, 509.

Salas Llinares, A. (1986). Algunos aspectos farmacéuticos de la miel. *El farmacéutico* N° 22. Madrid. España.

Schramm, G. (1991). A practical approach to rheology and rheometry, Gebrueder Haake, Karlsruhe, Alemania.

Schofield, J. y Both, M. (1983). Wheat proteins and their technological significance. En: "Developments in food proteins". VOL. II. Pág. 1. Editor: B. J. F. Hudson. Applied Science Publishers. London.

Scmidt, R.; Illingworth, B.; Ahmed, E. y Richter, R. (1979). The effect of dialysis on heat induced gelation of whey proteins concentrates. *J. Food. Process. Preserv.*, 2, 111-121.

"Sensory evaluation guide for testing food and beverage products", por el Institute of Food Technologists. *Food Technology*, Noviembre de 1981.

Shewry, P. R.; Popineau, Y.; Lafiandra, D. y Beiton, P. (2001). Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the eurowheat project. *Trends in food Science and Technology*, 11, 433-441.

Shimada, K., and Cheftel, J. (1988). Texture characteristics, protein solubility and sulphhydryl group/disulfide bond contents of heat induced gels of whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 1018-1025.

- Shimada, K., and Cheftel, J. (1989). Sulphydryl group/disulfide bond interchange reactions during heat induced gelation of whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 161-168.
- Silva García M., Cortes S. y Corral J. (1998). Estudio microbiológico de los alimentos elaborados en comedores colectivos de alto riesgo. *Revista española de salud pública*, 72, 67-75.
- Smith, M. y Mc Caugey L. (1996). Identification of some trace lipids in honey. *Food. Res.*, 8, 2, 99-110.
- Sorrivas de Lozano, V. y Morales, A. (1983). Introducción a la microscopía electrónica. Bahía Blanca: CRIBABB.
- Spahn, G.; Santiago, L.; Baeza, R. y Pílosof A. (2006). Viscoelastic and textural characteristics of whey protein concentrate and λ carrageenan mixed systems. *Brazilian journal of food technology*, 3, 23-28.
- Spahn, G.; Santiago, L.; Baeza, R. y Pílosof A. (2008). Whey protein concentrate/ λ carrageenan systems: Effects of processing parameters on the dynamics of gelation and gel properties. *Food Hydrocolloids*, 22, 1504-1512.
- Sperling, L. (1992). Introduction to Physical Polymer Science, 2nd ed. John Wiley & Sons, New York.
- Standing, M.; Langton, M. y Hermansson, A. (1993). Microstructure and rheological behavior of β -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids*, 7, 195-212.
- Standing, M. y Hermansson, A. (1991). Large deformation properties of β -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids*, 5, 339-52.
- Standing, M.; Langton, M. y Hermansson, A. (1992). Inhomogeneous fine-stranded β lactoglobulin gels. *Food Hydrocolloids*, 6, 455-470.

- Steffe, J. (1996). *Rheological methods in food process engineering* (Chapter 5) (pp. 295-349) East Lansing (USA): Freeman Press.
- Tang, Q.; McCarthy, O. y Munro, P. (1995). Effects of pH on whey protein concentrate gel properties: comparisons between small deformation (dynamic) and large deformation (failure) testing. *J. Texture Studies*, 26, 255-272.
- Taylor, S.; Gladden L.; Fryer, P. (1994). Changes in the gelation mechanisms of whey protein concentrate with pH and temperature. *Journal of Dairy Research*, 61, 71-81.
- Thibodeau, L. (2004). Análisis de textura: el camino hacia alimentos de mejor calidad. En *Alimentos y bebidas*, 2, 9-10.
- Tolstoguzov, V. (1991). Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*, 4, 429-468.
- Tolstoguzov, V. (1993). Functional properties of food proteins. Role of interactions in protein systems. En K.D. Schwenke y R. Mothes, *Food proteins. Structure and functionality* pp. (203-209). Weinheim: VHC.
- Townsend, D.; Tew, K. y Tapiero H. (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57, 3, 4, 145-155.
- Van Kleef, F.; Boskamp, J. y Van Den Temple, M. (1978). Denaturation of the number of cross-links in a protein gel from its mechanical and swelling properties. *Biopolymers*, 17, 225-235.
- Verheul, M. y Roefs, S. (1998). Structure of whey protein gels studied by permeability, scanning electron microscopy and rheology. *Food Hydrocolloids*, 12, 17-24.
- Visschers, R. y Jongh, H. (2005). Disulphide bond formation in food protein aggregation and gelation. *Biotechnology Advances*, 23, 75-80.

- Walzem, R.; Dillard, C. y German, J. (2002). Whey Components: Millennia of Evolution Create Functionalities for Mammalian Nutrition: What We Know and What we May Be Overlooking. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 353-375.
- Woychik, J.; Boundy, J. y Dimler R. (1961). Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. *Arch. Biochem. Biophys.*, 94, 477.
- Wu, G.; Fang, Y.; Yang, S.; Lupton, J. y Turner, N. (2004). Glutathione Metabolism and its implications for health. *Journal Nutrition*, 134, 489-492.
- Xiung, Y.L. y Kinsella, J. E. (1990). Mechanisim heat induced whey protein gelation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1887-1891.
- Yamul, D. y Lupano, C. (2003). Properties of Gels from Whey Protein Concentrate and Honey at Different pHs. *Food Research International*, 36, 25-33.
- Yeannes, M. (2002). La evaluación sensorial y los productos pesqueros. Publicado en INFOPECA, Agosto de 2002.
- Yoshida, M.; Kohyama, K. y Nishinari, K. (1992). Gelation properties of soymilk and soybean 11S globulin from japanese-grown soybeans. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 725-728.