



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario

**“INNOVACIÓN EN LA ELABORACIÓN DE
PRODUCTOS LÁCTEOS”**

Micaela Galante

Licenciada en Biotecnología, Universidad Nacional de Rosario.

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Área Físicoquímica, Departamento Química-Física dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2012 y el 20 noviembre de 2015, bajo la dirección de la **Dra. Patricia H. Risso** y la codirección de la **Dra. Valeria Boeris**.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	I
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	VI
PALABRAS PROVENIENTES DEL INGLÉS	IX
RESUMEN	X
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Importancia del tema en estudio	1
1.2 El sistema base en estudio: La leche	3
1.2.1 La composición general de la leche bovina	3
1.2.1.1 Minerales en la leche bovina	4
1.2.1.2 Carbohidratos	5
1.2.1.3 Lípidos	5
1.2.1.4 Vitaminas	6
1.2.1.5 Proteínas.....	7
1.2.1.5.1 Las proteínas del suero lácteo.....	8
1.2.1.5.2 Las caseínas	8
1.2.1.5.2.1 Las micelas de caseína.....	9
1.2.1.5.2.2 Proceso de agregación de las micelas de caseína.....	13
1.2.1.5.2.2.1 Agregación de las micelas de caseína inducida por quimosina	13
1.3 Interacción entre proteínas y polisacáridos	15
1.4 Hidrocoloides.....	17
1.4.1 Clasificación de los hidrocoloides.....	18
1.4.1.1 Galactomananos.....	18
1.4.1.1.1 Goma guar	20
1.4.1.1.2 Goma espina corona.....	20
1.4.1.1.3 Comportamiento reológico de la goma guar y la goma espina corona	22
1.4.2 Uso de hidrocoloides en los productos lácteos	23
1.5 Alimentos funcionales	23
1.5.1 Fortificación de los alimentos	24
1.5.1.1 El zinc	25

1.5.1.1.1 Efecto de la deficiencia en la ingesta de zinc	26
1.5.1.1.2 Toxicidad del zinc	27
1.5.1.1.3 Estrategia de fortificación con sales de zinc.....	27
1.5.2 Extracción del colesterol de los alimentos.....	28
1.5.2.1 Las ciclodextrinas	28
1.5.2.1.1 -ciclodextrina	29
1.5.2.2 Formación de complejos -ciclodextrina/colesterol.....	30
1.5.2.2.1 Uso de -ciclodextrina como estrategia para remover el colesterol de productos lácteos	31
1.5.2.3 Rotulado de los alimentos reducidos/sin colesterol.....	32
1.6 El queso	32
1.6.1 Etapas de la elaboración de queso.....	33
1.6.2 Queso fresco o Cuatirola	35
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS.....	36
2.1 Objetivo general.....	36
2.2 Objetivos específicos.....	36
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.1 Materiales	37
3.1.1 Reactivos utilizados.....	37
3.1.2 Suspensión de proteínas lácteas	37
3.1.3 Soluciones de los polisacáridos.....	38
3.1.4 Enzima proteolítica (quimosina).....	38
3.1.5 Soluciones de sales de iones metálicos.....	38
3.1.6 Solución reguladora (<i>buffer</i>)	38
3.1.7 Otros reactivos.....	38
3.2 Métodos	39
3.2.1 Determinación de la concentración de proteínas: Método de Kuaye.....	39
3.2.2 Evaluación de la interacción proteína - polisacárido.....	39
3.2.2.1 Espectroscopía de fluorescencia nativa	39
3.2.2.2 Hidrofobicidad superficial	40
3.2.2.3 Extinción de la fluorescencia nativa con acrilamida	40
3.2.2.4 Determinación de la carga superficial de las proteínas lácteas	41
3.2.3 Efecto de la adición de los galactomananos sobre el comportamiento reológico de las proteínas lácteas en solución	41

3.2.4 Estudio del proceso de agregación de las micelas de caseína.....	42
3.2.4.1 Determinación de los parámetros de agregación enzimática	44
3.2.4.2 Estudio del efecto de los cosolutos sobre los parámetros de agregación mediante diseño de experimentos	45
3.2.4.2.1 Efecto de los cosolutos goma guar, goma espina corona, calcio y sacarosa.....	45
3.2.4.2.2 Efecto de los iones calcio, magnesio, zinc y sodio	46
3.2.5 Coagulación enzimática de las micelas de caseína: Efecto de los galactomananos.....	49
3.2.5.1 Microestructura de los coágulos	50
3.2.5.1.1 Obtención de imágenes por microscopía confocal	50
3.2.5.1.2 Determinación de tamaño de poro de los coágulos	51
3.2.5.1.3 Determinación de parámetros de textura digital de los coágulos	52
3.2.5.2 Reología de los coágulos. Ensayos mecánicos de textura	53
3.2.5.3 Capacidad de retención de agua de los coágulos.....	54
3.2.6 Extracción de colesterol de cremas base para la elaboración de quesos	55
3.2.6.1 Preparación de las cremas base	55
3.2.6.2 Formación del complejo α -ciclodextrina/colesterol	55
3.2.6.3 Cuantificación del colesterol extraído	56
3.2.6.4 Obtención de la crema base con contenido reducido de colesterol: Uso de diseños experimentales	57
3.2.6.4.1 Fase exploratoria: Diseño Plackett-Burman	57
3.2.6.4.2 Optimización: Diseño Central Compuesto.....	58
3.2.6.4.3 Validación.....	59
3.2.7 Aplicación de las estrategias de extracción del colesterol y de fortificación en la elaboración de un producto lácteo.....	60
3.2.7.1 Desarrollo de un queso fresco tipo Cuartirolo con contenido reducido de colesterol y fortificado con zinc	60
3.2.7.1.1 Preparación de las cremas base con contenido reducido de colesterol	60
3.2.7.1.2 Proceso de elaboración del queso fresco tipo Cuartirolo	60
3.2.7.2 Análisis composicional de los quesos.....	62
3.2.7.2.1 Determinación de la humedad	62
3.2.7.2.2 Determinación de cenizas.....	62
3.2.7.2.3 Determinación del contenido de zinc en los quesos	63

3.2.7.3 Ensayos funcionales de los quesos	63
3.2.7.3.1 Ensayo de capacidad de fusión (derretibilidad) de los quesos	64
3.2.7.3.2 Evaluación del color de los quesos	64
3.2.7.4 Determinación de la firmeza	65
3.2.7.5 Estudio de la microestructura de los quesos por microscopía confocal .	65
3.2.7.6 Análisis sensorial de los quesos	66
3.2.8 Análisis estadístico	68
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
<i>PARTE A: Evaluación de sistemas modelo formados por proteínas lácteas y cosolutos de interés para la industria alimentaria</i>	<i>69</i>
4.1 Estudio comparativo del efecto de la goma guar y de la goma espina corona	69
4.1.1 Evaluación de la interacción proteína - polisacárido.....	69
4.1.1.1 Espectroscopía de fluorescencia nativa	69
4.1.1.2 Hidrofobicidad superficial	70
4.1.1.3 Extinción de la fluorescencia con acrilamida.....	71
4.1.1.4 Carga superficial proteica	71
4.1.2 Evaluación reológica de las mezclas proteínas lácteas-galactomanano	72
4.1.2.1 Comportamiento reológico de las mezclas proteínas lácteas-galactomanano	72
4.1.2.2 Comparación del efecto de los galactomananos sobre la viscosidad de sistemas conteniendo proteínas lácteas	73
4.1.3 Efecto de la adición de los galactomananos sobre los coágulos de caseínas .	74
4.1.3.1 Firmeza de los coágulos	74
4.1.3.2 Microestructura de los coágulos	76
4.1.3.3 Determinación de la capacidad de retención de agua de los coágulos ...	79
4.2 Evaluación de la agregación post enzimática de las caseínas.....	80
4.2.1 Efecto de los cosolutos calcio, sacarosa y goma guar sobre la agregación enzimática de las micelas de caseína	80
4.2.2 Efecto de los cosolutos calcio, sacarosa y goma espina corona sobre la agregación post enzimática de las micelas de caseína	83
4.2.3 Efecto de los iones metálicos calcio, magnesio, zinc y sodio sobre la agregación post enzimática de las micelas de caseína	85
4.3 Optimización del proceso de extracción de colesterol de cremas base utilizando - ciclodextrina	89
4.4 Desarrollo de quesos funcionales.....	93

4.4.1 Análisis composicional de los quesos	93
4.4.1.1 Determinación de la concentración de zinc en los quesos	93
4.4.1.2 Determinación del contenido de cenizas.....	94
4.4.1.3 Determinación del porcentaje de humedad de los quesos.....	94
4.4.2 Propiedades funcionales	95
4.4.2.1 Análisis del color	95
4.4.2.2 Ensayos de derretibilidad	96
4.4.3 Propiedades reológicas: Estudio de penetrometría.....	98
4.4.4 Propiedades microestructurales: Análisis de imágenes	98
4.4.5 Análisis sensorial.....	100
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	103
CAPÍTULO 6: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

a*: Parámetro de color que mide la transición del verde al rojo

Abs: Absorbancia

ANOVA: Análisis de la variancia

ANS: 1-anilino-8-naftalén sulfonato

AOAC: Asociación de Químicos Analíticos

b*: Parámetro de color que mide la transición del azul al amarillo

CAA: Código Alimentario Argentino

CB: Crema base

CB-CRC: Crema base con contenido reducido de Col

CD: Ciclodextrinas

CN: Caseínas

Cit: Citrato

Col: Colesterol

CRA: Capacidad de retención de agua

D_f : Dimensión fractal

E: Entropía

Eea: Esfera de acción

FCC: Fosfato de calcio coloidal

FCM: fosfato de calcio micelar

Gal: D-galactopiranososa

GEC: Goma espina corona

GG: Goma guar

GM: Galactomanano

GMP: Glicomacropéptido

H: Homogeneidad

HC: Hidrocoloides

IB: Índice de blancura

IDR: Ingesta diaria recomendada

IF: Intensidad de fluorescencia

IF_0 : Intensidad de fluorescencia inicial

K: Suavidad

K_D : Constante de extinción de la fluorescencia

L*: Luminosidad
MC: Micelas de caseína
Man: D-manopiranososa
MBQ: Mezcla base para la elaboración de queso
MBQ-CRC: Mezcla base para la elaboración de queso con contenido reducido de Col
MG: Materia grasa
MpC: Micelas de paracaseínas
NaCAS: Caseinato de sodio
p: Probabilidad asociada
Pi: Fosfato
pI: Punto isoelectrónico
PL: Proteínas de la leche
PS: Proteínas del suero
QCRC: Quesos con contenido reducido de Col
QST: Quesos sin tratamiento
QZnCl₂: Quesos con contenido reducido de Col adicionados con ZnCl₂
QZnSO₄: Quesos con contenido reducido de Col adicionados con ZnSO₄
Rea: Radio de la esfera de acción
RU: Unidades de renina
S: Entropía de Shannon
S₀: Hidrofobicidad superficial
Sac: Sacarosa
t_{ag}: Tiempo de agregación
T_{agit}: Temperatura de agitación
t_{agit}: Tiempo de agitación
T_{cent}: Temperatura de centrifugación
t_{cent}: Tiempo de centrifugación
TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano
U: Uniformidad
v_{agit}: Velocidad de agitación
v_{cent}: Velocidad de centrifugación
% -CD: Porcentaje de β-ciclodextrina
%ExtCol: Porcentaje de extracción de Col

%MG: Porcentaje de materia grasa

β : Parámetro beta

β_0 : Parámetro β a tiempo 0

-CD: β -ciclodextrina

γ : Velocidad de corte

: Viscosidad aparente

: Esfuerzo de corte

$\sigma^2(N)$: Variancia

ζ : Potencial electrocinético

PALABRAS PROVENIENTES DEL INGLÉS

Buffer: Solución reguladora

Cluster: Conjunto

Flavor: Sensación olfato-gustativa de un alimento

Plugin: Complemento

Quencher: Agente extintor de la fluorescencia

Quenching: Extinción de la fluorescencia

Salting-in: Proceso de solubilización por adición de una sal al medio

Stacks: Apilamientos

RESUMEN

El objetivo general de este trabajo fue innovar en la elaboración de productos lácteos funcionales. Se estudió la interacción entre diversos cosolutos de interés con las proteínas lácteas (PL), el efecto de éstos sobre los parámetros de agregación de las caseínas y sobre los coágulos obtenidos por adición de cuajo. Se optimizó el proceso de extracción del colesterol (Col) de bases lácteas utilizando a la β -ciclodextrina como agente extractor. Se aplicaron las estrategias de fortificación con Zn^{2+} y de extracción de Col en la elaboración de un queso Cuartirolo, que fue evaluado fisicoquímica, reológica, microestructural, funcional y sensorialmente.

Se determinó que la goma espina corona (GEC) posee un comportamiento comparable a la goma guar (GG), un espesante de referencia, en cuanto a su interacción con las PL y sobre las características microestructurales y texturales que le confieren a los coágulos. Sin embargo, la GEC posee un menor poder espesante que la GG.

Se puso a punto un protocolo de extracción de Col de cremas base para la elaboración de quesos que permitió la extracción de más del 90%, conservando la totalidad de la materia grasa del producto. Fue posible la implementación exitosa del proceso de extracción de Col y de la estrategia de fortificación con sales de Zn^{2+} para la obtención de un queso Cuartirolo funcional.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia del tema en estudio

La industria alimentaria intensifica y diversifica sus líneas de producción utilizando variados ingredientes aptos para conferir valor agregado a los alimentos formulados, tratando de mantener las características organolépticas de los productos tradicionales. No obstante, para desarrollar estos alimentos con la textura adecuada es necesario que sean estabilizados por un complejo arreglo entre los distintos constituyentes alimenticios, entre los que las proteínas y los polisacáridos desempeñan un papel clave debido a sus interacciones y propiedades funcionales. Por lo tanto, el conocimiento de la compleja relación entre los distintos componentes de una formulación alimentaria permitirá controlar y/o monitorear mejor la micro/nano estructura y, consecuentemente, la textura de los alimentos procesados, de manera de formular nuevos productos con características diferenciadas [1-4].

En la elaboración de diversos productos lácteos (quesos untables, yogurt, postres, etc.) se adicionan distintos hidrocoloides (HC), en particular polisacáridos como espesantes y/o gelificantes. La selección de estos HC para la elaboración de los alimentos depende de las características que le otorgue el mismo al producto final, así como también de la seguridad en su consumo y su precio.

En el norte de nuestro país crece un árbol (“coronillo”), de cuyas vainas puede extraerse la goma espina corona (GEC), un polisacárido con características fisicoquímicas semejantes a la goma guar (GG), aditivo ampliamente utilizado en la industria alimentaria. El estudio de este galactomanano (GM) permitiría la eventual incorporación en la industria alimentaria de un producto autóctono no aprovechado hasta el momento, como sustitución de la GG y otros GM importados.

Los productos lácteos son una fuente importante de nutrientes esenciales, en particular de proteínas, péptidos bioactivos, aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas y minerales. Sin embargo, estos productos son fuentes pobres o insuficientes de elementos traza, necesarios para una alimentación saludable. Por lo tanto, los consumidores necesitan obtenerlos a partir de la ingesta de otros alimentos. La fortificación o enriquecimiento de los alimentos con nutrientes esenciales es utilizada desde hace más de 50 años como una forma de prevenir la incidencia de enfermedades, surgidas como consecuencia de deficiencias nutricionales. La selección del alimento apropiado para ser utilizado como vehículo para la fortificación juega un rol crucial. La leche y los alimentos derivados de ésta son buenos candidatos para la incorporación de elementos

traza, no sólo por su alto consumo mundial, sino también por su alto valor nutricional y su efecto regulador de los procesos de digestión y de absorción de los mismos. Otra característica que hace de los productos lácteos una opción adecuada para la fortificación es su pH bajo, que aumenta la solubilización y la biodisponibilidad de iones metálicos como el zinc, calcio y magnesio [5].

Un problema de importancia actual es la hipercolesterolemia que se produce por la incorporación de colesterol (Col) con la dieta, ya que el producido en el hígado alcanza para la mayoría de los requerimientos diarios del organismo. Este exceso promueve enfermedades cardíacas y/o cerebro vasculares. La grasa láctea, que contiene al Col, confiere aroma, sabor y textura (palatabilidad, cremosidad, untuosidad). El descremado de los productos lácteos, con la finalidad de extraer el Col, perjudica notoriamente las características mencionadas, disminuyendo su aceptabilidad y valor comercial [6]. Específicamente en los quesos, la leche de partida debe poseer un porcentaje mínimo del 2% de grasa para que sus características organolépticas principales no se vean afectadas visiblemente, tal que produzcan el rechazo por parte de los consumidores. Por ende, debe evitarse el exceso de Col controlando la dieta, sin cambiar las características organolépticas, texturales y nutricionales de los alimentos ni su aceptación sensorial, determinados por la grasa láctea.

Durante los últimos años se han investigado la estructura y las propiedades de las ciclodextrinas (CD) y sus complejos, los que han tenido diferentes aplicaciones en alimentos, farmacología o biotecnología. La encapsulación molecular de ingredientes alimenticios lipofílicos en CD permite aumentar la solubilidad en agua, la biodisponibilidad y la estabilidad de aromas, vitaminas, colorantes o lípidos, mejorando el valor nutritivo, las características sensoriales y vida útil de diferentes alimentos. Una aplicación interesante es que pueden utilizarse para la separación de componentes no deseados, por ejemplo el Col de productos lácteos [7-10].

El estudio del proceso de coagulación de proteínas lácteas (PL) y de sus productos asociados es de gran importancia para la provincia de Santa Fe y sus zonas de influencia, por ser una de las cuencas lecheras más importantes de Latinoamérica. Debido a las nuevas tendencias del mercado que exigen la incorporación de valor agregado a los productos lácteos sin alterar las características organolépticas de los mismos y al significativo incremento en la demanda de éstos por parte de los consumidores, es de sumo interés para nuestra región el desarrollo de conocimientos que contribuyan al desarrollo de productos con características diferenciadas.

1.2 El sistema base en estudio: La leche

La leche es el fluido secretado por las hembras de todas las especies de mamíferos con el propósito de satisfacer principalmente las necesidades nutricionales del neonato de su especie [11].

La leche bovina es el coloide alimenticio por excelencia. El suero (medio de dispersión) es una solución acuosa de lactosa, pequeños iones y proteínas séricas. Las sustancias disueltas le confieren presión osmótica de ~700 kPa, descenso del punto de congelación de ~-0,54 °C, conductividad eléctrica de ~0,5 S/m, pH de ~6,7, fuerza iónica de ~0,08 M y actividad del agua de ~0,993.

En el suero de la leche están dispersas tres clases de partículas coloidales [12]:

- **Glóbulos de grasa:** De 0,2 a 15 nm de diámetro. Contienen una mezcla de triglicéridos en el interior de un complejo protegido por una membrana de proteínas y fosfolípidos. Los triglicéridos neutros constituyen la mayoría de la grasa láctea.
- **Micelas de caseína (MC):** De 80 a 440 nm de diámetro, aunque se han informado valores menores y mayores que éstos. Son las responsables de la opalescencia característica de la leche descremada. Su principal función es fluidificar las moléculas de caseína (CN) y solubilizar el calcio y el fosfato. Están compuestas por ~2,5% P/P de CN, ~0,2% P/P de sustancias minerales y agua, unidas en una estructura cerrada. Las sustancias minerales incluyen calcio, magnesio, potasio, sodio, fosfato (Pi) y citrato (Cit).
- **Partículas lipoproteicas:** De ~10 nm de diámetro. Contienen lípidos y proteínas (incluyendo enzimas). Presentan una fracción de volumen muy baja ($\sim 10^{-4}$) y son principalmente remanentes de células epiteliales. Son llamadas a veces microsomas de la leche y varían en cantidad, composición y forma.

1.2.1 La composición general de la leche bovina

La composición de la leche determina su calidad nutritiva, su valor como materia prima para fabricar productos alimenticios y muchas de sus propiedades.

La composición aproximada en % P/P de la leche es [12-13] :

- Agua 87,3% (rango de 85,5% - 88,7%)
- Grasa 3,9% (rango de 2,4% - 5,5%)
- Sólidos no grasos 8,8% (rango de 7,9 - 10,0%): proteínas 3,25% (mayoritariamente CN); lactosa 4,6%; minerales 0,65%; ácidos orgánicos 0,18%; enzimas (peroxidasa,

catalasa, fosfatasa, lipasa); gases (oxígeno, nitrógeno); vitaminas (A, C, D, tiamina, riboflavina, otras).

1.2.1.1 Minerales en la leche bovina

Los iones presentes en la leche son en gran parte responsables de su estado fisicoquímico por intervenir en la conformación y estabilidad de las proteínas lácteas. La Tabla 1.1 muestra los minerales más importantes de la leche bovina [14]. Los mismos se encuentran divididos en dos fracciones: los solubles en el suero y los insolubles en éste (unidos a las partículas coloidales). Pequeños cambios en la concentración de las sales presentes en el suero (como consecuencia de la fortificación) podrían afectar el equilibrio y por ende la carga y la reactividad entre las CN [15].

Los elementos que están en la leche en menor concentración, como el zinc, el hierro, el cobre, el molibdeno, el selenio y el magnesio, se encuentran en las enzimas o insertados en las membranas de los glóbulos grasos. A pesar de encontrarse en muy bajas concentraciones, estos elementos resultan de gran importancia para muchas de las características tecnológicas y nutricionales de la leche y de sus derivados [16].

Tabla 1.1: Composición mineral aproximada de la leche bovina

	Concentración (mg/L)		Concentración (mg/L)		Concentración (mg/L)
Calcio	1.200	Zinc	4.000	Silicio	1.500
Magnesio	120	Aluminio	500	Bromo	1.000
Sodio	500	Hierro	400	Boro	200
Potasio	1.500	Cobre	120	Flúor	150
Fosfato	3.000	Manganeso	30	Iodo	50
Cloruro	1.000	Molibdeno	60		
Sulfato	100	Níquel	25		

Los iones monovalentes como el Na^+ , el K^+ y el Cl^- están presentes casi totalmente como iones libres. Los iones multivalentes se encuentran mayoritariamente en forma de complejos [17].

El calcio en la leche se encuentra en diferentes formas, la mayor proporción en estado coloidal y el resto en forma soluble, de la cual una muy pequeña proporción está como ión libre. En el suero puede existir como ión libre hidratado o complejado con Cit, Pi o proteínas séricas. En el estado coloidal puede estar complejado con éster-Pi y con grupos carboxílicos de las MC, con Pi y quizás con Cit asociado a éstas.

El Pi contenido en la leche se encuentra en una fracción muy pequeña como ión libre, en su mayor proporción está unido al Ca^{2+} en fase coloidal formando el denominado “fosfato de calcio coloidal” (FCC) [18]. En condiciones ordinarias, existe en la leche un estado de equilibrio termodinámico entre los iones Ca^{2+} y Pi libres en fase acuosa y los de la fase FCC.

La unión del FCC con las CN da lugar a la formación de lo que se conoce como fosfato de calcio micelar (FCM) [19]. El concepto de FCM tiene en cuenta que la mayor parte del FCC inorgánico está en íntima unión con las proteínas y esto sucede porque las mismas participan en el equilibrio químico tanto de la fase acuosa como de la de FCC [20]. El FCM se puede ver como un *cluster* (conjunto, racimo) hidratado de iones calcio y Pi rodeado por los centros Pi de las CN. Se ha determinado por microscopía electrónica que el diámetro del *cluster* de iones toma un valor de ~2,5 nm. Cálculos realizados en base a estas dimensiones llevan a la conclusión de que aproximadamente cinco cadenas de CN podrían unirse a cada *cluster* [21].

Los cambios en la relación Ca^{2+}/CN pueden modificar las propiedades funcionales de las MC, tales como la viscosidad, solubilidad y estabilidad [22].

1.2.1.2 Carbohidratos

El carbohidrato principal de la leche es la lactosa, que representa entre el 4-6% de la misma. Este azúcar, que se encuentra sólo en la leche, está compuesto por una unidad de glucosa y otra de galactosa unidas entre sí por un enlace glucosídico (1-4). La lactosa es menos dulce que la fructosa, la glucosa o la sacarosa, y es la responsable del aroma característico de la leche. Además de la lactosa, la leche contiene glucosa y otros azúcares simples, así como también oligosacáridos en pequeñas cantidades [14, 17, 23].

1.2.1.3 Lípidos

En la leche, los lípidos se encuentran dispersos en el suero como glóbulos de grasa. El diámetro de éstos varía entre 0,1 y 10 μm , pero la mayoría de los mismos adquiere diámetros que varían de 1 a 5 μm . Durante el proceso de homogeneización mecánica de la leche, el diámetro de estos glóbulos puede resultar menor a 1 μm , dependiendo de la presión que se aplique [14]. Los glóbulos de grasa se encuentran rodeados de una membrana formada por fosfolípidos y proteínas. Esta membrana tiene

una sección transversal de 10-20 nm y actúa como un emulsificante, protegiendo al glóbulo graso de la coalescencia y de la degradación enzimática [24].

Los lípidos de la leche pueden ser divididos en tres grandes categorías [23]:

- **Lípidos neutros:** Son los ésteres de glicerol (mono, di y triglicéridos). Representan ~98% de la composición lipídica total.
- **Lípidos polares:** Son una compleja mezcla de ésteres de ácidos grasos de glicerol y esfingosina que tienen en su composición química fosfatos, compuestos nitrogenados o azúcares. Están presentes en un bajo nivel (~1% de los lípidos totales). Se encuentran en la membrana del glóbulo graso y son muy buenos emulsificantes ya que contribuyen a mantener a los lípidos como unidades discretas.
- **Lípidos varios:** Grupo heterogéneo de compuestos que no están relacionados químicamente entre sí. Este grupo incluye los esteroides, carotenoides y vitaminas solubles en lípidos (A, D, E y K).

En la Tabla 1.2 se muestra el contenido lipídico porcentual de la leche bovina.

Tabla 1.2: Lípidos principales presentes en la leche bovina.

Tipo de lípidos	Porcentaje
Triacilgliceroles	95-96%
Diacilgliceroles	1,3-1,6%
Monoacilgliceroles	0,02-0,04%
Glicéridos cetoácidos	0,9-1,3%
Glicéridos hidroxiaácidos	0,6-0,8%
Ácidos grasos libres	0,1-0,4%
Fosfolípidos	0,8-1,0%
Esfingolípidos	0,06%
Esteroides	0,2-0,4%

El relativamente alto contenido de ácidos grasos de bajo peso molecular es característico de la leche. Los fosfolípidos constituyen un 0,8-1,0% de los lípidos totales, mientras que los esteroides (mayoritariamente el Col) representan un 0,2-0,4% [14]. Debido a que el Col se encuentra en la membrana del glóbulo graso, su concentración en un alimento lácteo está relacionada con su contenido graso [17].

1.2.1.4 Vitaminas

La leche contiene todas las vitaminas pero en cantidades variables. En la Tabla 1.3 se resume el contenido en la leche bovina de cada una de ellas. Durante el procesamiento, las vitaminas liposolubles quedan retenidas en la crema de la leche,

mientras que la fracción soluble en medio acuoso que da retenida en la leche descremada o en el suero [14].

Tabla 1.3: Composición vitamínica de la leche bovina

Vitamina	mg/L	Vitamina	mg/L
A (retinol)	0,4	B12 (cobalamina)	0,005
D (calciferol)	0,001	Nicotinamida	1,0
E (tocoferol)	1,0	Acido pantoténico	3,5
B1 (Tiamina)	0,4	C (acido ascórbico)	20,0
B2 (Riboflavina)	1,7	Biotina	0,03
B6 (Piridoxina)	0,6	Acido fólico	0,05

1.2.1.5 Proteínas

La leche bovina contiene una concentración de 30-36 g/L de proteína total. Las PL pueden ser agrupadas en dos grandes categorías basándose en su solubilidad a pH 4,6 a 20 °C. En estas condiciones uno de los grupos proteicos precipita; esta fracción es conocida con el nombre de CN. Dentro de las CN existen cuatro principales: s_1 -caseínas (s_1 -CN); s_2 -caseínas (s_2 -CN); α -caseínas (α -CN) y β -caseínas (β -CN). Las proteínas que permanecen en solución en las condiciones enunciadas precedentemente son conocidas como las proteínas del suero (PS). La α -lactoglobulina y la β -lactoalbúmina son las principales proteínas del lactosuero. En la Tabla 1.4 se detallan las principales proteínas presentes en la leche bovina [17].

Tanto las CN como las PS son grupos heterogéneos de proteínas que presentan propiedades fisicoquímicas y moleculares diferenciadas, posibilitando así las diferentes aplicaciones funcionales y tecnológicas que son aprovechadas ampliamente por la industria alimentaria [11].

La leche, además, contiene pequeñas proporciones de otras proteínas que se encuentran principalmente en el suero, aunque algunas se localizan en las membranas de los glóbulos de grasa. Estas proteínas incluyen enzimas (~60), inhibidores enzimáticos, metaloproteínas (lactoferrina, osteopontina), vitaminas unidas a proteínas y factores de crecimiento [11].

Tabla 1.4: Concentraciones de las proteínas principales de la leche.

Proteína	Concentración (g/L)	Porcentaje aproximado
Caseínas	24-28	80
α_{s1} -CN	12-15	34
α_{s2} -CN	3-4	8
β -CN	9-11	25
κ -CN	3-4	9
-CN	1-2	4
Proteínas del lactosuero	5-7	20
-lactoglobulina	2-4	9
-lactoalbúmina	1-1,5	4
Proteasas-peptonas	0,6-1,8	4
Proteínas de la sangre		
Albúmina sérica	0,1-0,4	1
Inmunoglobulinas	0,6-1,0	2
Total		100

1.2.1.5.1 Las proteínas del suero lácteo

La fracción de las PS de la leche bovina contiene cuatro tipos de proteínas principales: -lactoglobulina (~50%), -lactoalbúmina (~20%), albúmina sérica (~10%) e inmunoglobulinas (~10%). La -lactoglobulina y la -lactoalbúmina son producidas por la glándula mamaria, mientras que la albúmina sérica y las inmunoglobulinas proceden de la sangre [17].

Las PS poseen un alto nivel de estructura secundaria, terciaria y en la mayoría de los casos, estructura cuaternaria. Son típicamente proteínas globulares que se desnaturalizan completamente por calentamiento a 90 °C por 10 min. No se encuentran fosforiladas y son insensibles a la presencia de Ca^{2+} , además todas las PS contienen uniones intermoleculares puentes disulfuro que estabilizan su estructura [11].

1.2.1.5.2 Las caseínas

Las CN son una familia de fosfoproteínas que constituyen el mayor componente proteico de la leche (~ 80%), las cuales se originan en las glándulas mamarias. Las CN se dividen en dos grupos: las que son sensibles al calcio y son precipitadas a determinadas concentraciones del catión, y las que no. Estas últimas previenen la precipitación por agregado del ión calcio de las CN sensibles a éste. De los cuatros tipos de CN principales (α_{s1} -CN; α_{s2} -CN; β -CN y κ -CN), sólo la κ -CN no es sensible al Ca^{2+} , mientras que los otros 3 tipos lo son [25]. Las CN se encuentran

fosforiladas, es decir que tienen en común ser proteínas conjugadas con al menos un grupo Pi esterificado mediante enlaces éster-fosfato a residuos de serina y, ocasionalmente, a treonina; propiedad que ninguna de las PS posee [26].

Ninguno de los cuatro tipos de CN tiene una estructura secundaria muy organizada, sólo α -hélices y láminas β de longitudes cortas. Sus grupos ionizables son accesibles a la titulación y las otras cadenas laterales son reactivas, y ni la reactividad de tales grupos ni la rotación óptica aumentan en presencia de agentes desnaturizantes o bajo el efecto del calentamiento; por lo tanto su conformación se parece mucho a la de las proteínas globulares desnaturizadas. El gran número y la distribución uniforme de los restos de prolina ayudan a evitar una conformación secundaria empaquetada y ordenada.

Las CN son notablemente estables ya que soportan altas velocidades de centrifugación (homogenización), altas temperaturas (pasteurización) y tienen facilidad para redispersarse después de la deshidratación de la leche a polvo o gránulos. Su estabilidad está relacionada con la repulsión electrostática que tiene lugar entre las cargas iguales de las CN y se ve reflejada en el hecho de que pueden ser agregadas al pH del punto isoeléctrico ($pI = 4,6$) y de que la velocidad de agregación a pH neutro es sensible a la concentración de Ca^{2+} [27].

Todas las CN tienen una pronunciada tendencia a asociarse, en general tienden a autoasociarse en las condiciones de pH y fuerza iónica de la leche, aunque presentan ciertas diferencias frente a los niveles de Ca^{2+} y a la temperatura del medio. Forman complejos tanto en presencia como en ausencia del catión [28].

1.2.1.5.2.1 Las micelas de caseína

Los distintos tipos de CN se ensamblan entre sí para dar origen a las MC. Las mismas tienen una estructura bastante porosa, ocupando 6-12% de la fracción del volumen total de la leche.

El mecanismo por el cual se ensamblan es tema de debate ya que se han propuesto varios modelos a lo largo de estos últimos 40 años, en base a estudios fisicoquímicos de la agregación y de la microscopía electrónica de las MC (Figura 1.1).

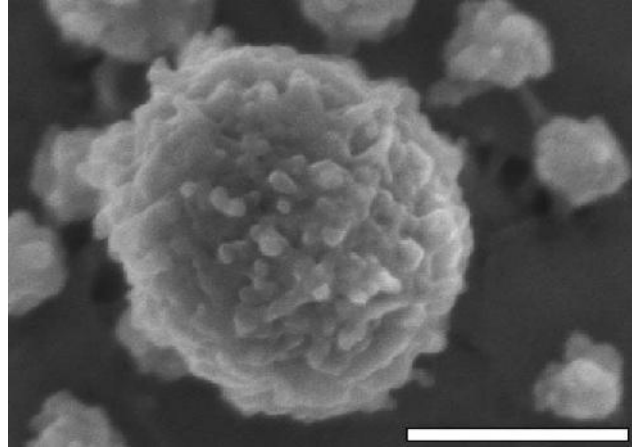


Figura 1.1: Micrografía electrónica de una MC individual obtenida mediante microscopía de barrido electrónico [29]. La barra de referencia es de 200 nm.

Un modelo aceptable para la estructura de las MC debería poder explicar las siguientes observaciones que se han hecho respecto de sus propiedades [12]:

- 1- Coagulación enzimática iniciada por la adición de quimosina
- 2- El contenido de calcio y fósforo de la leche es mucho más alto que la solubilidad del fosfato de calcio a pH 6,7. Gran parte de este fosfato se encuentra en un estado coloidal insoluble (FCC) y es precipitado junto con las MC por centrifugación a alta velocidad.
- 3- Las MC están altamente solvatadas y contienen aproximadamente 3,7 g de agua por gramo de proteína.
- 4- Las partículas tienen tamaños muy diferentes pero son estables a la agregación.
- 5- El FCC es esencial para la estabilidad de las MC.
- 6- La formación de las MC requiere de la presencia de Ca^{2+} en concentraciones más altas que las necesarias para precipitar a la $\alpha_{\text{S1}}\text{-CN}$.
- 7- La disociación micelar por remoción del Ca^{2+} da lugar a unidades complejas con una masa molecular relativa de $3 \cdot 10^5$ Da.
- 8- La $\kappa\text{-CN}$ estabiliza a las otras CN frente a la precipitación por Ca^{2+} .
- 9- El interior de la partícula es accesible a enzimas.
- 10- La degradación enzimática de la $\kappa\text{-CN}$ inicia la desestabilización de todas las fracciones de CN.
- 11- Las leches que contienen relativamente más $\kappa\text{-CN}$ tienen MC con diámetros promedio menores que aquellas con menos $\kappa\text{-CN}$.

12- Si las MC son desarmadas y luego reconstituidas, la distribución de tamaño micelar final es muy similar a la correspondiente a las micelas iniciales. Esta propiedad se conoce como “memoria”.

13- La adición de κ -CN extra a una suspensión de MC resulta en una disminución de su diámetro micelar promedio.

14- A bajas temperaturas, algo de β -CN se desprende de la micela y queda en solución. Cuando la temperatura se incrementa, la β -CN retorna a la estructura micelar.

Los modelos propuestos hasta hoy sólo pueden explicar algunas de estas evidencias experimentales. Entre los modelos más destacados podemos mencionar el modelo de subunidades y el modelo de estructura interna [25], esquematizados en las Figuras 1.2 A y B.

El modelo de subunidades propone que las MC están formadas por subunidades llamadas submicelas [30]. Se han propuesto dos tipos distintos de submicelas: una que consiste en α -CN y β -CN y la otra que consiste en α -CN y κ -CN. Estas submicelas se encontrarían unidas entre sí por medio de *clusters* de FCC, para dar lugar a las MC. Aquellas submicelas que contienen κ -CN, permanecerían preferentemente en la superficie de la MC, permitiendo que la cadena carboxilo terminal hidrofílica de las κ -CN se extienda hacia el medio desde la superficie, a modo de “pelos”, previniendo de esta manera la agregación de las mismas o el crecimiento del tamaño micelar (Figura 1.2 A). De esta manera las MC quedan estabilizadas en suspensión acuosa. A pesar de que el modelo submicelar puede explicar razonablemente distintas características de la estructura y del comportamiento de las MC, hay algunas observaciones que no concuerdan con este modelo. Entre las discrepancias se encuentra la evidencia (obtenida por microscopia electrónica) de una estructura interna no homogénea, la organización de las CN en estructuras tubulares que protruyen de la superficie de las MC y la no evidencia de subunidades esféricas [25].

Esto llevó a Holt (1992) a proponer el modelo de estructura interna, en el cual *clusters* de FCC forman un centro de anclaje desde el cual las MC crecen dando lugar a una red de CN que forma una estructura parecida a un gel (Figura 1.2 B). También en este modelo la región carboxilo terminal de las κ -CN se extiende por fuera de la estructura para dar lugar a una “capa peluda” que le provee estabilización electrostática y estérica a las MC en suspensión acuosa [31].

Ambos modelos coinciden en que la presencia de la κ -CN en el exterior de las MC delimita su tamaño y su estabilidad coloidal.

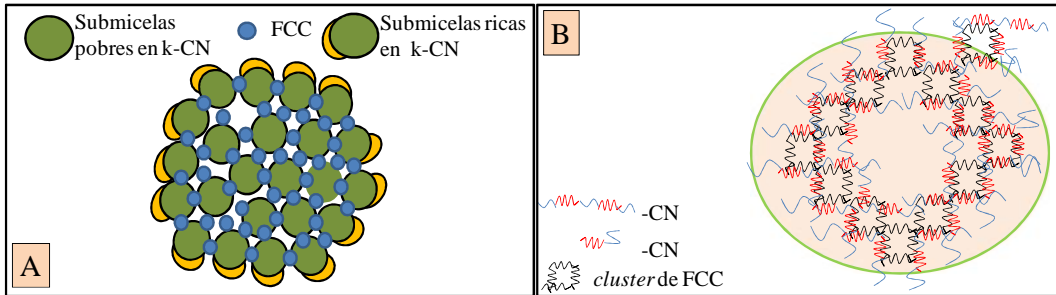


Figura 1.2: Representación esquemática de los dos modelos propuestos de la estructura de las MC. A) Modelo de subunidades. B) Modelo de estructura interna.

El modelo más reciente fue propuesto por Horne y es conocido con el nombre de “*dual-binding*”. En éste, las CN se unirían a través de sus regiones hidrofóbicas dando lugar a agregados y, a su vez, éstos se unirían entre sí por medio de los *clusters* de FCC. Las κ -CN actuarían delimitando el tamaño de la MC, ya que solo puede unirse hidrofóticamente a otras CN al sólo poseer un residuo de fosfoserina para fijar Ca^{2+} . La Figura 1.3 muestra una representación del modelo propuesto por Horne [32].

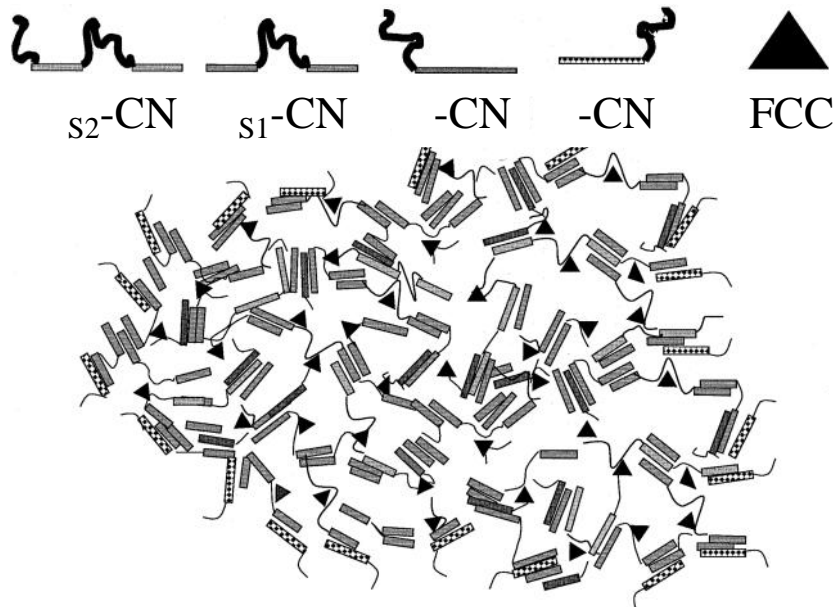


Figura 1.3: Modelo de la estructura de las MC propuesto por Horne.

1.2.1.5.2.2 Proceso de agregación de las micelas de caseína

Aunque las partículas de CN son altamente estables, las mismas agregan por diferentes motivos:

a) *Adición de quimosina u otras enzimas proteolíticas*: La quimosina contenida en el cuajo bovino es la enzima utilizada con mayor frecuencia en la fabricación de quesos, ya que escinde específicamente a la κ -CN [33].

b) *Acidificación*: Las proteínas se desestabilizan por disminución de su carga eléctrica hasta alcanzar el pI. Las proteínas precipitan y la agregación ocurre como resultado de interacciones hidrofóbicas, entrópicamente conducidas [34].

c) *Calentamiento*: A temperaturas por encima del punto de ebullición ($T > 140\text{ °C}$) las CN pueden ser precipitadas, con liberación de protones, y agregar irreversiblemente [35].

d) *Gelación al envejecer*: Este fenómeno de agregación afecta productos lácteos estables al almacenamiento y esterilizados, tales como alimentos concentrados y sometidos a tratamientos a altas temperaturas. Luego de un tiempo de estacionamiento, estos productos sufren un incremento repentino de viscosidad acompañado por una visible gelificación e irreversible agregación. No se conoce exactamente la causa ni el mecanismo de este proceso, pero se supone que podría deberse a proteólisis de las CN por enzimas bacterianas o nativas resistentes a los tratamientos térmicos o a la formación de complejos entre las CN y las PS [36].

1.2.1.5.2.2.1 Agregación de las micelas de caseína inducida por quimosina

Para la elaboración de quesos, se suele adicionar a la leche un preparado enzimático (cuajo). El cuajo contiene a la enzima quimosina, la cual cliva específicamente a la κ -CN en el enlace Phe-Met (105-106), liberando un glicomacropéptido (GMP) hidrofílico. Debido a esto, las MC pierden su estabilidad electrostática y estérica, quedando como micelas de paracaseína (MpC), que flocculan espontáneamente [31].

La coagulación enzimática de la leche inducida por el agregado de cuajo es un proceso de tres etapas, en donde, en una primera etapa, las MC en suspensión son desestabilizadas por hidrólisis de las κ -CN, como se mencionara en el párrafo anterior. En una segunda etapa (post-enzimática), las MpC ya desestabilizadas agregan espontáneamente debido a distintos tipos de interacciones: atracciones de van der

Waals, puentes salinos, enlaces hidrofóbicos y puentes de FCC. Esta etapa es considerada como la etapa limitante de la agregación [37]. Una vez que todas las MC han flocculado, se forma un gel tridimensional que termina en la formación de un gel irreversible o coágulo, que finalmente se retrae expulsando líquido: esta última etapa es conocida como sinéresis [33]. En la Figura 1.4 se muestra una representación esquemática de las dos primeras etapas del proceso de coagulación por adición de cuajo [16].

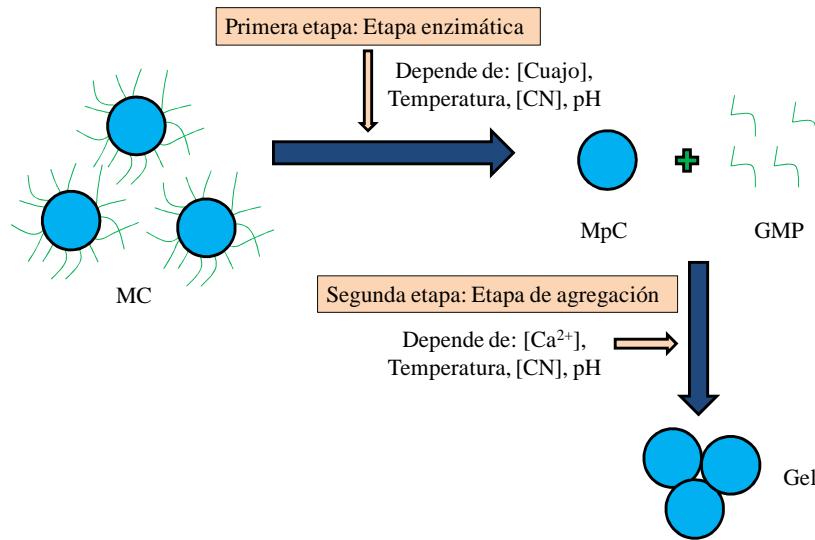


Figura 1.4: Representación esquemática de las dos primeras etapas del proceso de coagulación enzimática de la leche inducida por la adición de cuajo.

La estabilidad que tienen las MC en la leche es atribuida a la carga negativa superficial que éstas poseen, debido a los residuos de ácido aspártico y glutámico de la “capa peluda”, y que provoca la repulsión electrostática de las mismas. Por otra parte, esta “capa peluda” genera una estabilidad estérica por efecto entrópico y osmótico. Cuando por acción enzimática de la quimosina se libera el GMP de la superficie micelar, se produce una disminución del potencial superficial (potencial zeta) de las mismas, por lo que disminuye la magnitud de la fuerza de repulsión electrostática y estérica de las MpC, causando la pérdida de su estabilidad coloidal. Las MpC desestabilizadas agregan sólo en presencia de Ca^{2+} libre. La remoción del GMP (“pelos”) resulta, además, en una disminución de $\sim 5\text{nm}$ en el diámetro hidrodinámico de las MC [16].

El cuajo actúa sobre las CN a temperaturas tan bajas como 0 °C, sin embargo la leche no coagula a temperaturas que estén por debajo de los 18 °C, por el contrario la coagulación se da a una velocidad muy rápida a altas temperaturas (~55 °C) [16].

La coagulación de las MC no ocurre hasta que la etapa enzimática está completa en una cierta proporción, cuyo valor varía según diversos autores (60-87%). Las MpC forman inicialmente cadenas lineales que a su vez agregan entre sí, formando racimos que eventualmente van conformando un sistema de red. Se observa poca agregación de las MpC a temperaturas 15 °C, este hecho pone en evidencia la importancia de las interacciones hidrofóbicas en el proceso de agregación. Además, ocurre poca agregación de las MpC cuando el Ca²⁺ presente en el medio se encuentra por debajo de una concentración mínima, sugiriendo que este ion participa neutralizando la carga de las MpC o uniéndose a sitios específicos de éstas, favoreciendo así su agregación [38].

El proceso de sinéresis es causado por el reordenamiento de la red proteica de CN, luego del proceso de formación de la malla o red de gel (coágulo). Este reordenamiento se ve incrementado o acelerado a altas temperaturas y bajos valores de pH del medio [38]. El reordenamiento de las partículas de CN en estructuras más compactas incrementaría el número de uniones y, por lo tanto, disminuiría el valor de la energía del sistema. En la elaboración de queso, los procesos de lirado, agitación, acidificación y el incremento de la temperatura del medio durante la cocción de la masa, favorecen el proceso de reordenamiento de la red proteica y, por lo tanto, la sinéresis [39].

La coagulación enzimática de las MC es la base para la elaboración de los quesos y de otros productos lácteos fermentados, si bien suelen utilizarse diferentes estrategias de desestabilización de las MC como el uso de cuajo u otras enzimas proteolíticas, la acidificación del medio, el calentamiento y la combinación de estos métodos.

1.3 Interacción entre proteínas y polisacáridos

La interacción entre biopolímeros es de vital importancia para las propiedades macroscópicas de los productos alimentarios tales como la fluidez, la estabilidad, la textura y la consistencia. Los polisacáridos suelen adicionarse a los alimentos como estabilizantes, gelificantes, emulsificantes y espesantes [40].

Cuando se mezclan proteínas con polisacáridos en solución se pueden presentar cuatro situaciones distintas (Figura 1.5) [41]:

•**Cosolubilidad:** ambos biopolímeros permanecen en solución. Se genera una sola fase en la que no se encontrarían interaccionando entre sí o bien se encontrarían formando complejos solubles en medio acuoso.

•**Incompatibilidad termodinámica:** ocurre en sistemas en donde dos tipos de macromoléculas se repelen entre sí y, como consecuencia, la interacción entre ambos es segregativa. Se forman dos fases acuosas, cada una de las cuales es rica en uno de los dos biopolímeros.

•**Floculación por depleción:** ocurre una separación de fases de una suspensión de partículas promovida por la adición de un biopolímero que no interacciona con las mismas.

•**Asociación (formación de complejos):** ocurre cuando ambos biopolímeros se atraen electrostática o hidrofóbicamente entre sí formando complejos, dando lugar a sistemas de dos fases, una de las cuales es rica en ambos biopolímeros y la otra está muy diluida.

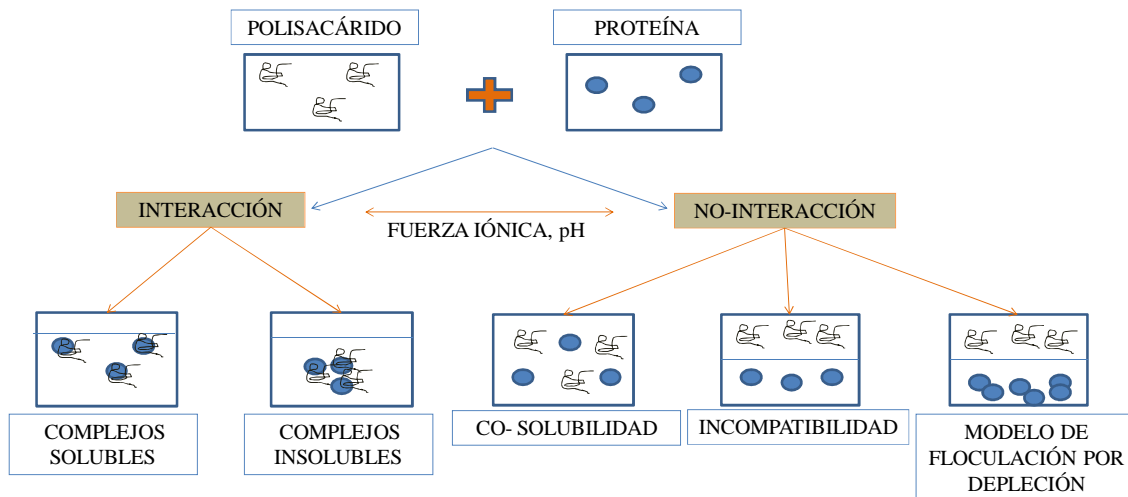


Figura 1.5: Esquema de las distintas interacciones que pueden tener las proteínas y los polisacáridos.

La cosolubilidad ocurre generalmente a concentraciones bajas de ambos biopolímeros, mientras que el caso de la incompatibilidad y la formación de complejos ocurre a concentraciones mayores de ambos, dependiendo de si la naturaleza de la interacción entre éstos es repulsiva o atractiva, respectivamente [42].

1.4 Hidrocoloides

Los HC son un grupo de polímeros con solubilidad total o parcial en agua, que cambian sus propiedades físicas en solución para dar lugar a la formación de geles o para actuar como espesantes, emulsificantes o estabilizantes. Los HC en agua forman una dispersión coloidal. La razón principal para el uso de HC en la industria alimentaria es su propiedad de unirse a moléculas de agua y de modificar los componentes de los alimentos, modificando así las características reológicas de los mismos y por ende su percepción sensorial [43].

Los HC son un grupo heterogéneo de polisacáridos, siendo la gelatina la única excepción ya que es la única proteína que entra dentro de esta denominación debido a sus propiedades hidrófilas [42]. Otras proteínas como las PS, a pesar de exhibir propiedades de agregación y gelación no entran en la denominación de HC.

Un término comúnmente usado para referirse a algunos HC es el de “goma”. En 1963, Glicksman definió como goma a cualquier polímero que pudiera dispersarse en agua para dar lugar a una dispersión viscosa [44-45]. En la Tabla 1.5 se listan algunos de los HC más utilizados y sus respectivas aplicaciones en los alimentos.

Tabla 1.5: Origen y aplicaciones de los HC más utilizados en la industria [46].

Nombre	Fuente	Aplicación
Goma guar	Semillas de <i>Cymopsis tetragonolobus</i>	Espesante y estabilizante para helados, salsas y lácteos
Goma garrofín	Obtenido de <i>Ceratonia siliqua</i> de la familia leguminosae	Estabilizante de emulsiones, espesante de helados y lácteos, encapsulante
Goma arábica	Exudado de <i>Acacia Senegal</i> y otras especies de la familia leguminosae	Estabilizante de emulsiones y encapsulante
Goma tragacanto / Goma basorín	Exudado de <i>Astragalusgummifer</i> y otras especies asiáticas de <i>Astragalus</i> de la familia leguminosae	Estabilizante de emulsiones y espesante
Agar	Algas marinas del género <i>Gelidium</i>	Gelificante para dulces, masas y carnes
Carragenina	Algas rojas de la familia <i>Rhodophyceae</i>	Gelificante para lácteos. Espesante y estabilizante en salsas y sopas
Alginato	Algas marrones como <i>Laminaria digitata</i>	Gelificante en lácteos, estabilizante y espesante
Goma karaya	Exudado de <i>Sterculia urens</i>	Espesante de lácteos, estabilizante de emulsiones
Goma xantana	Producto de la fermentación de la glucosa por <i>Xanthomonas campestris</i>	Estabilizante y espesante. Muy usada en salsas para ensaladas

1.4.1 Clasificación de los hidrocoloides

Tradicionalmente los HC fueron clasificados como polisacáridos y fueron agrupados de acuerdo con su fuente de origen:

- Obtenidas a partir de plantas: goma karaya, goma tragacanto, goma arábica.
- Obtenidas a partir de algas: agar, alginato, carragenina.
- Obtenidas a partir de plantas: pectina.
- Obtenidas a partir de animales: quitosano.

Sin embargo esta clasificación deja excluidos a los polisacáridos de origen sintético, que conformarían otro grupo distinto. Una clasificación más inclusiva de los HC los divide en solo tres categorías [44]:

- Naturales: todas aquellas encontradas en la naturaleza.
- Modificados o semisintéticos: basados en modificaciones químicas de los HC naturales.
- Sintéticos: obtenidos mediante síntesis química.

Otra forma de clasificar a los HC es por su estructura química, por ejemplo, la goma guar (GG), la goma tara y la goma garrofín derivan de semillas de plantas similares y pertenecen al grupo conocido como galactomananos (GM). Notablemente, éstos pueden ser usados con propósitos similares.

Adicionalmente, se puede agrupar a los HC en iónicos y no iónicos. Dentro del primer grupo se puede encontrar a la carragenina, goma arábica y goma karaya; dentro del segundo grupo se puede mencionar a la goma xantana, GG y goma garrofín.

1.4.1.1 Galactomananos

Las semillas de numerosas leguminosas poseen GM, es decir, heteropolisacáridos compuestos por residuos de D-galactopiranososa (Gal) y D-manopiranososa (Man). De acuerdo con Aspinall, los GM son aquellos mananos que contienen más de un 5% de galactosa [47]. Generalmente, se localizan en el tejido endospermo, dentro de los cuales sirven como reserva energética y actúan como reguladores del balance hídrico de la semilla durante la germinación. En raras ocasiones se encuentran en la cáscara, del lado interno de la cubierta de la semilla o en el grano. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se han encontrado GM en algunas semillas de plantas no leguminosas, en levaduras [48] y en hongos [48-49].

Generalmente, los GM poseen una cadena principal de subunidades de Man unidas mediante enlaces (1,4), sustituidas por ramificaciones de unidades de Gal, mediante enlaces glicosídicos (1,6). Dicha estructura puede visualizarse en la Figura 1.6.

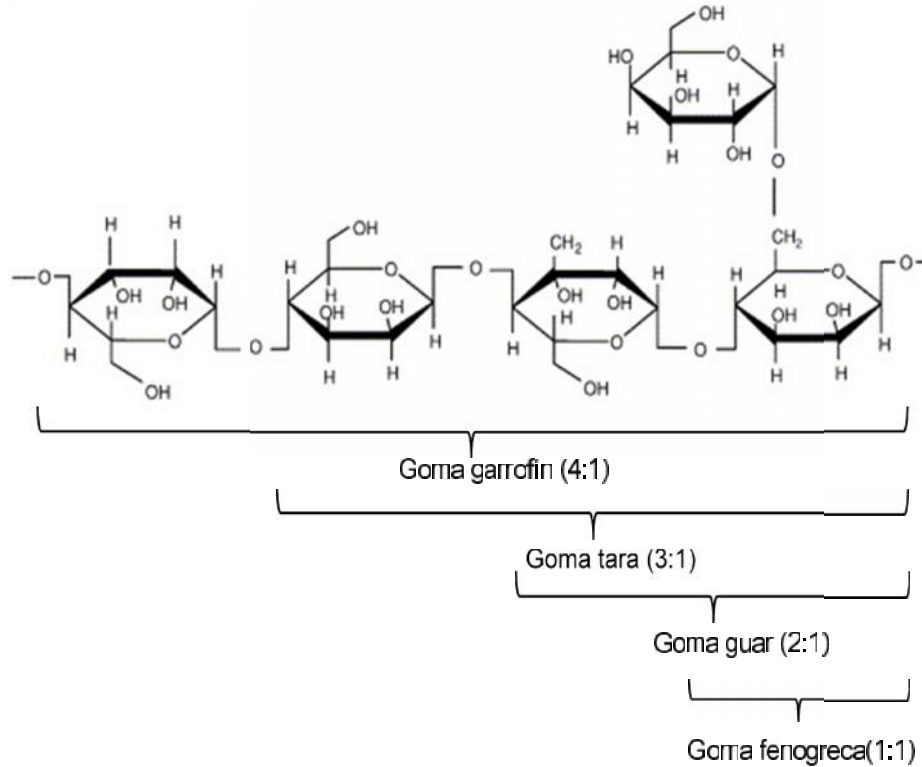


Figura 1.6: Estructura de GM clásicos ilustrando su relación Man/Gal.

La relación Man/Gal varía dependiendo del GM, resultando en cambios en su estructura y propiedades fisicoquímicas, lo cual, a su vez, determina sus aplicaciones industriales.

Se han encontrado numerosos usos para estos polisacáridos debido a sus propiedades fisicoquímicas y biológicas únicas, como lo es la formación de soluciones acuosas viscosas o geles. La importancia de estos materiales se ha incrementado enormemente por la tendencia global de emplear productos derivados de plantas y por ser amigables con el medio ambiente. Su producción no genera contaminación, ni perturba el ecosistema. A su vez, estos productos son económicos [50]. Por estos motivos, entre otros, son ampliamente utilizados como espesantes en alimentos, se utilizan en la industria farmacéutica y son importantes en la industria textil, papelera, y cosmética [51].

1.4.1.1.1 Goma guar

La GG es un GM oriundo de India y Pakistán, que posee una razón Man:Gal de 2:1 y un peso molecular de 1.810 kDa [50, 52]. Es un heteropolisacárido que consiste en una cadena lineal de residuos de (1,4)-D-manopiranosil asociado a grupos (1,6)-D-galactopiranosil [53]. Este polisacárido funciona como reserva nutricional de las semillas de *Cyamopsis tetragonoloba*, una planta de la familia de las leguminosas. Como se muestra en la Figura 1.7, la fibra purificada de GG es un polvo blanco e insípido que forma un gel viscoso cuando se mezcla con agua. Al igual que otras fibras, no puede ser digerida en el intestino delgado de los mamíferos, donde tiende a formar soluciones viscosas con el agua ingerida y las secreciones digestivas, pero es rápidamente metabolizada a ácidos grasos de cadena corta por las bacterias del colon. Según el capítulo 18, artículo 1.398 del Código Alimentario Argentino (CAA), la GG tiene propiedad estabilizante, espesante y emulsificante. Se utiliza principalmente para dar textura a los alimentos y se emplea como estabilizante de helados y espumas y en productos que deben someterse a tratamientos de esterilización a alta temperatura. No se conocen efectos adversos en su utilización como aditivo. Además, suele emplearse en la industria del papel, textil, cerámica, pinturas, cosmética, farmacéutica y explosiva.



Figura 1.7: Imágenes de A) fuente natural de la GG, *Cyamopsis tetragonoloba*, B) vainas y semillas de las cuales se extrae la GG y C) muestra de GG purificada.

1.4.1.1.2 Goma espina corona

La goma espina corona (GEC) es un GM extraído de las semillas de la planta conocida como “espina corona” o “coronillo” (*Gleditsia amorphoides*), un árbol oleaginoso nativo de América Latina, que crece en los bosques del noroeste argentino, abarcando las provincias de Chaco, Formosa, Corrientes, Misiones, Entre Ríos, norte de Santa Fe, Salta y Jujuy, extendiéndose a regiones adyacentes de Bolivia, Paraguay, Brasil y Uruguay. Es una especie que llega a una altura de 12-15 m y 30-60 cm de diámetro, cuyo tronco y ramas presentan numerosas espinas rojizas, ramificadas y de

gran desarrollo. Sus frutos son legumbres de 6 a 8 cm de largo, generalmente falcada, rígida, negruzca, de 2 a 3 cm de ancho, que contienen entre 6 y 10 semillas, de color oliváceo a canela y de forma oblongas-ovoides (Figura 1.8). La composición química de la GEC fue postulada por Cerezo en el año 1965, como una estructura de GM compuesta por 71,1%P/P de Man y 28,6%P/P de Gal con un peso molecular de 1.390 kDa. Las Man se encuentran formando una cadena lineal de 1,4- -manopiranosas con una molécula de D-galactopiranososa unida a la posición 6 de las Man, cada 3 unidades de Man. Esta relación 3:1 es muy similar a la de otros GM bien conocidos como la GG [54].

De acuerdo a la descripción del CAA, en su Artículo N° 1.368, inciso N° 73, la GEC es un "polvo blanco ligeramente amarillento, que gelifica fácilmente en agua caliente, formado por GM". Se obtiene por molienda de los endospermos (libre de germen y de cáscara o tegumento) de la semilla del árbol *Gleditsia amorphoides*. Se califica como espesante y estabilizante. Puede emplearse en dulces, jaleas y helados como espesante e inhibidor de la cristalización del azúcar y en fiambres y productos cárnicos como espesante y texturizante.



Figura 1.8: Imágenes de A) árbol coronillo, *Gleditsia amorphoides*; B) vainas con las semillas de donde se extrae la GEC; C) muestra de GEC purificada.

El proceso de extracción de la GEC utilizada en el presente trabajo de tesis, llevado a cabo por la empresa Idea supply Argentina S.A, comienza con un procesamiento primario que consiste en separar la semilla del resto de la legumbre (vaina), a través de métodos físicos como la molienda, aspiración y tamizado. Luego, se continúa con la separación del endospermo del resto de la semilla, por procesos termomecánicos. Finalmente, éste se clasifica y muele, en varias etapas de molienda y tamizado, obteniéndose diferentes granulometrías. Para lograr harinas de alta calidad,

las mismas son sometidas a procesos físicos como la disolución, filtrado, secado y molienda.

La explotación de este GM tuvo un amplio desarrollo en el país durante las décadas del 50 y 60 del siglo pasado, discontinuándose posteriormente su producción [55].

El estudio de la interacción GEC/PL es de relevante importancia para proponer nuevas aplicaciones de este polisacárido de América del Sur y para posibilitar un futuro reemplazo de un espesante importado ampliamente utilizado como la GG, por uno autóctono. En los últimos años se han publicado trabajos en donde se investigó la aplicación de este GM autóctono en la obtención de geles mixtos obtenidos por gelificación ácida de aislados de proteínas de suero de leche [55] y en la elaboración de yogures [56].

1.4.1.1.3 Comportamiento reológico de la goma guar y la goma espina corona

La habilidad de los GM para funcionar como agentes espesantes depende del grado de hidratación de los mismos y de la viscosidad aparente () que presentan en solución [57].

En cuanto a su comportamiento reológico, tanto la GG como la GEC presentan un comportamiento Newtoniano a concentraciones bajas. Los fluidos Newtonianos son todos aquellos en los que el esfuerzo () es directamente proporcional a la velocidad de deformación o de corte (). El valor de se mantiene constante al variar . A medida que la concentración de ambos GM se incrementa, se aleja de este comportamiento y comienzan a exhibir un comportamiento pseudoplástico. El comportamiento pseudoplástico se caracteriza por una disminución de la al aumentar . Este comportamiento se debe a que en reposo las partículas se encuentran desordenadas, lo cual origina una gran resistencia al flujo. A medida que aumenta , las partículas se orientan en dirección al flujo, disminuyendo así su resistencia a fluir y así su aparente [54, 58]. En la Figura 1.9 se muestran representaciones gráficas del comportamiento de flujo presentado por soluciones de GG y GEC a una temperatura de 25 °C [54, 58].

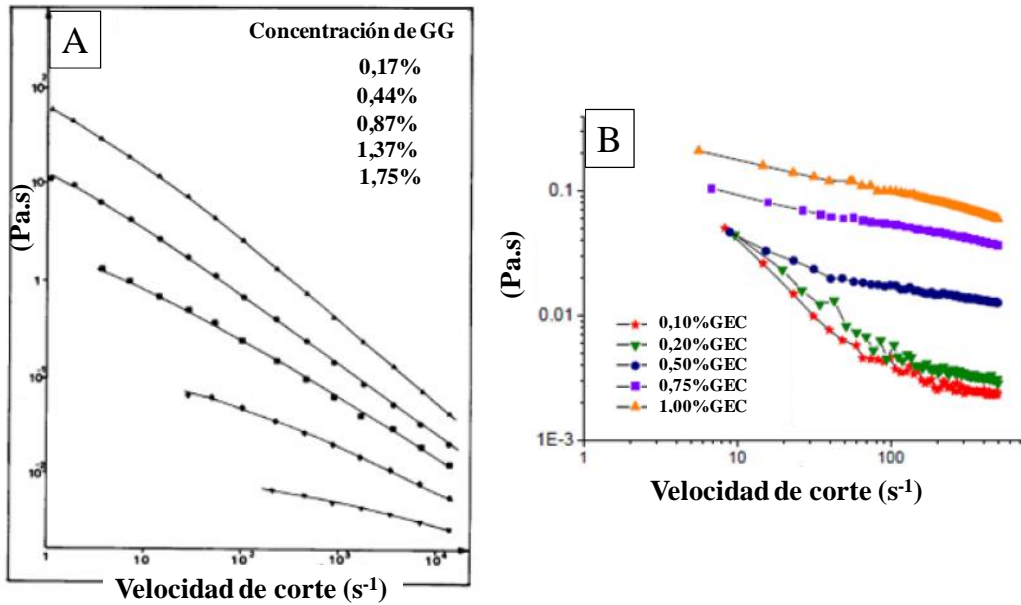


Figura 1.9: Curvas de flujo de soluciones de A) GG y B) GEC a una temperatura de 25 °C.

1.4.2 Uso de hidrocoloides en los productos lácteos

Las gomas tienen una gran influencia en las características estructurales, texturales y organolépticas de los alimentos, a pesar de estar presentes en cantidades menores al 1% de la composición total.

Entre los productos lácteos que emplean algún tipo de HC podemos encontrar a los helados, los yogures y postres lácteos, algunos tipos de quesos y las cremas batidas. En los helados, el contenido de HC varía entre un 0,1-0,35%; su función es aumentar la viscosidad del sistema de forma tal de favorecer la incorporación de aire a la mezcla durante el batido e inhibir el crecimiento de cristales durante la congelación. En los yogures, los HC se utilizan en un rango de concentraciones de 0,2-0,5%, para reducir la sinéresis y favorecer las propiedades reológicas y organolépticas de los mismos. En los quesos, la adición de HC incrementa el rendimiento de la cuajada en la elaboración de los mismos. Para los quesos blandos (>80% de agua) el uso de HC mejora la textura del producto y reduce las pérdidas de agua. El uso de gomas en quesos está permitido sólo para quesos untables [59].

1.5 Alimentos funcionales

En las últimas décadas se ha producido un cambio en el campo de la producción de los alimentos, impulsado por la demanda por parte de los consumidores, al instalarse cada vez más la concepción de que los alimentos tienen un efecto directo sobre la salud.

Por lo tanto, actualmente, no sólo se pretende que los alimentos satisfagan las necesidades nutricionales, sino que también prevengan posibles enfermedades y/o contribuyan en el estado de salud general de sus consumidores.

El término “alimento funcional” hace referencia a alimentos que contienen algún componente o característica que le otorga algún beneficio sobre la salud del consumidor que el alimento tradicional no tiene. Este término fue utilizado por primera vez en Japón en la década del 80 para referirse a los alimentos fortificados. El concepto de alimentos funcionales fue promovido por primera vez en el año 1.984 por científicos japoneses, y en el año 1.991 el Ministerio de Salud de ese país introdujo reglas para la aprobación de nuevos alimentos específicos relacionados a la salud, a los que denominó FOSHU (*Food for Specific Health Uses*). Este interés de los japoneses hacia este tipo de productos se difundió rápidamente por Europa y América por su potencial aplicación en la industria alimentaria. En la Tabla 1.6 se muestran los tipos de alimentos funcionales con algunos ejemplos de su aplicación en la industria alimentaria [60].

Tabla 1.6: Tipos de alimentos funcionales, definición y ejemplos de su aplicación.

Tipo de alimentos funcionales	Explicación de la modificación	Ejemplos
Alimentos fortificados	Fortificados con nutrientes adicionales	Jugos frutales fortificados con vitamina C
Alimentos enriquecidos	Adicionados con nutrientes que no tiene el alimento naturalmente	Margarina enriquecida con esteroles vegetales, probióticos o prebióticos.
Alimentos alterados	Alimentos a los cuales se les remueve en forma total o parcial alguno de sus componentes o se reemplazan por otros con más beneficios.	Reemplazo de grasas por fibras vegetales en helados y carnes
Alimentos potenciados	Alimentos en los que alguno de sus componentes se ha potenciado como consecuencia de la modificación de las condiciones de crecimiento, alimentación o manipulación genética entre otras.	Huevos con mayor contenido de 3, como consecuencia del cambio en la alimentación de las gallinas.

1.5.1 Fortificación de los alimentos

Se conoce como fortificación a la adición de micronutrientes a los alimentos. En muchas situaciones esta estrategia puede llevar a mejoras en el consumo de estos micronutrientes en la población con un costo relativamente bajo. La estrategia de

fortificación es también implementada para restaurar los nutrientes que se perdieron en los alimentos durante los procesos de elaboración de los mismos [61].

Según el artículo 1.363 del CAA, se entiende por alimentos fortificados a aquellos alimentos en los cuales la proporción de proteínas y/o aminoácidos y/o vitaminas y/o sustancias minerales y/o ácidos grasos esenciales es superior a la del contenido natural medio del alimento corriente, por haber sido suplementado significativamente. La porción del alimento fortificado deberá aportar entre un 20% y 50% para vitaminas liposolubles y minerales, y entre un 20% y 100% para vitaminas hidrosolubles de los requerimientos diarios recomendados respectivamente, establecidos por los valores de Ingesta Diaria Recomendada (IDR) de nutrientes vitaminas y minerales, mencionadas en el artículo 1.367. Los valores de IDR se fijan en función de la edad, el sexo, situación fisiológica (embarazo, lactancia, etc.) y normalmente son superiores a los verdaderos requerimientos [62]. En la Tabla 1.7 se muestran los valores de IDR para algunas vitaminas y minerales esenciales.

Tabla 1.7: Valores de IDR reportadas por el CAA para algunas vitaminas y minerales.

Vitaminas	IDR	Minerales	IDR
A	600 µg	Fósforo	700mg
K	65 µg	Magnesio	260 mg
B6	1,3 mg	Calcio	1.000 mg
B12	2,4 µg	Hierro	14 mg
E	10 mg	Zinc	7 mg
C	45 mg	Yodo	130 µg
D	5 µg	Manganeso	2,3 mg

Actualmente, se ha incrementado la demanda de alimentos saludables y nutritivos. Por ello, la industria alimentaria ha aumentado la fortificación de los alimentos, entre otros, con minerales; principalmente con aquellos que no se consumen en cantidades adecuadas con la alimentación. Entre éstos podemos encontrar al Ca^{2+} , al Mg^{2+} y al Zn^{2+} .

1.5.1.1 El zinc

El Zn^{2+} interviene en procesos bioquímicos necesarios para el desarrollo de la vida, entre los cuales se encuentran la respiración celular, la utilización del oxígeno por parte de la célula, la replicación del ADN y la síntesis del ARN. Estos procesos se llevan a cabo a través de una cascada de sistemas enzimáticos, en el que el Zn^{2+} actúa

como cofactor de muchas de las enzimas que forman parte de éstos. Otra de las funciones del Zn^{2+} está relacionada a su rol antioxidante. El mismo no está claro, pero algunos autores sugieren que el Zn^{2+} inhibe la reacción de propagación de los radicales libres [63].

En los mamíferos, la absorción de Zn^{2+} tiene lugar en el intestino a través de dos mecanismos: un transporte activo y otro pasivo. El transporte activo es saturable a altas concentraciones del catión en el lumen intestinal y su eficiencia aumenta en los períodos de baja ingesta. Por otro lado, la eficiencia del transporte pasivo, que se realiza por mecanismos de difusión, es proporcional a la concentración de Zn^{2+} presente en el lumen intestinal. Existen muchos factores que pueden modificar la absorción de Zn^{2+} ; entre los activadores de su absorción se encuentra el ácido picolínico liberado por el páncreas, la vitamina B6 que aumenta la secreción del ácido picolínico, el citrato y los aminoácidos como la glicina, la histidina, la lisina, la cisteína y la metionina; entre los inhibidores se encuentran el ácido oxálico, los taninos, las fibras, el selenio, el calcio y el hierro. Respecto a estos dos últimos, existe una gran controversia en cuanto a su rol como inhibidores, pero parecería que sólo interfieren con la absorción de Zn^{2+} cuando están presentes en concentraciones muy elevadas, que superan a los niveles nutricionales. El Zn^{2+} no absorbido es excretado en las heces [63].

El Zn^{2+} está extensamente distribuido en alimentos y bebidas, pero los contenidos del mismo son en general bajos. Los alimentos más ricos en Zn^{2+} son los productos marinos (ostras y crustáceos), seguidos por las carnes rojas, productos lácteos, huevos y cereales integrales [62].

En la leche de vaca, el Zn^{2+} se encuentra principalmente unido a las CN, sólo una pequeña fracción se encuentra asociada al suero y a la porción grasa [64]. Más específicamente en las MC, dos tercios del Zn^{2+} se encuentra unido al FCC y el otro tercio restante a los residuos fosforilados de serina y treonina [65].

La IDR de Zn^{2+} para un adulto, según el artículo 1.381 CAA, es de 4,9 mg/día para las mujeres, de 7 mg/día para los hombres, y de 10 mg/día y 9,5 mg/día respectivamente para mujeres embarazadas y en períodos de lactancia.

1.5.1.1.1 Efecto de la deficiencia en la ingesta de zinc

Los estados carenciales de Zn^{2+} pueden estar causados por diferentes factores como son: ingesta insuficiente, problemas en la absorción intestinal o pérdidas corporales excesivamente elevadas, así como el padecimiento de determinadas

enfermedades. Dentro de las manifestaciones principales se encuentran la dermatitis, la alopecia, alteraciones en el sentido del gusto, anorexia, retraso en la cicatrización de las heridas, alteraciones inmunológicas y disminución de los niveles de fosfatasa alcalina. También se ha relacionado la pérdida de la homeostasis del Zn^{2+} con la esquizofrenia, el Parkinson, el Alzheimer, la isquemia cerebral transitoria, ataques de apoplejía y daños cerebrales [62].

1.5.1.1.2 Toxicidad del zinc

Los elementos traza esenciales, como muchos otros nutrientes, son beneficiosos cuando son consumidos en cantidades que coinciden con las IDR, pero cuando su consumo supera ciertos niveles, pueden convertirse en tóxicos [66].

El Zn^{2+} es el menos tóxico de todos los oligoelementos debido a que su margen de seguridad, que es la diferencia entre la dosis tóxica y la dosis recomendada, es muy amplio [62]. El nivel más alto de ingesta diaria de Zn^{2+} que no supone un riesgo o efectos adversos sobre la salud, según el artículo 1.381 del CAA, es de 30 mg/día.

1.5.1.1.3 Estrategia de fortificación con sales de zinc

La selección del alimento apropiado para ser utilizado como vehículo para la fortificación juega un rol crucial. La leche y los alimentos derivados de ésta son buenos candidatos para la incorporación de este elemento, no sólo por su alto consumo mundial, sino también por su alto valor nutricional y su efecto regulador de los procesos de digestión y de absorción del mismo. Otra característica que hace de los productos lácteos, como yogures y quesos, una opción apropiada para la fortificación con Zn^{2+} es su pH ácido, que aumenta su solubilización y su biodisponibilidad [61, 67].

En los últimos años se han aplicado diferentes estrategias de fortificación de alimentos con sales de Zn^{2+} , entre las que se pueden mencionar la fortificación de queso Cheddar [68], un tipo de queso blanco de Turquía [69], queso Edam [70] y de leche de búfala [71].

La FAO (*Food and Drug Organization*) clasificó a los minerales que son aptos para ser empleados para la fortificación de alimentos como GRAS (*Generally Recognized as Safe*). Entre el listado de minerales de zinc que integran esta clasificación podemos encontrar a: sulfato, cloruro, gluconato, óxido y estearato [61].

1.5.2 Extracción del colesterol de los alimentos

Las industrias han desarrollado varias estrategias para reducir el contenido de Col de los alimentos usando métodos físicos, químicos y biológicos. Algunos ejemplos son la extracción con aceites vegetales [6] o solventes orgánicos [72], adsorción con saponina y digitonina para formar complejos con el Col [73], degradación de Col por colesterol oxidasas [74] y remoción por uso de dióxido de carbono supercrítico [75]. Sin embargo, la mayoría de estos métodos son relativamente no selectivos y remueven componentes nutricionales y *flavors* junto con el Col, además de tener costos operativos elevados.

Durante los últimos años se ha investigado la estructura y las propiedades de las CD y sus complejos y se han encontrado diferentes aplicaciones en alimentos, farmacología o biotecnología. Entre ellas, la encapsulación molecular de ingredientes alimenticios lipofílicos permite aumentar la solubilidad en agua, la biodisponibilidad y la estabilidad de aromas, vitaminas, colorantes o lípidos, mejorando el valor nutritivo, las características sensoriales y la vida útil de diferentes alimentos [76]. Una aplicación interesante de las CD es que pueden utilizarse para la separación de componentes no deseados, por ejemplo Col, de productos lácteos como leche, crema o quesos [77]. Si bien hay patentes que reportan el empleo de CD para extraer el Col de alimentos naturales, no hay información disponible de las condiciones óptimas de encapsulación y de la estabilidad de dichos complejos.

1.5.2.1 Las ciclodextrinas

Las CD son un grupo de oligosacáridos cíclicos que contienen al menos 6 residuos de D-glucopiranosas unidas por enlaces glucosídicos (1,4). Éstas contienen cavidades interiores lipofílicas y superficies exteriores hidrofílicas. Son capaces de interactuar con una gran cantidad de moléculas con las cuales forman complejos de inclusión. Naturalmente, existen tres tipos de CD, la α , la β y la γ , que se obtienen a partir de la degradación enzimática del almidón [77]; éstas difieren en el tamaño de sus cavidades (Figura 1.10) y en sus solubilidades [78], siendo la α -CD la más insoluble a temperatura ambiente (Tabla 1.8).

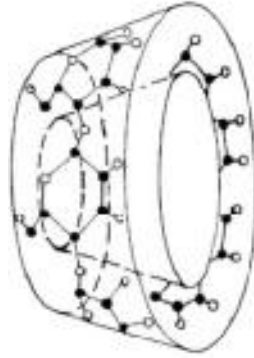


Figura 1.10: Cavidad tridimensional delimitada por la estructura de las CD.

Tabla 1.8: Algunas características de las distintas CD.

Tipo de CD	Residuos de glucopiranososa	Diámetro de cavidad (Å)	Peso Molecular (Da)	Solubilidad (g/mL)
-CD	6	4,7-5,3	972	14,5
-CD	7	6,0-6,5	1.134	1,85
α-CD	8	7,5-8,3	1.296	23,2
-CD	9	10,3-11,2	1.458	8,19

1.5.2.1.1 -ciclodextrina

La -ciclodextrina (-CD) es un oligosacárido cíclico compuesto por uniones (1,4) de siete unidades de glucosa. Contiene una cavidad central en su arreglo molecular, la cual forma complejos de inclusión con varios compuestos químicos, entre ellos el Col.

Las -CD son además no tóxicas y químicamente estables. Por lo tanto, el uso de -CD resulta ventajoso para la remoción del Col en la industria alimentaria [8]. La estructura química de la -CD se muestra en la Figura 1.11.

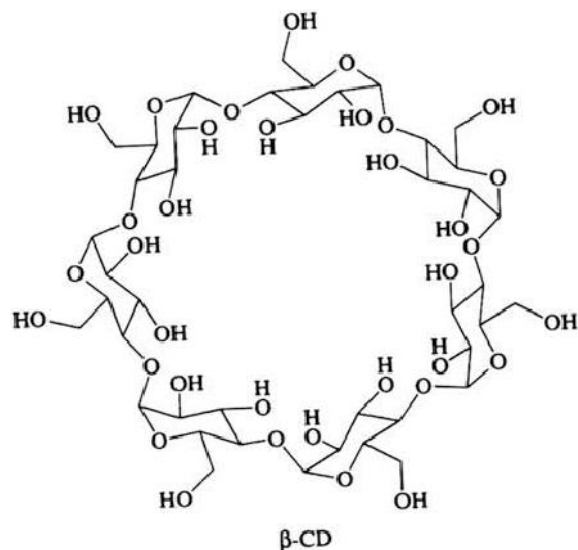


Figura 1.11: Estructura química de la β -CD.

1.5.2.2 Formación de complejos β -ciclodextrina/colesterol

El estudio y la caracterización de los complejos de β -CD/Col se realizó usando técnicas de difracción de rayos X, análisis termogravimétricos, calorimetría diferencial de barrido y resonancia magnética nuclear. Se encontró que independientemente de la relación de concentraciones usadas en la preparación de las mezclas, siempre se obtenía el mismo compuesto con una relación 3:1 de β -CD:Col. El contenido de agua de este complejo, a temperatura ambiente, resultó de 17%, que equivale aproximadamente a 42 moléculas de agua. La degradación térmica de dicho complejo comienza a los 200 °C, hecho que confirma que la β -CD y el Col están unidos entre sí por interacciones fuertes [79]. En la Figura 1.12 se muestran las estructuras química del Col, una representación de la β -CD y del modelo propuesto para el complejo β -CD/Col [80].

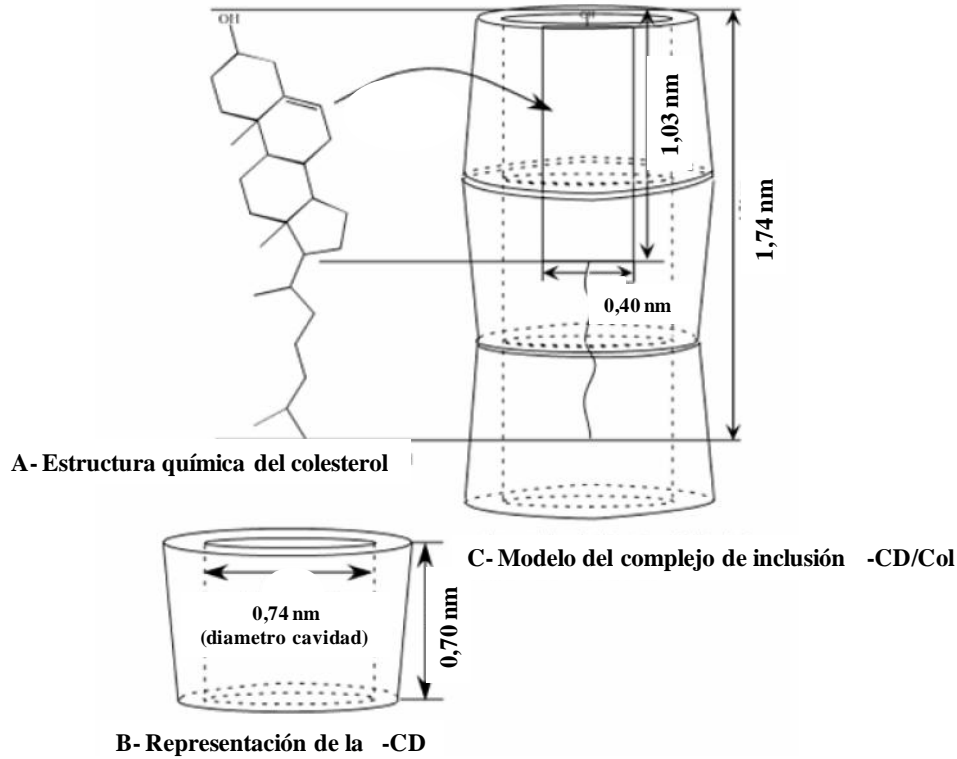


Figura 1.12: A) Estructura química del Col B) representación de la α -CD y C) modelo del complejo de inclusión α -CD/Col.

1.5.2.2.1 Uso de α -ciclodextrina como estrategia para remover el colesterol de productos lácteos

Las tendencias hacia hábitos alimenticios más saludables proporcionan creciente interés en los productos bajos en grasa. Sin embargo, la reducción de la grasa se convierte en una gran preocupación en la fabricación de productos lácteos ya que afecta en gran medida el sabor derivado de los componentes grasos y la textura del producto final [81]. Además, hay varios indicios respecto a que sus ácidos grasos saturados serían aterogénicamente neutros e incluso levemente positivos en la prevención de accidentes cerebro vasculares [82]. Por lo tanto, la aplicación de la metodología de extracción de Col de los alimentos empleando α -CD resultaría de gran interés para la industria alimentaria ya que permitiría el desarrollo de productos libres o con contenido reducido de Col, sin afectar el contenido graso de los alimentos que le otorgan valor nutricional y sensorial.

En los últimos años se han publicado varios trabajos en donde se emplean distintas metodologías para la extracción del Col de productos lácteos con α -CD, como

en la elaboración de quesos Cheddar [7], Camembert [10], untable [83], Mozzarella [84], Gouda [85], y de manteca [9].

1.5.2.3 Rotulado de los alimentos reducidos/sin colesterol

El CAA establece los requisitos que deben de cumplir los alimentos para poder ser etiquetados como reducidos o sin Col. Los mismos se muestran en la Tabla 1.9.

Tabla 1.9: Requisitos que deben cumplir los alimentos para poder ser etiquetados como reducidos/ sin Col.

Alimentos reducidos en Col	Alimentos sin Col
Máximo de 20 mg Col y un máximo de 1,5 g de grasa saturada cada 100 g de producto sólido.	Máximo de 5 mg Col / 100 g y máximo de 1,5 g grasa saturada / 100 g (sólidos)
Máximo de 10 mg Col y un máximo de 0,75 g de grasa saturada cada 100 mL de producto, para el caso de líquidos.	Máximo de 5 mg Col / 100 mL y máximo de 0,75 g grasa saturada / 100 mL (líquidos)
La energía aportada por grasa saturada no debe ser mayor a 10% del valor energético total.	La energía aportada por grasa saturada no debe ser mayor a 10% del valor energético total.

En el presente trabajo se propone como estrategia de extracción de Col la precipitación selectiva del mismo con β -CD, dejando el resto de la grasa en el alimento. Por lo tanto, no se puede denominar al producto obtenido como reducido o sin Col ya que el contenido de ácidos grasos saturados no se verá modificado. Es por esto que se adopta la nomenclatura “contenido reducido de Col”.

1.6 El queso

El capítulo 8, artículo 605 del CAA define al queso como el producto fresco o madurado que se obtiene por separación parcial del suero de la leche o leche reconstituida (entera, parcial o totalmente descremada), o de sueros lácteos, coagulados por la acción física, del cuajo, de enzimas específicas, de bacterias específicas, de ácidos orgánicos, solos o combinados, todos de calidad apta para uso alimentario; con o sin el agregado de sustancias alimenticias y/o especias y/o condimentos, aditivos específicamente indicados, sustancias aromatizantes y materiales colorantes. Se entiende por queso fresco el que está listo para el consumo poco después de su fabricación. Se entiende por queso madurado el que ha experimentado los cambios bioquímicos y físicos necesarios y característicos de la variedad de queso.

Existen muchos tipos de quesos asociados a distintos procesos de elaboración. Normalmente se identifican las siguientes clases:

- Quesos frescos no madurados, como el queso blanco.
- Queso de pasta blanda, como el Cuartirolo, Portsalut o cremoso.
- Queso de pasta semidura como el queso Criollo, Mar del Plata o Fontina.
- Queso de pasta dura como el Reggianito o Sardo.
- Quesos procesados o fundidos.

1.6.1 Etapas de la elaboración de queso

La elaboración de queso es un proceso sencillo en sí mismo, pero que involucra complejos fenómenos físicos y químicos. Es esencialmente un proceso de concentración que comienza con la coagulación de las principales proteínas de la leche, las CN [15]. La Figura 1.13 muestra ilustraciones de algunas de las etapas de la elaboración de queso.

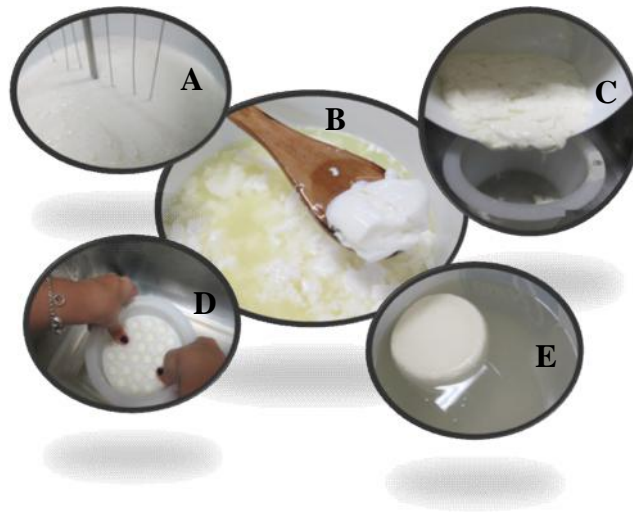


Figura 1.13: Etapas de la elaboración de queso. A) Lirado de la cuajada B) Calentamiento y agitado C) Moldeado D) Prensado E) Salado.

- **Preparación de la leche**

Antes de la elaboración de los quesos es necesaria la pasteurización de la leche. Se utiliza generalmente una pasteurización suave por calentamiento a 72-76 °C durante 15-18 s, para evitar defectos en los quesos elaborados.

- **Adición de fermentos**

En la elaboración de quesos se utilizan cultivos bacterianos para dar determinados aromas, gustos y texturas a los productos.

La reducción del pH del medio originada por los productos del metabolismo bacteriano, aumenta la actividad de la enzima coagulante, incrementa la velocidad de la sinéresis e inhibe el crecimiento de determinadas bacterias patógenas.

- **Coagulación**

Este es el paso fundamental en la elaboración de queso. Durante este período el coagulante a través de reacciones químicas provoca la coagulación de la CN de la leche confiriendo al queso su textura característica.

En la elaboración de quesos hay tres estrategias para coagular a las CN, que se usan dependiendo el tipo de queso que se quiere obtener. El primer método es la adición de enzimas coagulantes (cuajo), esta estrategia de coagulación es la utilizada para la mayoría de las variedades de queso. Otro método consiste en bajar el pH del medio causando la desestabilización de las MC, esta estrategia es utilizada para la elaboración de quesos como el Cottage y el queso crema. El tercer método consiste en la utilización tanto de ácidos como de una temperatura elevada para la precipitación tanto de las CN como de las PS. Este método es utilizado en la elaboración de la Ricotta y el queso blanco [15].

- **Corte de la cuajada: lirado**

La cuajada obtenida luego de la coagulación contiene una determinada cantidad de suero. La mayor parte del suero se encuentra en los poros o en las cavidades de la cuajada, el corte de la misma se hace con el propósito de favorecer la eliminación de ese líquido, ya que al dividir la cuajada se aumenta el área de superficie de desuerado. Las partículas del coágulo deben, en lo posible, ser del mismo tamaño. En las partículas grandes queda más líquido-suero que en las pequeñas, lo que provocaría una mala distribución del contenido acuoso en el queso elaborado.

- **Calentamiento y agitado**

El aumento de la temperatura favorece la expulsión de líquido de la cuajada, luego del lirado. Durante el calentamiento de la masa hay que agitarla constantemente para que ésta se caliente en forma uniforme, y para evitar que los cubitos de la cuajada se aglomeren y formen una gran masa.

- **Desuerado, moldeado y prensado**

El desuerado se favorece con la fragmentación del coágulo, la agitación de la cuajada cortada, el calentamiento y el prensado de la masa.

La cuajada se coloca en moldes de quesería y en éstos se realiza un prensado periódico, con la finalidad de la expulsión del suero y de favorecer el moldeado. Estos pasos deben realizarse a temperatura controlada ya que si se enfría la cuajada los bloques que la constituyen no aglutinan entre sí para dar lugar a un solo bloque de queso.

- **Salado**

Se colocan los quesos (ya sin el molde) en una solución de salmuera. El salado reduce la proliferación de ciertas clases de bacterias, completa el desuerado y contribuye al sabor deseado del queso.

- **Madurado**

El proceso de maduración varía mucho entre los distintos tipos de quesos. Durante esta etapa ocurren reacciones químicas y enzimáticas que son responsables de los *flavors*, la textura y las propiedades físicas de los quesos.

1.6.2 Queso fresco o Cuatirolo

Según el artículo 621 del CAA, con la denominación de Queso Cuatirolo, se entiende el producto de alta y muy alta humedad, graso, elaborado con leche entera o leche estandarizada, acidificada por cultivo de bacterias lácticas y coaguladas por cuajo y/o enzimas específicas.

El mismo deberá cumplir con las siguientes exigencias:

- a. Masa: cruda, moldeada, prensada, salada y madurada.
- b. Pasta: blanda, cerrada, algo elástica; sabor ligeramente ácido; aroma suave y agradable; color blanco-amarillento uniforme.
- c. Corteza: entera, ligeramente consistente, lisa o rugosa.
- d. Forma: cilíndrica achatada o paralelepípeda.
- e. Tiempo de maduración y peso: Mínimo 20 días para los que pesan menos de 2,5 kg. Mínimo de 30 días para los que pesan 2,5 a 5,0 kg.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Innovar en la elaboración de productos lácteos funcionales, evaluando el posible reemplazo de un aditivo importado por uno autóctono y aplicando una estrategia de extracción de colesterol y fortificación con minerales con miras a la producción de alimentos de mayor valor agregado.

2.2 Objetivos específicos

- Estudiar la interacción de los hidrocoloides goma guar y goma espina corona con las proteínas lácteas.
- Evaluar y comparar el efecto que tiene la adición de goma guar y/o de goma espina corona sobre la reología de los sistemas constituidos por proteínas lácteas.
- Investigar el efecto que tiene la adición de goma guar y/o de goma espina corona sobre los geles de caseína obtenidos enzimáticamente.
- Evaluar el impacto de la adición de diversos cosolutos (hidrocoloides, sacarosa e iones metálicos) sobre los parámetros de agregación enzimática de las micelas de caseína.
- Optimizar los factores que afectan el porcentaje de extracción del colesterol a partir de las cremas base iniciales para la elaboración de productos lácteos funcionales.
- Aplicar la metodología de extracción del colesterol y de fortificación en la elaboración de queso fresco tipo Cuartirolo.
- Evaluar las características fisicoquímicas, reológicas, microestructurales, funcionales y sensoriales de los quesos elaborados.

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos utilizados

En el presente trabajo de tesis se emplearon los siguientes reactivos químicos:

- Lácteos: Leche en polvo descremada y entera (Milkaut), caseinato de sodio (NaCAS) (Sigma-Aldrich), crema de leche (La Cabaña), leche fluida descremada (Manfrey) y crema de leche (Manfrey).

- Enzima coagulante: Cuajo líquido (Hansen) y quimosina recombinante (Chy-Max®, Hansen)

- Sales: CaCl_2 (Cicarelli), azida de sodio (NaN_3) (Mallinckrodt Chemical), MgCl_2 , NaCl y ZnCl_2 (Sigma-Aldrich) y ZnSO_4 (Novalquim).

- HC: GG (Sigma-Aldrich); GEC (Idea Supply Argentina S.A).

- Otros: NaOH (Cicarelli); 1-anilino-8-naftalén sulfonato (ANS) (Sigma-Aldrich), Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) (Cicarelli), sacarosa (Sac) (Sigma-Aldrich), acrilamida (Sigma-Aldrich), KOH (Cicarelli), hexano (Cicarelli), -CD (Kleptose®-Roquette Pharma), alcohol isopropílico (Cicarelli), Kit enzimático “Colestat” (Wiener lab), rodamina B (Sigma-Aldrich), fermento lácteo liofilizado STD (Diagramma S.A).

3.1.2 Suspensión de proteínas lácteas

La suspensión de PL fue preparada a partir de leche en polvo descremada/entera y reconstituida al 10%P/V, 13%P/P o al 20%P/V en una solución de CaCl_2 5 mM [37]. El Ca^{2+} , en cantidad suficiente, es indispensable para la floculación de las MC modificadas por la acción del cuajo. Se le agregó NaN_3 como agente antimicrobiano para prolongar la vida útil de la solución, en una proporción 0,01-0,02%P/V y se almacenó 24 h en heladera antes de ser usada. Previo a su empleo, se retiró del frío y se homogeneizó en agitador magnético hasta lograr la temperatura de trabajo.

Se utilizó leche en polvo para asegurar que la muestra fuera representativa y constante, ya que existe una gran variabilidad en la composición mineral y proteica de la leche de acuerdo a la raza, período gestacional o alimentación del ganado vacuno. En las experiencias de agregación de las MC, se trabajó con leche descremada para disminuir la presencia de grasa que afecta las lecturas de turbidez.

3.1.3 Soluciones de los polisacáridos

Se prepararon soluciones acuosas madre (0,5%P/V) de los polisacáridos GG y GEC. Se dispersaron cantidades apropiadas de la muestra sólida comercial en agua a temperatura ambiente. Las soluciones fueron sometidas a agitación magnética durante 1 h antes de su uso.

3.1.4 Enzima proteolítica (quimosina)

Para los estudios de agregación realizados en los sistemas modelo se utilizó cuajo líquido comercial, el cual contiene a la quimosina. Cada vez que se realizó una experiencia de agregación enzimática en sistemas diluidos se preparó una dilución al décimo del cuajo en agua destilada. En los casos de las experiencias de coagulación, en sistemas concentrados, se utilizó el cuajo sin diluir. El poder coagulante de 100 μ L de cuajo fue de $(2,7 \pm 0,1)$ unidades de renina (RU), donde 1 RU se define como la actividad requerida para coagular 10 mL de una suspensión de leche en polvo descremada reconstituida en CaCl_2 5 mM a 30 °C en 100 s [15].

Para la elaboración de los quesos en escala piloto se utilizó quimosina recombinante sin previa dilución.

3.1.5 Soluciones de sales de iones metálicos

Se prepararon soluciones acuosas madre de los iones metálicos en estudio, CaCl_2 50 mM, MgCl_2 50 mM, NaCl 500 mM y ZnCl_2 10 mM, a partir de la disolución de la droga sólida en agua destilada. En el caso de la solución de ZnCl_2 fue necesario agregar unas gotas de HCl para lograr su completa disolución.

3.1.6 Solución reguladora (*buffer*)

Se preparó una solución acuosa madre de TRIS 100 mM. A partir de esta solución, se preparó un *buffer* TRIS-HCl 10 mM, ajustándose el pH a 6,4 con agregados convenientes de HCl 0,1 M.

3.1.7 Otros reactivos

Se preparó una solución acuosa de Sac 50 g/L a partir de la droga sólida para ser utilizada en los estudios de agregación enzimática. La misma fue adicionada con NaN_3 para evitar el crecimiento microbiano.

Para las determinaciones de hidrofobicidad superficial se preparó una solución acuosa de ANS 6 mM a partir de la droga sólida comercial y se almacenó en la oscuridad a 4 °C.

Se preparó una solución acuosa de acrilamida 4 M a partir de la droga sólida para ser utilizada en los ensayos de *quenching* de la fluorescencia nativa.

3.2 Métodos

3.2.1 Determinación de la concentración de proteínas: Método de Kuaye

La concentración de las PL fue determinada por el método espectrofotométrico propuesto por Kuaye, el cual se basa en la modificación del espectro del aminoácido tirosina a altas longitudes de onda () de la región UV en un medio alcalino fuerte (pH = 13) [86]. En la región entre 248 y 256 nm, la absorbancia (Abs) es una función lineal de la λ y la pendiente es directamente proporcional a la concentración proteica según:

$$[\text{CN}](\text{g/L}) = \frac{(\text{Abs}_{248 \text{ nm}}^{\text{M}} - \text{Abs}_{256 \text{ nm}}^{\text{M}})}{(\text{Abs}_{248 \text{ nm}}^{\text{T}} - \text{Abs}_{256 \text{ nm}}^{\text{T}})} \quad (3.1)$$

donde los subíndices representan las λ a las cuales se mide la Abs y los supraíndices señalan si se trata de la muestra (M) o del testigo (T). Esta formulación es válida para los casos donde la relación lípidos/proteínas es menor a 0,05. Para la leche, teniendo en cuenta el contenido de proteínas, el contenido de grasa no debe superar el 1,5% P/P para poder utilizar este método.

Para determinar la concentración de proteínas se usó como testigo una solución 1 g/L de NaCAS. Se realizaron diluciones 1/250 V/V de la leche en NaOH 0,25 M y de 1/5 V/V para el testigo. Se registró la Abs de dichas diluciones a 248 y 256 nm y luego se calculó la concentración de PL de acuerdo con la ecuación 3.1, teniendo en cuenta el factor de dilución utilizado en cada caso.

3.2.2 Evaluación de la interacción proteína - polisacárido

3.2.2.1 Espectroscopía de fluorescencia nativa

Los posibles cambios conformacionales de las PL, generados por su interacción con los polisacáridos fueron evaluados a través de los espectros de emisión de la fluorescencia intrínseca de los fluoróforos proteicos en el rango de λ de 300-450 nm, los aminoácidos Trp, excitando a 295 nm, tanto en ausencia como en presencia de distintas concentraciones de los GM en estudio.

Se utilizaron concentraciones de 0,1 g/L de PL en medio TRIS-HCl 10 mM, pH 6,4. Se utilizó una cubeta triangular de fluorescencia de cuarzo de 1 cm de paso óptico para evitar el efecto de filtro interno [87]. Para las medidas espectrofluorimétricas se utilizó un espectrofluorómetro Aminco-Bowman series 2 equipado con portacelda termostatizable (35 °C).

3.2.2.2 Hidrofobicidad superficial

Se determinó la hidrofobicidad superficial (S_0) de las proteínas por fijación del ligando hidrofóbico fluorescente ANS, de acuerdo al método de Kato y Nakai [88]. Se midió la variación de la intensidad de fluorescencia (IF) de una solución de ANS 0,06 mM (3 mL) ante consecutivos agregados de 10 μ L de soluciones 0,1 g/L de las PL en medio TRIS 10 mM, pH 6,4 conteniendo distintas concentraciones de los GM en estudio. Las medidas fueron realizadas por duplicado. La S_0 se determinó como la pendiente inicial de la curva obtenida al graficar IF vs. concentración de proteína.

Previamente, se realizaron espectros de excitación y emisión de fluorescencia del ANS, de las PL, y de las mezclas ANS-PL, para determinar las λ de excitación y emisión. Se excitó a 390 nm y se registró la emisión de fluorescencia a 473 nm, a 35 °C. Todas las medidas se hicieron en un espectrofluorómetro Aminco-Bowman series 2 equipado con portacelda termostatizable.

3.2.2.3 Extinción de la fluorescencia nativa con acrilamida

Se aplicó un método que emplea la extinción de la fluorescencia intrínseca de las proteínas con acrilamida con el fin de estudiar la accesibilidad de este extintor a los grupos fluorescentes y si ésta es afectada por las interacciones entre las PL y los polisacáridos estudiados.

Se realizaron adiciones de 50 μ L de una solución de acrilamida 4 M a mezclas conteniendo 0,1 g/L de las PL en TRIS 10 mM, pH 6,4, y distintas concentraciones (0-0,03% P/V) de los GM en estudio, a 35 °C. Se registró la IF después de cada una de estas adiciones en un espectrofluorómetro Aminco-Bowman series 2 equipado con portacelda termostatizable. Las medidas fueron realizadas por duplicado.

Se realizaron las gráficas de Stern-Volmer: IF_0/IF vs. $[Q]$, siendo IF_0 la intensidad de fluorescencia inicial, en ausencia de acrilamida; IF , la intensidad de la fluorescencia ante cada agregado de acrilamida y $[Q]$, la concentración del *quencher*, acrilamida. Estos datos se ajustaron al modelo de esfera de acción [87]. Este modelo

propone la existencia de una esfera de volumen V en la cual la probabilidad de una interacción entre un fluoróforo y el extintor es igual a 1, y se ajusta a la siguiente expresión:

$$\frac{IF_0}{IF} = (1 + K_D[Q]) \times e^{\frac{[Q]VN}{1000}} \quad (3.2)$$

siendo K_D la constante del extinción y N el número de Avogadro. La K_D representa el valor recíproco de la concentración de *quencher* necesario para provocar la extinción de la fluorescencia de la mitad de los aminoácidos fluorescentes.

3.2.2.4 Determinación de la carga superficial de las proteínas lácteas

En la leche, las MC permanecen en suspensión debido a su carga negativa superficial que evita que éstas se agreguen al provocar la repulsión electrostática. El potencial zeta o electrocinético (ζ) describe la magnitud de esta carga superficial y puede ser calculado a partir de la movilidad electroforética de las partículas coloidales (u) según la ecuación de Henry [89-90].

$$\zeta = \frac{u\eta}{\epsilon} \quad (3.3)$$

donde η y ϵ son la viscosidad y la constante dieléctrica del medio a la temperatura de trabajo, respectivamente [89].

Se estimó el efecto de los GM en estudio sobre el ζ de las MC a partir de mezclas PL-GG y PL-GEC. Previamente ha sido establecida la similitud de las medidas de ζ obtenidas a partir de leche y las obtenidas a partir de MC nativas [91].

Para las medidas de ζ las muestras fueron preparadas con una concentración final de 0,1 g/L de PL, adicionando 10 μ L de una solución madre de leche reconstituida al 10% de sólidos totales en 3 mL de una solución TRIS-HCl 10 mM, pH 6,4; con distintas concentraciones de los GM en estudio (GG o GEC) en un rango de concentraciones de 0-0,05%P/V. Para realizar las medidas de ζ se utilizó un nano analizador de partículas Horiba SZ-100, a una temperatura controlada de 35 °C, con la aplicación de un voltaje de 3,3 V. Todas las medidas fueron realizadas por quintuplicado.

3.2.3 Efecto de la adición de los galactomananos sobre el comportamiento reológico de las proteínas lácteas en solución

La reología es la ciencia que estudia la deformación y el flujo de la materia por acción de fuerzas externas y, desde el punto de vista de los alimentos, brinda grandes

herramientas para el estudio de los mismos. Las propiedades reológicas de los alimentos están basadas en las respuestas que tienen éstos cuando son sometidos a una fuerza normal o tangencial. Representan una herramienta útil para el diseño de los alimentos, para la caracterización física de los materiales de partida previo al procesado, para el control de calidad y para comprender el efecto que tienen distintos tratamientos sobre el producto final [92-93]. Hay muchos métodos diferentes para la caracterización reológica de los alimentos, la selección del adecuado depende de las características del material a analizar, la aplicabilidad y la disponibilidad del instrumental [92].

En el caso de los fluidos, para poder entender sus propiedades reológicas resulta conveniente la determinación del comportamiento de flujo de los sistemas en estudio. Para tal fin se puede emplear un viscosímetro rotatorio, en donde se hace variar la $\dot{\gamma}$ y se registra el η ante cada variación. El η se define como la fuerza por unidad de área aplicada paralelamente al desplazamiento, mientras que $\dot{\gamma}$ se define como el gradiente de velocidades que se establece en un fluido cuando se aplica un determinado $\dot{\gamma}$.

La η de un líquido es su resistencia a fluir y puede ser calculada como el cociente entre el τ y la $\dot{\gamma}$ (ecuación 3.4).

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (3.4)$$

Los distintos tipos de comportamientos de flujo pueden ser descriptos en base a los diagramas de τ vs. $\dot{\gamma}$.

Se realizaron medidas de viscosidad de los sistemas PL-GG y PL-GEC utilizando un viscosímetro Brookfield LVDV-II+ con una geometría cono-plato (diámetro de cono: 4,8 cm; ángulo de truncación: 0,8°). Se prepararon muestras conteniendo 37 g/L de PL y se varió la concentración de los GM en estudio en un rango de 0-0,2%P/V. La temperatura y el pH del medio de trabajo se mantuvieron constantes en 35 °C y 6,4 respectivamente. Se varió la velocidad de deformación en el rango de 0-750 s⁻¹(0-100 rpm), registrándose ante cada variación los valores de η y de $\dot{\gamma}$.

3.2.4 Estudio del proceso de agregación de las micelas de caseína

Los posibles cambios de tamaño y/o grado de compactación de las MC durante el proceso de agregación se estudiaron basándose en la dependencia de la turbidez (τ) con la λ en un rango de 420-650 nm, en donde no hay absorción de los grupos cromóforos de las proteínas. Considerando que las mezclas no son muestras monodispersas, la τ será función del peso molecular promedio en peso (M) de partículas esféricas de

concentración c y del factor de disipación promedio (Q) de los agregados. Éste resulta de las interferencias internas de la luz dispersada por las partículas a todos los ángulos, depende de la forma de las mismas, de su grado de compactación y se tiene en cuenta cuando las partículas poseen un tamaño mayor que la incidente. Además, también depende de H , una función que involucra al índice de refracción de la solución de MC y del solvente puro.

$$\tau = HcMQ \quad \text{siendo } H = \frac{32\pi^2 n_0^2 \left(\frac{\partial n_1}{\partial c}\right)^2}{3N\lambda^4} \quad (3.5)$$

donde n_0 y n_1 son los índices de refracción del solvente puro y la solución respectivamente, N es el número de Avogadro, $\partial n_1/\partial c$ es el incremento específico del índice de refracción.

Trabajando matemáticamente, se puede llegar a la siguiente ecuación:

$$\beta = 4,2 + \frac{\partial(\log \tau)}{\partial(\log \lambda)} \quad (3.6)$$

Ya que $\tau = 2,303 \text{ Abs}$, se puede estimar como:

$$\beta = 4,2 + \frac{\partial(\log \text{Abs})}{\partial(\log \lambda)} \quad (3.7)$$

donde β es un parámetro relacionado con Q y, por lo tanto, con el tamaño y grado de compactación de las partículas [94-95].

Los valores de β fueron determinados midiendo la Abs de las muestras usando un espectrofotómetro con arreglo de diodos Spekol 1200 en donde, a distintos tiempos (intervalos regulares), se obtuvieron los espectros de absorción. Luego se graficó $\log \text{Abs}$ vs. $\log \lambda$ para los distintos tiempos medidos y se calcularon las pendientes de cada una de las rectas obtenidas. Con los valores de las pendientes se calculó un valor de β para cada tiempo, a través de la ecuación 3.7.

Muestras de 3 mL conteniendo una concentración de 0,1 g/L de PL y los cosolutos en estudio (gomas, Sac, iones metálicos), en medio TRIS-HCl 10 mM, concentración de CaCl_2 variable (5-10 mM), pH 6,4 se dejaron equilibrar a 35 °C. Luego fueron transferidas a cubetas de vidrio de 1 cm de camino óptico y colocadas en un portacubetas termostatzado a dicha temperatura. La agregación se inició por el agregado de 50 μL de una dilución al décimo de cuajo en agua destilada. La concentración de cuajo utilizada fue la necesaria para hidrolizar la máxima cantidad de -CN en el menor tiempo posible al comienzo del proceso.

3.2.4.1 Determinación de los parámetros de agregación enzimática

Se determinaron dos parámetros vinculados al proceso de agregación de las MC: tiempo de agregación (t_{ag}) y dimensión fractal (D_f) de los agregados obtenidos al final del proceso. Un fractal se define como una estructura formada por unidades similares entre sí, que puede ser caracterizado por el parámetro D_f , que es una medida del grado de compactación de los agregados formados [96]. Se ha demostrado que el parámetro para un sistema de agregación de partículas de las características de las MC tiende, durante el proceso de floculación, hacia un valor asintótico que puede ser considerado como la D_f de los agregados [95]. La interpretación gráfica de estos dos valores se muestra en la Figura 3.1.

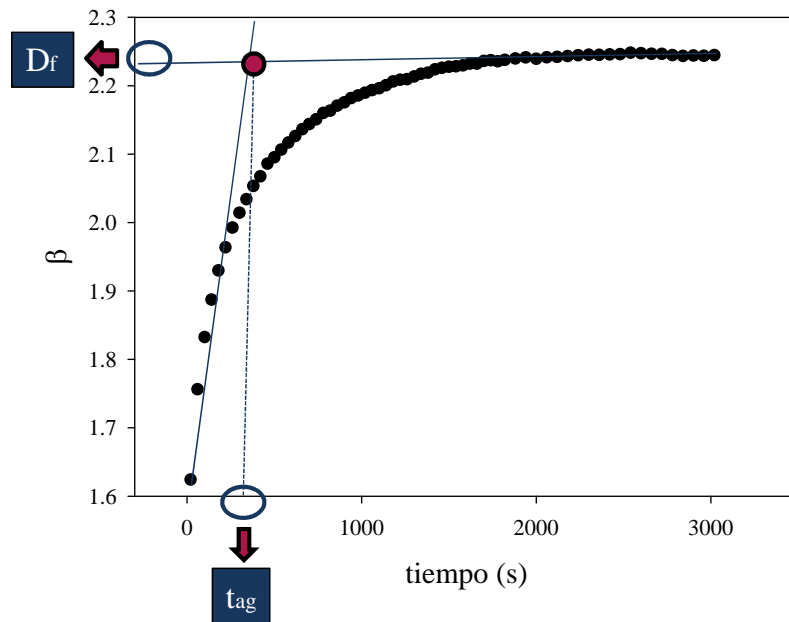


Figura 3.1: Esquema de una gráfica de β vs. tiempo para el caso de la agregación enzimática de las MC inducida por cuajo. Cálculo de los parámetros de agregación.

El valor del t_{ag} se calculó como el valor que toma la abscisa en el punto de intersección de dos rectas: una de ellas corresponde a la parte inicial de la curva β vs tiempo y la otra es la recta que surge cuando los valores de β permanecen constantes en el tiempo (Figura 3.1).

Además, se evaluaron los estados de agregación iniciales de las MC, antes de la adición del agente coagulante, a partir de los valores de β a tiempo 0 (β_0).

3.2.4.2 Estudio del efecto de los cosolutos sobre los parámetros de agregación mediante diseño de experimentos

La adición de cosolutos puede provocar cambios significativos en la estructura de las MC que se reflejan en modificaciones de sus propiedades funcionales [97-98]. Por ello resulta de interés evaluar las posibles modificaciones en el proceso de agregación y coagulación debido a la presencia de diferentes cosolutos usualmente presentes o adicionados en un producto lácteo. Para tal fin, se usaron distintos diseños experimentales en donde, a través de los parámetros estadísticos obtenidos de ensayos ANOVA, se determinaron los factores y las interacciones que resultaron significativos para cada una de las variables respuesta estudiadas. Una vez determinados los mismos, se ajustaron las respuestas mediante el modelo correspondiente y se analizaron residuos comprobándose normalidad e independencia. Se obtuvieron modelos matemáticos descriptivos y predictivos del comportamiento del sistema. Para visualizar el comportamiento de las variables en estudio se graficaron las superficies de respuesta.

El diseño de los experimentos y el análisis estadístico fue llevado a cabo con el programa Design Expert (versión de prueba 6.0.10). Los efectos de los factores sobre las respuestas fueron considerados como estadísticamente significativos a valores de probabilidad asociada (p)<0,05.

Se realizó un primer ajuste de los datos considerando todas las interacciones de primer y segundo orden posibles. Se descartaron aquellos términos del modelo que resultaron no significativos y se realizó nuevamente el ajuste del mismo.

3.2.4.2.1 Efecto de los cosolutos goma guar, goma espina corona, calcio y sacarosa

Con el objetivo de analizar los resultados obtenidos durante el estudio de la agregación enzimática de las MC se realizó un diseño Box-Behnken modificado (se le agregaron los puntos centrales de cada cara), de tres variables en tres niveles considerando como factores o variables independientes la concentración de CaCl_2 (niveles: 5; 7,5 y 10 mM), la concentración de Sac (niveles: 0; 0,5 y 1,0%P/V) y la concentración de los GM en estudio GG y GEC (niveles: 0; 0,005 y 0,010%P/V) y como variables dependientes o respuestas a t_{ag} , D_f y β_0 . En la Tabla 3.1 se muestra el diseño experimental en términos de las variables no codificadas.

Tabla 3.1: Diseño experimental Box-Behnken realizado para el estudio de los factores [GM], [CaCl₂] y [Sac].

Nº de experimento	[GM] (%P/V)	[CaCl ₂] (mM)	[Sac] (%P/V)
1	0	5,0	0
2	0,005	5,0	0
3	0,010	5,0	0
4	0,005	7,5	0,5
5	0,010	7,5	0,5
6	0	7,5	0,5
7	0,010	10,0	1,0
8	0	10,0	1,0
9	0,005	10,0	1,0
10	0	5,0	0,5
11	0	5,0	1,0
12	0,005	7,5	0
13	0,005	7,5	1,0
14	0,010	10,0	0
15	0,010	10,0	0,5
16	0,005	5,0	0,5
17	0,010	5,0	1,0
18	0	7,5	0
19	0,010	7,5	1,0
20	0	10,0	0
21	0,005	10,0	0,5
22	0,010	5,0	0
23	0	7,5	1,0
24	0,005	10,0	0
25	0	10,0	0,5
26	0,010	7,5	0
27	0,005	5,0	1,0

3.2.4.2.2 Efecto de los iones calcio, magnesio, zinc y sodio

Para el estudio del efecto de la adición de los iones metálicos en estudio sobre los parámetros de agregación enzimática de las MC, se realizó un diseño experimental factorial completo, de cuatro variables en tres niveles considerando como factores o variables independientes la concentración de CaCl₂ (niveles: 5, 10 y 15 mM), la concentración de MgCl₂ (niveles: 0, 5 y 10 mM), la concentración de ZnCl₂ (niveles: 0, 0,125 y 0,25 mM) y la concentración de NaCl (niveles: 0, 50 y 100 mM), y como variables dependientes o respuestas a los parámetros t_{ag} , D_f y β_0 . En la Tabla 3.2 se muestra el diseño experimental en términos de las variables no codificadas.

Tabla 3.2: Diseño experimental factorial completo realizado para el estudio de los factores $[\text{CaCl}_2]$, $[\text{MgCl}_2]$, $[\text{ZnCl}_2]$ y $[\text{NaCl}]$.

Nº de experimento	$[\text{CaCl}_2](\text{mM})$	$[\text{MgCl}_2](\text{mM})$	$[\text{ZnCl}_2](\text{mM})$	$[\text{NaCl}](\text{mM})$
1	10	10	0,125	0
2	10	0	0,125	0
3	10	5	0,250	0
4	5	5	0,125	0
5	15	10	0,125	0
6	10	0	0,250	0
7	5	0	0,250	0
8	10	0	0,250	100
9	5	0	0,125	100
10	10	5	0,125	50
11	10	5	0,125	50
12	10	5	0,125	50
13	15	5	0,250	50
14	5	10	0	100
15	5	10	0,250	100
16	15	0	0	50
17	5	5	0,125	100
18	5	0	0	50
19	15	0	0,250	0
20	15	10	0,250	50
21	15	5	0,125	50
22	15	0	0,250	50
23	10	5	0	100
24	15	5	0,125	0
25	5	10	0,250	0
26	10	10	0,250	0
27	15	10	0,250	0
28	10	5	0,125	0
29	5	10	0,125	100
30	5	5	0,250	100
31	10	0	0	50
32	5	0	0,250	50
33	10	10	0	50
34	15	0	0,125	100
35	5	5	0,250	0
36	10	0	0,125	50
37	10	0	0,250	50
38	15	0	0,250	100

Capítulo 3: Materiales y Métodos

39	5	10	0	0
40	10	0	0	100
41	5	5	0	50
42	10	5	0,250	50
43	5	10	0,250	50
44	10	10	0	100
45	5	0	0,125	50
46	15	5	0,125	100
47	15	0	0,125	0
48	5	10	0	50
49	15	10	0,125	100
50	10	5	0,125	50
51	5	10	0,125	50
52	15	5	0	50
53	15	10	0,125	50
54	5	5	0,250	50
55	15	5	0,250	0
56	10	5	0	50
57	5	5	0	100
58	5	0	0,125	0
59	15	10	0	50
60	15	0	0	0
61	10	5	0,125	50
62	15	10	0,250	100
63	15	10	0	100
64	10	10	0,250	50
65	10	10	0	0
66	10	5	0,250	100
67	15	0	0	100
68	15	5	0	100
69	5	5	0,125	50
70	10	0	0,125	100
71	15	0	0,125	50
72	10	5	0,125	100
73	5	0	0	0
74	15	5	0	0
75	15	10	0	0
76	10	5	0	0
77	10	10	0,125	50
78	5	10	0,125	0
79	10	10	0,250	100

80	5	0	0,250	100
81	10	5	0,125	50
82	10	5	0,125	50
83	5	5	0	0
84	10	0	0	0
85	15	5	0,250	100
86	10	10	0,125	100
87	5	0	0	100
88	0	5	0	0
89	0	5	0	50
90	0	5	0	100
91	0	5	0,125	0
92	0	5	0,125	50
93	0	5	0,125	100
94	0	5	0,250	0
95	0	5	0,250	50
96	0	5	0,250	100
97	0	10	0	0
98	0	10	0	50
99	0	10	0	100
100	0	10	0,125	0
101	0	10	0,125	50
102	0	10	0,125	100
103	0	10	0,250	0
104	0	10	0,250	50
105	0	10	0,250	100

3.2.5 Coagulación enzimática de las micelas de caseína: Efecto de los galactomananos

Para que ocurra la coagulación de las MC es necesario trabajar con suspensiones lácteas concentradas. Los coágulos fueron obtenidos a partir de la adición del agente coagulante (cuajo) a muestras de leche descremada reconstituida al 10% P/V ([PL] = 35 g/L) en presencia de distintas concentraciones de los GM en estudio, en medio TRIS-HCl 10 mM, CaCl₂ 5mM, pH 6,4. La coagulación se llevo a cabo adicionando 5 μ L de cuajo por cada 1 mL de muestra a una temperatura controlada de 35 °C. Los coágulos fueron preparados en todos los casos en el mismo día en que se realizaron las mediciones que se describen a continuación.

3.2.5.1 Microestructura de los coágulos

3.2.5.1.1 Obtención de imágenes por microscopía confocal

La microscopía confocal posibilita la visualización de muestras con un alto grado de hidratación y la obtención de secciones ópticas que permiten la obtención una imagen tridimensional. Estas características hacen de la microscopía confocal una técnica apropiada para el estudio de la microestructura de los coágulos [99-100].

Se determinó la microestructura de los coágulos obtenidos a partir de la adición de cuajo a sistemas PL-GM. Previo al agregado de cuajo se adicionó a las mezclas 50 μL de una solución de rodamina B 0,04 mg/mL, quedando en una concentración final de 0,002 mg/mL en las muestras [101].

Los coágulos fueron preparados en placas de microscopía LAB-TEK II (Figura 3.2), adicionando en cada pocillo 100 μL de muestra.

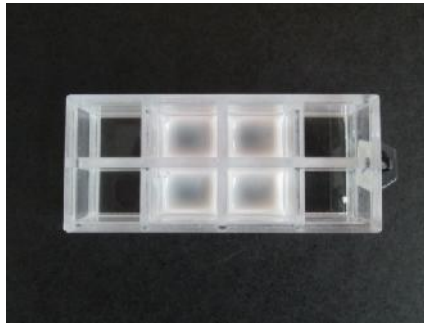


Figura 3.2: Imagen de las muestras preparadas para ser visualizadas en el microscopio confocal, en las placas LAB-TEK II.

Se trabajó con un microscopio confocal Nikon Eclipse TE-2000-E. Se tomaron imágenes de áreas representativas de las distintas muestras usando una lente objetivo con aumento de 60X (de inmersión en aceite) y una apertura numérica de 1,4.

Las distintas muestras fueron excitadas con un laser a una λ de 543 nm y la señal fluorescente fue recogida utilizando un filtro con ancho de banda de $(605 \pm 37,5)$ nm. Se escaneó un volumen tridimensional, capturando una imagen cada 0,1 μm de profundidad con un desplazamiento total de 15 μm , obteniéndose así *stacks* (apilamientos) de 150 imágenes representativas de cada uno de los coágulos estudiados.

Los archivos de las imágenes digitales fueron adquiridos con una resolución en pixel de 1024x1024, en donde 1 pixel equivale a 0,08 μm . Estas imágenes fueron almacenadas con el formato del programa EZ-C1 desarrollado por Nikon y luego fueron exportadas a formato TIFF para ser analizadas.

3.2.5.1.2 Determinación de tamaño de poro de los coágulos

Con el objetivo de determinar el diámetro de poro de los coágulos a partir de las imágenes obtenidas por microscopía confocal, se utilizó un *plugin* (complemento) del programa Image J (versión 1.485), llamado Bone J (versión 1.3.12) [102]. Se obtuvo el parámetro espesor, que puede ser interpretado como el ancho de las cavidades o las distancias entre estructuras y que, en este caso en particular, fue utilizado para estimar la distribución de los diámetros de los poros de los coágulos en estudio [103]. La Figura 3.3 muestra el esquema del procesamiento de las imágenes haciendo uso del programa Image J, en donde se pueden ver los distintos pasos del proceso de obtención del diámetro de poro.

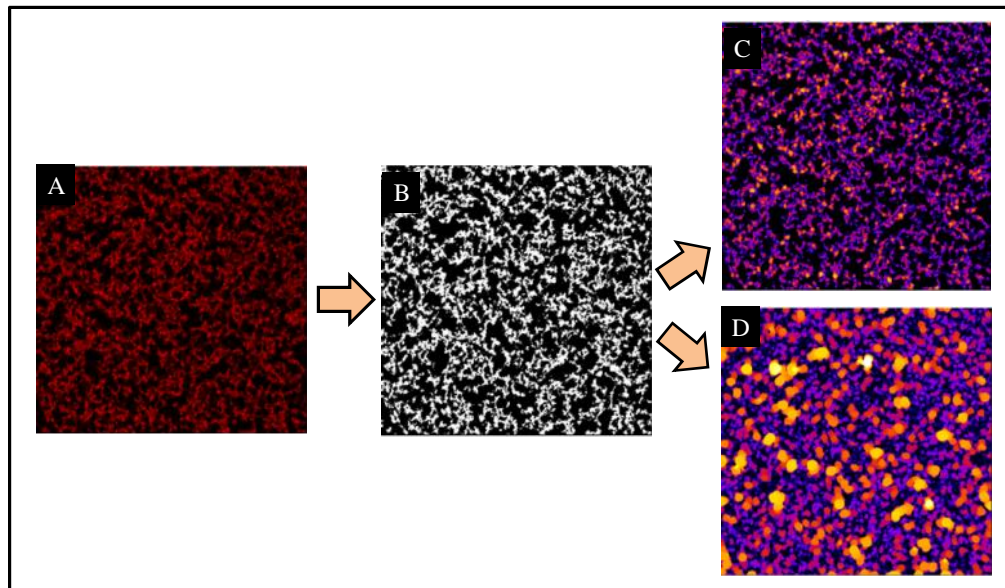


Figura 3.3: Imágenes representativas del proceso de obtención de los diámetros de poro de los coágulos: A) Imagen de coágulos obtenida por microscopía confocal, B) Imagen binaria, C y D) Imágenes obtenidas luego de procesar las imágenes binarias de los coágulos.

En la Figura 3.3 B se puede observar la imagen binaria, en donde la red proteica observada en A de color rojo pasa a blanco y lo que no está coloreado queda de color negro. Al ejecutar el *plugin* Bone J se obtienen las imágenes C y D, en donde C es una representación del entramado de la red de proteínas y D es la representación de los poros. Lo que hace este *plugin* es ubicar una esfera en cada uno de los espacios que quedan delimitados por la red de proteínas. Cada uno de los colores de estas esferas se corresponde con un diámetro y se considera este valor como el diámetro de poro.

3.2.5.1.3 Determinación de parámetros de textura digital de los coágulos

El concepto de textura desde un punto de vista computacional difiere del concepto desde el punto de vista mecánico, en donde este término hace referencia a características de los alimentos tales como dureza, cohesividad, viscosidad, elasticidad, adhesividad, gomosidad, entre otras. Desde el punto de vista computacional, la textura hace referencia al arreglo espacial de los componentes y al brillo de un pixel en una dada región de la imagen. Los valores de estos parámetros de la imagen otorgan información acerca de la geometría estructural de los objetos, ya que usualmente un gran cambio en éstos estaría indicando un cambio en la estructura geométrica de los objetos analizados [104].

Con el objetivo de obtener los parámetros de textura de las imágenes obtenidas por microscopía, fue utilizado un *plugin* del programa Image J, llamado “Grey Level Co-occurrence Matrix Texture” (versión 0.4), el cual utiliza un algoritmo basado en matrices para calcular los parámetros de textura de las imágenes previamente convertidas a escala de grises. Fueron analizados dos parámetros de textura: la entropía (E) y la homogeneidad (H), donde un alto valor de E implica que en la imagen analizada hay mayor variedad de tonalidades de gris. Por otra parte, el valor de H es una medida de la distribución espacial del histograma de grises y adquiere un valor máximo en una imagen que contiene menor número de transiciones de tonalidades. En consecuencia, un valor alto de E y un valor bajo de H corresponden a estructuras en donde las partículas están bien definidas en sectores. Mientras que valores bajos de E y altos de H se relacionan con partículas dispersas homogéneamente en todo el volumen de la muestra analizada [105]. En la Figura 3.4 se muestran en forma esquemática los significados de los parámetros de textura E y H.

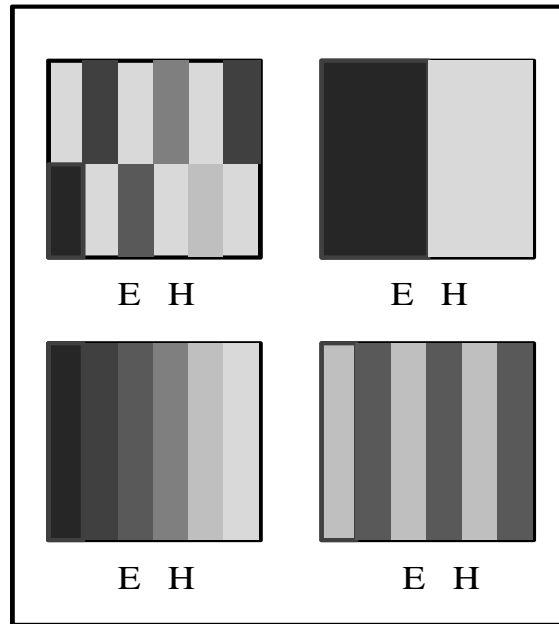


Figura 3.4: Representación esquemática del significado de los parámetros de textura digital.

3.2.5.2 Reología de los coágulos. Ensayos mecánicos de textura

La textura de un alimento es la integración de las propiedades mecánicas y térmicas percibidas en la vía oral cuando éste es consumido y está determinada por la relación existente entre los componentes de éstos [3]. La textura tiene gran influencia en la aceptación de los alimentos por parte de los consumidores. La misma puede ser manipulada por el agregado de HC a los alimentos. En el caso de los coágulos formados por sistemas que contienen una mezcla de proteínas e HC, las propiedades reológicas van a depender de la compatibilidad termodinámica y estructural entre ambas macromoléculas del sistema. Entre los distintos estudios de textura podemos mencionar los ensayos de penetración, de compresión uniaxial, de torsión, entre otros. A partir de estos ensayos es posible calcular distintos parámetros de textura [92].

Muestras de los coágulos en estudio fueron preparadas en contenedores cilíndricos (3 cm de diámetro de sección y 3 cm de altura), según el apartado 3.2.5, y fueron penetrados por una sonda de geometría cilíndrica de 2 cm de diámetro, a temperatura ambiente (20-21 °C), a una velocidad de desplazamiento constante de 1 mm/s. Para dichas medidas se utilizó un equipo Multitest 2.5-d (Mecmesin) acoplado a un dinamómetro digital (celda de carga de 25 N). Todos los ensayos de penetración fueron llevados a cabo en el centro de la muestras (Figura 3.5). Se realizaron 5 determinaciones para cada tipo de sistema analizado, siempre con una muestra nueva.

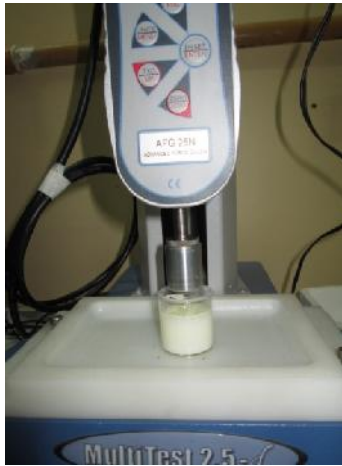


Figura 3.5: Imagen representativa de cómo se llevaron a cabo los ensayos de penetración de los coágulos. En la misma se puede observar la sonda cilíndrica utilizada para penetrar las muestras preparadas en los contenedores.

De las curvas de fuerza-desplazamiento obtenidas, fueron calculados dos parámetros: la fuerza de quiebre y la firmeza de los coágulos, en donde el primero es definido como la fuerza en donde se observa una ruptura significativa del coágulo y el segundo, como la pendiente inicial de los perfiles de penetración obtenidos (Figura 3.6) [106-107].

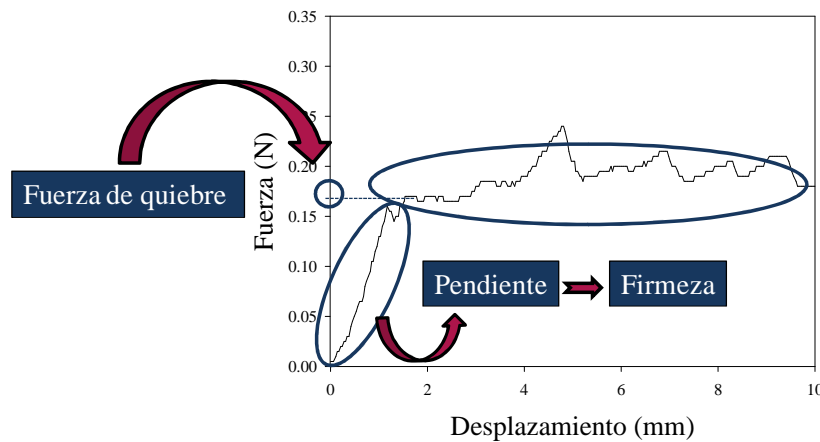


Figura 3.6: Representación esquemática de una curva de fuerza vs. desplazamiento de la sonda al penetrar las muestras de coágulos. Se indica en forma esquemática el cálculo de los parámetros a partir del penetrograma.

3.2.5.3 Capacidad de retención de agua de los coágulos

Para la determinación del efecto que tiene la adición de los GM sobre la capacidad de retención de agua (CRA) de los coágulos, los mismos fueron preparados en tubos de centrífuga de 15 mL. El suero expelido por éstos fue cuantificado luego de

que los mismos fueran centrifugados a una velocidad de 200xg durante 10 min. El CRA fue calculado como [106] :

$$\text{CRA (\%)} = \frac{\text{peso coágulo} - \text{peso suero}}{\text{peso coágulo}} 100 \quad (3.8)$$

3.2.6 Extracción de colesterol de cremas base para la elaboración de quesos

3.2.6.1 Preparación de las cremas base

El proceso de extracción de Col se realizó sobre cremas base (CB), y no directamente sobre muestras de leche, debido a que fue reportado previamente que el proceso de homogeneización que requiere el protocolo de extracción del Col altera a las CN, ocasionando defectos en los productos lácteos. Por lo tanto, para contrarrestar los efectos que tiene la homogeneización sobre las proteínas, se mezclan las CB sometidas al protocolo de extracción de Col con leche descremada que aporta proteínas no afectadas por la homogeneización y sin alterar el contenido de Col de las cremas [108]. Por otra parte, al utilizar CB con mayor contenido de materia grasa (MG) que la leche, se garantiza el tenor graso necesario para la elaboración de los quesos luego de la adición de la leche descremada.

Las CB se obtuvieron mezclando leche en polvo entera, reconstituida en agua destilada de forma tal de obtener una leche fluida al 13% P/P (concentración de MG: 24,2%), con crema de leche (concentración de MG: 37,8%). Ambos componentes se mezclaron en proporciones determinadas por balance de masas de manera de obtener las concentraciones preestablecidas de MG (10, 13 y 16%).

Las mezclas se agitaron a 50 °C durante 15 min, luego fueron calentadas en un baño a 75 °C durante 10 min. Posteriormente fueron homogeneizadas utilizando un homogeneizador mecánico Omni GLH a 25.000 rpm durante 30 s.

3.2.6.2 Formación del complejo -ciclodextrina/colesterol

La -CD se adicionó a las CB en proporción 0,5; 1,0 y 1,5% de -CD cada 3,5%MG. Se dejó en agitación para favorecer la formación del complejo -CD/Col, variando el tiempo y la temperatura de agitación, según el diseño experimental que se detalla con posterioridad.

Luego, la mezcla se centrifugó a baja velocidad (100xg) por 5 min, obteniéndose en el sobrenadante la mezcla inicial reducida en Col.

3.2.6.3 Cuantificación del colesterol extraído

Para la cuantificación de Col, las muestras se diluyeron previamente de manera tal que éstas tuvieran un porcentaje de MG (%MG) final del 3%. Posteriormente, las mismas fueron saponificadas con KOH etanólico. Para tal fin, se tomaron 6 mL de la muestra diluida y se trasvasaron a tubos de 50 mL por cuadruplicado. A cada uno de los tubos se agregó 7,5 mL de solución etanólica de KOH 2 M, se taparon y se homogeneizaron. Los tubos fueron llevados a un baño termostático a 80 °C durante 90 min con agitación periódica.

Luego de alcanzar la temperatura ambiente, se agregó 5 mL de agua destilada sobre las muestras saponificadas, se agitó en vórtex durante 20 s y luego se adicionó a cada tubo 5 mL de hexano y se agitó en vórtex nuevamente. Los tubos fueron centrifugados durante 5 min a 300xg y posteriormente se extrajeron 3 mL de la fase superior (primera extracción). El agregado de hexano, la agitación, la centrifugación y la extracción del sobrenadante se realizaron dos veces más, pero en la última extracción se tomaron 6 mL en vez de 3 mL. Todas las fracciones extraídas fueron depositadas en tubos de vidrio de boca ancha y se dejaron evaporar en campana durante 20 h como mínimo y luego en estufa a 45-50 °C hasta sequedad. Una vez evaporado por completo el hexano, se agregaron 0,5 mL de hexano nuevamente sobre las paredes del tubo de manera de redissolver el Col depositado en las mismas. Luego se dejaron en la estufa hasta que nuevamente se evaporara el hexano adicionado. El secado de los tubos finalizó bajo corriente de nitrógeno durante 5 min.

Posteriormente, a cada tubo se agregó 200 µL de alcohol isopropílico con el objetivo de redissolver el residuo de Col seco. Se tomaron alícuotas de 20 µL que se transvasaron a tubos eppendorf, a los que se les agregó 1 mL del reactivo enzimático para la determinación de Col. Todos los tubos fueron incubados a 37 °C en baño termostático, durante 15 min. Finalmente, se determinó la Abs de las muestras a una λ de 510 nm en un espectrofotómetro UV-Visible Spekol 1200. Se realizaron blancos de reactivos y tubos testigo; el primero consistió en 1 mL de reactivo enzimático y el segundo de 20 µL de un patrón estándar de Col 2 g/L adicionado con 1 mL del reactivo enzimático. La concentración de Col fue calculada en mg/100 g de muestra a partir de la ecuación 3.9:

$$mg\%Col = \frac{Cst}{Abs(st)} Abs(m) \frac{Vm+r}{Vm.redis} \frac{Valcohol}{Vm0} \frac{Vhexano}{Vhexano+Col} 100 \quad (3.9)$$

donde Cst es la concentración del patrón estándar diluido (0,0392 mg/mL); Abs(st) es el valor de Abs del estándar; Abs(m) es la Abs de la muestra incógnita o tratada; Vm+r es el volumen de muestra más el reactivo enzimático (1,02 mL); Vm.redis, el volumen de muestra redisuelta (0,02 mL); Valcohol, el volumen de alcohol isopropílico (0,2 mL); Vm₀, el volumen de muestra inicial (6 mL); Vhexano, el volumen total de hexano (15 mL) y Vhexano+Col, el volumen de hexano más Col llevado a sequedad (12 mL).

Los porcentajes de extracción del Col (%ExtCol) se calcularon a partir de la ecuación 3.10, siendo %Col(CB-CRC) y %Col(CB) los porcentajes de Col determinados en las CB con y sin el tratamiento de extracción respectivamente.

$$\%ExtCol = 100 - \frac{[\%Col(CB-CRC) \times 100]}{\%Col(CB)} \quad (3.10)$$

En la Figura 3.7 se muestra un esquema del proceso de extracción del Col.

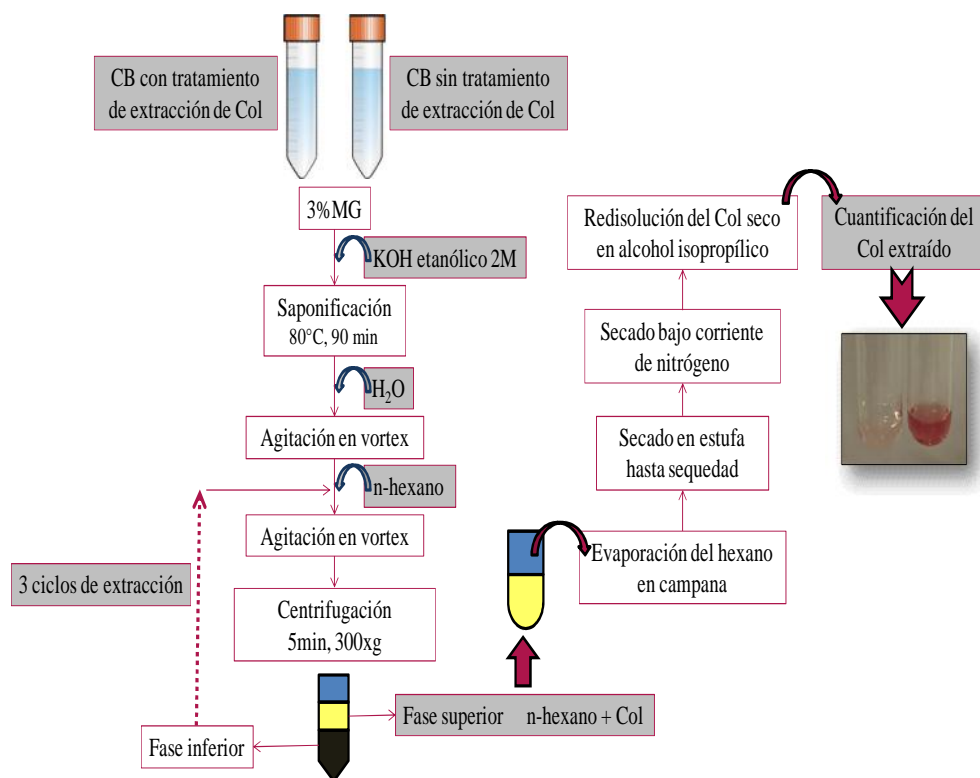


Figura 3.7: Esquema del proceso de cuantificación del porcentaje de extracción de Col de las muestras de CB.

3.2.6.4 Obtención de la crema base con contenido reducido de colesterol: Uso de diseños experimentales

3.2.6.4.1 Fase exploratoria: Diseño Plackett-Burman

A partir de las CB iniciales, obtenidas por mezcla de leche entera y crema, se investigó la influencia sobre el nivel de %ExtCol de los siguientes factores: %MG

inicial (10 y 16%), tipo de agitación (agitador magnético, agitador orbital), velocidad de agitación (v_{agit}) (alta, baja), tiempo de agitación (10 y 30 min), temperatura de agitación (T_{agit}) (30 y 50 °C), velocidad de centrifugación (v_{cent}) (100 y 150xg), tiempo de centrifugación (t_{cent}) (5 y 10 min), temperatura de centrifugación (T_{cent}) (20 y 30 °C) y porcentaje de -CD (% -CD) adicionado a la muestra (0,5 y 1,5%), con el objetivo de encontrar los factores que influyen significativamente sobre el proceso de extracción del Col. Para tal fin se utilizó un diseño de experimentos Plackett-Burman, un tipo especial de diseño factorial fraccionario útil cuando existen múltiples factores en estudio y que permite estudiar hasta 11 variables con un mínimo de 12 experimentos [109]. En la Tabla 3.3 se muestra el diseño experimental propuesto en términos de las variables no codificadas.

Tabla 3.3: Diseño experimental Plackett-Burman realizado para el estudio de los factores que pueden afectar la extracción del Col

	%MG	Tipo de Agitación	v_{agit}	t_{agit} (min)	T_{agit} (°C)	v_{cent} (xg)	t_{cent} (min)	T_{cent} (°C)	% -CD
1	10	orbital	baja	10	30	500	10	30	0,5
2	16	magnética	alta	10	30	300	10	30	1,5
3	10	magnética	baja	30	50	500	5	30	1,5
4	10	orbital	alta	30	30	500	10	20	1,5
5	16	magnética	alta	30	30	500	5	20	0,5
6	16	orbital	baja	30	30	300	5	30	1,5
7	16	magnética	baja	10	50	500	10	20	1,5
8	16	orbital	baja	30	50	300	10	20	0,5
9	16	orbital	alta	10	50	500	5	30	0,5
10	10	magnética	alta	30	50	300	10	30	0,5
11	10	orbital	alta	10	50	300	5	20	1,5
12	10	magnética	baja	10	30	300	5	20	0,5

3.2.6.4.2 Optimización: Diseño Central Compuesto

Este tipo de diseño permite optimizar un proceso o producto con un mínimo de experimentos permitiendo determinar las condiciones que se requieren para obtener un resultado con características deseables u óptimas [110].

A partir de las CB iniciales se investigó la influencia sobre el nivel de %ExtCol de los factores que resultaron ser significativos en el diseño exploratorio: %MG inicial, t_{agit} , T_{agit} y % -CD adicionado a la muestra, con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas para este proceso [8, 111-112]. En la Tabla 3.4 se muestra el diseño de optimización propuesto.

Tabla 3.4: Diseño experimental de optimización propuesto.

	%MG	% -CD	T _{agit} (°C)	t _{agit} (min)
1	10	1,5	30	10
2	16	1,5	50	10
3	10	0,5	30	10
4	13	1,0	60	20
5	13	1,0	40	20
6	10	1,5	30	30
7	10	0,5	50	30
8	16	0,5	50	30
9	13	0	40	20
10	16	0,5	30	10
11	16	1,5	50	30
12	16	0,5	50	10
13	10	0,5	30	30
14	13	1,0	40	20
15	13	1,0	40	20
16	18	0,5	40	20
17	13	1,0	20	20
18	13	1,0	40	20
19	13	1,0	40	20
20	13	1,0	40	0
21	16	0,5	30	30
22	13	2,0	40	20
23	13	1,0	40	40
24	16	1,5	30	30
25	10	0,5	50	10
26	16	1,5	30	10
27	8	1,0	40	20
28	10	1,5	50	10
29	10	1,5	50	30
30	13	1,0	40	20

3.2.6.4.3 Validación

Luego de obtener las condiciones óptimas para la extracción del Col a través del diseño de optimización, se debe realizar un último experimento de verificación para validar las condiciones presuntas como óptimas en el correspondiente diseño experimental.

3.2.7 Aplicación de las estrategias de extracción del colesterol y de fortificación en la elaboración de un producto lácteo

3.2.7.1 Desarrollo de un queso fresco tipo Cuartirolo con contenido reducido de colesterol y fortificado con zinc

Teniendo en cuenta los resultados de la optimización de los factores que influyen significativamente sobre el %ExtCol detallado precedentemente, se procedió a elaborar un queso fresco tipo Cuartirolo con contenido reducido de Col. Los mismos fueron elaborados en la plata piloto de lácteos perteneciente al Instituto de Tecnología de los Alimentos (ITA), Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral.

3.2.7.1.1 Preparación de las cremas base con contenido reducido de colesterol

Para obtener una CB al 10% de MG fueron pesadas las cantidades necesarias de crema de leche (48%MG) y de leche descremada (%MG despreciable). Luego la CB fue calentada hasta alcanzar los 70 °C y fue homogeneizada en un homogeneizador a válvula de dos etapas (Simes S.A.), a una presión total de 100 atm.

Una vez homogeneizada la CB, fue termostatizada a 30 °C y luego se le adicionó la -CD (1% de -CD cada 3,5% de MG). Todo el sistema fue dejado en agitación por 30 min. Luego, el sistema fue centrifugado a 700xg por 15 min en una centrífuga (Mistral), con temperatura controlada, con el objetivo de precipitar el complejo -CD/Col y lograr separar así la CB con contenido reducido de Col.

Antes y después del proceso de extracción fueron tomadas muestras de CB para cuantificar el %ExtCol, según el protocolo propuesto en el apartado 3.2.6.3.

3.2.7.1.2 Proceso de elaboración del queso fresco tipo Cuartirolo

Las CB sin y con contenido reducido de Col (CB-CRC) fueron llevadas al 3% de MG con el agregado de leche descremada obteniendo mezclas base para la elaboración del queso (MBQ). Estas MBQ fueron pasteurizadas por calentamiento a 65 °C durante 20 min. La MBQ pasteurizada fue enfriada a 40 °C y llevada a baño termostatizado a esa temperatura para dar comienzo a la elaboración de los quesos. La misma se llevó a cabo según el diagrama de flujo mostrado en la Figura 3.8. El Zn²⁺ fue adicionado a una razón de 16 mg de Zn²⁺ por kilo de MBQ, antes de la adición del agente coagulante.

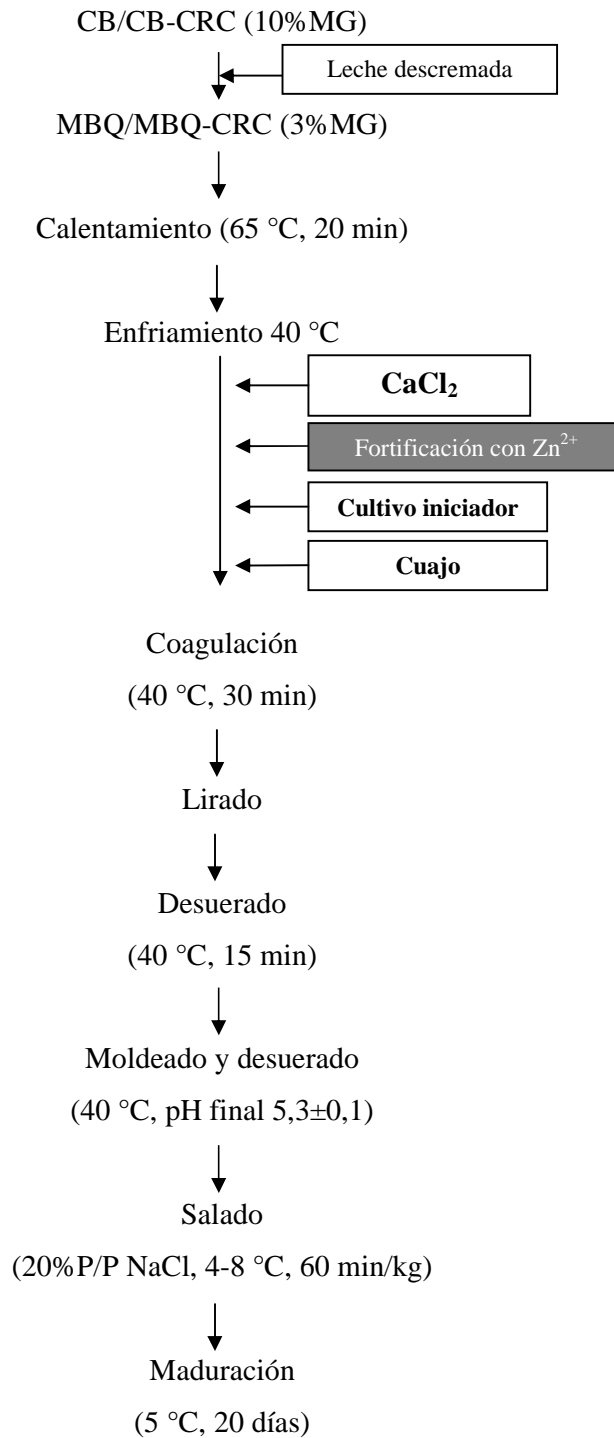


Figura 3.8: Diagrama de flujo del proceso de elaboración de los quesos.

Se prepararon quesos sin tratamiento (QST) elaborados a partir de CBQ no sometidas al tratamiento de extracción de Col, y quesos con contenido reducido de Col (QCRC), los cuales se prepararon con las MBQ reducidas en Col (MBQ-CRC), así como los quesos fortificados con distintas sales de Zn^{2+} : con $ZnSO_4$ (QZnSO₄) y con

ZnCl₂ (QZnCl₂). Ambas sales utilizadas para fortificar pertenecen a la lista de compuestos reconocidos como GRAS y son aptas para ser utilizadas en alimentos [61].

3.2.7.2 Análisis composicional de los quesos

3.2.7.2.1 Determinación de la humedad

El contenido de agua de los quesos fue determinado en forma indirecta por diferencia de pesada. Para esto, se pesaron 2 g de cada una de las muestras de queso (se registró el peso exacto en todos los casos), y se colocaron en cápsulas de porcelana. Cada una de éstas fue llevada a la estufa a una temperatura de 104±1 °C con la finalidad de evaporar el agua de la muestra. Se hicieron pesadas periódicas de las muestras hasta alcanzar peso constante. Antes de cada pesada, las cápsulas recién retiradas de la estufa fueron dejadas en un desecador hasta que las mismas se enfriaron.

El porcentaje de humedad se calculó como:

$$\%Humedad = \left(\frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \right) 100 \quad (3.11)$$

siendo m₀ el peso de cada cápsula de porcelana, m₁ la masa inicial de queso que se pone en cada cápsula para ser llevada a la estufa y m₂ el peso final constante alcanzado por cada muestra de queso luego del paso por la estufa. Cada determinación se realizó por triplicado.

3.2.7.2.2 Determinación de cenizas

Las cenizas son los residuos inorgánicos de los alimentos que permanecen en la muestra posterior a la ignición u oxidación completa de la materia orgánica. Proporcionan una estimación del total de minerales presentes en la muestra del alimento. Los minerales se encuentran en forma de óxidos, sulfatos, fosfatos, nitratos, cloruros y otros haluros. Por ello, el contenido en cenizas sobreestima el contenido mineral total [17].

La determinación del porcentaje de cenizas (%Cenizas) de las muestras de queso se realizó de acuerdo al método oficial de la Asociación de Químicos Analíticos (AOAC) [113]. Para llevar a cabo las determinaciones del contenido de cenizas se pesaron con precisión en balanza analítica 2-2,5 g de cada una de las muestras de queso en una cápsula de porcelana. El peso exacto de la muestra fue registrado como m₁. Las cápsulas conteniendo las muestras fueron llevadas al mechero en donde se secaron y carbonizaron, evitando proyecciones de muestra fuera de las cápsulas. Luego fueron

colocadas en una mufla a (511 ± 1) °C por 2 h, donde las muestras se calcinaron obteniéndose como resultado cenizas blancas. Las cápsulas fueron retiradas de la mufla y enfriadas en desecador. Finalmente se registró el peso de las cápsulas con las cenizas obtenidas (m_2). El %Cenizas se obtuvo de aplicar la fórmula 3.12, donde m_0 es el peso de cada cápsula luego de ser dejada por 30 min en la mufla a la temperatura de calcinación de las muestras.

$$\% \text{Cenizas} = \frac{(m_2 - m_0)}{m_1} 100 \quad (3.12)$$

3.2.7.2.3 Determinación del contenido de zinc en los quesos

El contenido de Zn^{2+} de los quesos fue cuantificado mediante espectroscopía de absorción atómica a partir de las cenizas obtenidas de los mismos. Dicho análisis se llevó a cabo como servicio en el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) de la ciudad de Rosario, acorde al método oficial de la AOAC [113].

Los valores correspondientes a los porcentajes de fortificación con Zn^{2+} (%Fortificación Zn^{2+}) fueron calculados a partir de la ecuación 3.13.

$$\% \text{Fortificación } \text{Zn}^{2+} = \frac{[\text{Zn}^{2+}]_{\text{QF}} - [\text{Zn}^{2+}]_{\text{QCRC}}}{[\text{Zn}^{2+}]_{\text{max}}} 100 \quad (3.13)$$

donde $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{QF}}$ y $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{QCRC}}$ son las concentraciones de Zn^{2+} presentes en los quesos fortificados (QZnSO_4 y QZnCl_2) y en el QCRC respectivamente, y $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{max}}$ es el valor de concentración de Zn^{2+} teórico que debería de haberse encontrado en los quesos si todo el Zn^{2+} adicionado hubiera quedado en el producto (100% de fortificación).

3.2.7.3 Ensayos funcionales de los quesos

Las propiedades funcionales de los quesos son aquellas que les confieren aptitudes para su almacenamiento, conservación, presentación y preparación culinaria. Se ha descrito un número elevado de propiedades funcionales en los quesos que dependen del tipo de queso considerado. Como ejemplos se puede mencionar entre las propiedades funcionales: derretibilidad, viscosidad, color y cremosidad. La composición y microestructura del queso son responsables de las propiedades funcionales y sensoriales. Además, está bien documentado que las propiedades funcionales de los quesos se ven afectadas por las condiciones de elaboración y maduración de los mismos [114-116]

3.2.7.3.1 Ensayo de capacidad de fusión (derretibilidad) de los quesos

Particularmente, la derretibilidad o extensión durante el fundido se refiere a la capacidad de trozos de queso de fluir formando una masa derretida cuando aquellos se calientan. Existen diversas formas de medir el fundido descritas en la bibliografía, la más conocida consiste en calentar un cilindro estándar de queso dispuesto sobre un plato en un horno, durante un tiempo y a una temperatura determinada y, posteriormente, medir el incremento del diámetro del cilindro [117].

En cada ensayo se emplearon cilindros de queso de 37 mm de diámetro y 12 mm de altura obtenidos a no menos de 1 cm de cada borde. Se descartaron aquellos que presentaron una variación de la masa mayor al 5%. Como superficie de ensayo se adoptó una placa de Petri. El ensayo se realizó en una estufa con convección natural de aire, cuya superficie se encontraba nivelada previo a cada ensayo de fusión, con el objeto de que la muestra de queso se desplace, una vez fundida, con la misma facilidad en todas las direcciones posibles.

Las muestras se mantuvieron a 4 °C durante 30 min antes del ensayo de fusión. Posteriormente, se sometieron al ensayo de fusión propiamente dicho a 130 °C durante 15 min. Dicha temperatura fue elegida en función de que en ensayos anteriores se comprobó que este valor era el más apropiado para producir el ablandamiento y escurrimiento del queso fresco, sin quemado de bordes o pardeamiento de la superficie. Transcurrido ese tiempo, las muestras fueron retiradas de la estufa y enfriadas a 4 °C. Posteriormente se procedió a determinar las áreas, por triplicado, para cuantificar la capacidad de fusión de los quesos. Los ensayos de fusión se realizaron en los quesos con 20 días de maduración.

3.2.7.3.2 Evaluación del color de los quesos

El color es considerado uno de los atributos más importantes de la apariencia del alimento. Este parámetro está asociado con la composición y condiciona la aceptación de los alimentos por parte de los consumidores [118].

Se tomaron imágenes de las distintas muestras de quesos, bajo las condiciones de iluminación apropiadas [119], usando una cámara de alta resolución (Canon EOS Rebel T3). Estas imágenes fueron procesadas haciendo uso del programa Photoshop [120], con la finalidad de obtener los parámetros L^* , a^* y b^* , en donde L^* es la luminosidad y adquiere los valores de 0 (negro) a 100 (blanco), y los parámetros a^* ((-)verde al rojo(+)) y b^* ((-)azul al amarillo(+)) son los componentes cromáticos que

adquieran los valores que van desde -120 a +120 [121]. Además, se calculó el índice de blancura (IB) de las muestras como se muestra en la ecuación 3.14, en donde este parámetro indica la variación del blanco al amarillo [122].

$$IB = L^* - 3b^* \quad (3.14)$$

3.2.7.4 Determinación de la firmeza

Mediante un test de penetración fue determinada la firmeza cuando la sonda elegida para el ensayo penetró en 10 mm a los quesos en estudio.

Para esto, muestras cilíndricas de 4 cm de diámetro fueron penetradas por un cilindro de 2 cm de diámetro, a temperatura ambiente (20-21 °C), a una velocidad de 10 mm/min, usando un equipo Multitest 2.5-d (Mecmesin), acoplado a un dinamómetro digital, equipado con una celda de carga de 100 N. Todos los ensayos de penetración fueron llevados a cabo en el centro de las muestras. Fueron realizadas 5 determinaciones para cada tipo de queso analizado, siempre con una muestra nueva [123].

3.2.7.5 Estudio de la microestructura de los quesos por microscopía confocal

La microscopía confocal ha sido ampliamente usada para estudios de la microestructura de los alimentos [124-125].

Muestras de queso, de 5 mm x 5 mm x 2 mm de espesor aproximadamente, fueron colocadas en cubre objetos de 24 mm x 32 mm y luego teñidas con una gota (50 µL) de una solución de rodamina B (0,01 mg/mL), que se une a las proteínas, otorgándoles color rojo [126]. Se trabajó con un microscopio confocal Nikon Eclipse TE-2000-E en donde fueron tomadas imágenes de áreas representativas de las muestras usando una magnificación de la lente objetivo de 60X (de inmersión en aceite) y una apertura numérica de 1,4.

Los archivos de las imágenes digitales fueron adquiridos con una resolución en pixel de 1024x1024, en donde 1 pixel equivale a 0,2 µm. Estas imágenes fueron almacenadas con el programa EZ-C1 desarrollado por Nikon y luego fueron exportadas a formato TIFF o JPG para ser analizadas.

Para cada una de las imágenes obtenidas de los quesos se calcularon, utilizando un programa específico diseñado en lenguaje Phyton, cuatro parámetros de textura que son los más difundidos en la literatura: entropía de Shanon (S), suavidad (K), uniformidad (U) y variancia (σ^2 (N)) [127]:

$$S = \sum_{i=0}^{L-1} p^2(N_i) \log_2(p(N_i)) \quad (3.15)$$

$$U = \sum_{i=0}^{L-1} p^2(N_i) \quad (3.16)$$

$$K = 1 - \frac{1}{1 + \frac{(\sigma^2(N))}{(L-1)^2}} \quad (3.17)$$

donde $p(N_i)$ es la frecuencia estadística muestral normalizada de la escala de grises y L es el máximo nivel de negro. Un valor máximo de U implica que en la imagen analizada los valores de las intensidades del color gris son iguales y parejos. Por el contrario, el valor de S es una medida de la variación del histograma de grises y adquiere un valor máximo en una imagen que contiene todas las escalas de grises con igual probabilidad. En general, K es una estimación de la falta de dispersión en las escalas de grises y, por lo tanto, cuando la variancia de las tonalidades de gris ($\sigma^2(N)$) tiende a 0, K tiende a 0 también. Sin embargo, cuando K tiende a 1, $\sigma^2(N)$ tiende a un valor máximo. En consecuencia, un valor alto de S y un valor bajo de U corresponden a estructuras en donde las partículas están bien definidas en sectores. Mientras que valores bajos de S y altos de U se relacionan con partículas dispersas en todo el volumen de la muestra analizada [128].

El tamaño de poro se calculó acorde a lo explicado en el apartado 3.2.5.1.2.

3.2.7.6 Análisis sensorial de los quesos

El análisis sensorial comprende una variedad de herramientas poderosas y sensibles para determinar la aceptación por parte de los consumidores de los alimentos [129]. En el presente trabajo, el mismo fue realizado por el panel sensorial entrenado de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral. Muestras de aproximadamente 30 g, codificadas aleatoriamente y termostatizadas a 10 °C, fueron evaluadas a los 25 días de maduración por 9 panelistas entrenados en la evaluación sensorial de este tipo de productos.

Los descriptores se evaluaron en escalas continuas de 10 cm, no estructuradas, ancladas en los extremos. La Tabla 3.5 indica los descriptores y extremos utilizados. A continuación se detallan algunas definiciones que se tuvieron en cuenta para poder evaluar los descriptores:

- Elasticidad: recuperación de la forma cuando cesa la presión de los dedos.

- Adherencia (pegajosidad): medición de la fuerza necesaria para remover completamente el producto del paladar usando la lengua luego de masticar varias veces la muestra, apretándola posteriormente contra el paladar.
- Dureza: fuerza necesaria para comprimir la muestra entre las muelas.
- Cohesividad: grado en el cual una sustancia puede ser deformada antes de su ruptura.
- Masticabilidad: esfuerzo requerido para masticar un producto hasta estado de deglución.
- *Flavor* residual: sensación olfato-gustativa que aparece después de la eliminación del producto y que difiere de las sensaciones percibidas cuando éste estaba en la boca.
- Astringencia: sensación compleja percibida por la contracción de los tejidos de la lengua y de las encías, percibida también como una sensación de resecamiento parcial de la mucosa bucal.

Tabla 3.5: Descriptores y referencias utilizadas en la evaluación sensorial de los quesos frescos.

Descriptor	Referencias	
Olor (a crema)	1 = suave	9 = intenso
Color (característico)	1 = blanconeutro	9 = amarillento
Aspecto de la masa	1 = con agujeros	9 = ciega
Elasticidad	1 = casi nada	9 = mucha
Adherencia (pegajosidad)	1 = casi nada	9 = mucha
Cohesividad	1 = budín	9 = salchicha
Masticabilidad	1 = casi nada	9 = mucha
Sensación al paladar	1 = áspera	9 = cremosa
Gusto dulce	1 = casi nada	9 = mucho
Gusto salado	1 = suave	9 = intenso
Gusto amargo	1 = casi nada	9 = mucho
Gusto ácido	1 = casi nada	9 = mucho
Sabor a crema	1 = suave	9 = intenso
Sabor metálico	1 = casi nada	9 = mucho
Astringencia	1 = leve	9 = intensa
<i>Flavor</i> residual (a crema, metálico, astringente, amargo y picante)	1 = casi nada	9 = mucho

Los valores promedio de los descriptores se analizaron estadísticamente para cada tipo de queso estudiado mediante un test ANOVA y un test de LSD (mínima diferencia significativa).

3.2.8 Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado. El análisis estadístico fue hecho con los programas Sigma Plot (versión 12.0) y Design Expert (versión de prueba 6.0.10). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas a valores de $p < 0,05$ (95% de confianza).

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PARTE A: Evaluación de sistemas modelo formados por proteínas lácteas y cosolutos de interés para la industria alimentaria

4.1 Estudio comparativo del efecto de la goma guar y de la goma espina corona

4.1.1 Evaluación de la interacción proteína - polisacárido

4.1.1.1 Espectroscopía de fluorescencia nativa

Se analizó la existencia de cambios conformacionales de las PL mediante la evaluación de los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca en ausencia y en presencia de distintas concentraciones de los GM en estudio. Como muestra la Figura 4.1, tanto para el caso de la adición de GG como de GEC, se puede observar un ligero aumento de la IF a la λ máxima de emisión del sistema (~ 335 nm). Este incremento puede ser atribuido al efecto del aumento en la viscosidad del medio como consecuencia de la presencia de los GM, hecho que desfavorecería la desexcitación por mecanismos no radiantes. Por otro lado, no se observó un corrimiento en los máximos de emisión de los espectros, por lo que la presencia de estos HC no estaría afectando el microentorno de los fluoróforos (Trp).

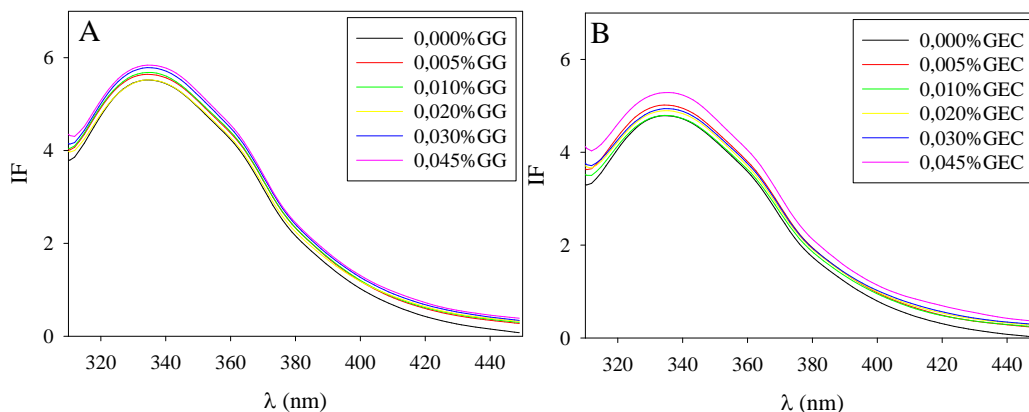


Figura 4.1: Espectros de fluorescencia intrínseca de las PL en medio TRIS-HCl 10 mM, pH 6,4 a 35 °C, en presencia de distintas concentraciones de GM (0-0,045% P/V). A) Sistemas PL-GG B) Sistemas PL-GEC.

Se ha reportado la disminución de la IF nativa de proteínas por *quenching* colisional ante la adición de polisacáridos al medio, lo que se atribuiría a algún tipo de interacción molecular entre ambos biopolímeros, tal como describieron Cheng y col. para los sistemas PL-carboximetilcelulosa [130]. La ausencia de *quenching* colisional

ante la adición tanto de la GG como de la GEC al medio, indicaría la ausencia de interacción entre las PL y los GM en estudio.

4.1.1.2 Hidrofobicidad superficial

Se determinó el cambio en la S_0 de las proteínas en presencia de los GM utilizando la sonda fluorescente ANS. El cambio en los valores de S_0 está vinculado con el grado de interacción o exclusión preferencial de cada GM con la superficie proteica. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.2.

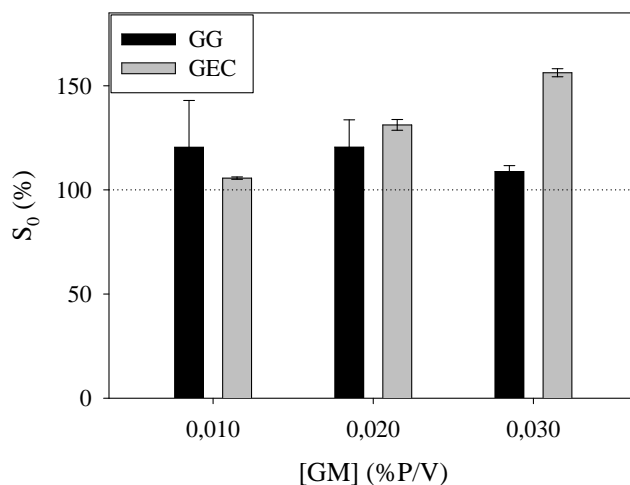


Figura 4.2: Efecto de la adición de los GM en estudio (0-0,03%P/V) sobre la S_0 de las PL en medio TRIS-HCl 10 mM, pH 6,4 a 35 °C. El valor de S_0 de 100% (en línea punteada) representa la S_0 en ausencia de los GM.

Se puede observar que existe el mismo efecto para ambos polisacáridos: la S_0 aumenta en presencia de GG y GEC. Este resultado estaría indicando que tanto la GG como la GEC se estarían excluyendo de la superficie proteica y, por lo tanto, no estarían interaccionando con las PL. Las PL por su parte, tenderían a exponer más superficie hidrofóbica en donde se uniría el ANS. Si los GM en estudio interaccionaran con la superficie proteica sería de esperar un descenso del valor de S_0 como se observa, por ejemplo, en el caso de los sistemas PL-carboximetilcelulosa [130].

Este efecto de exclusión de los GM de la superficie proteica, en el caso de la GEC, aumenta con el aumento de su concentración.

4.1.1.3 Extinción de la fluorescencia con acrilamida

Se estudió la extinción de la fluorescencia nativa de las PL utilizando acrilamida como agente extintor, los datos se ajustaron según el modelo de Eea, según se explicó en la sección 3.2.2.3. Los resultados para los sistemas PL-GG y PL-GEC se muestran en las Figuras 4.3 A y B respectivamente.

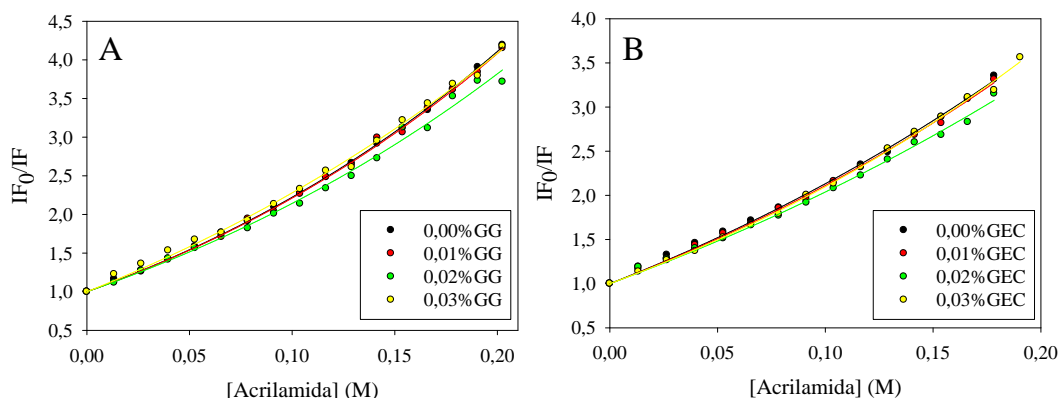


Figura 4.3: Gráficas de Stern-Volmer de los sistemas A) PL-GG y B) PL-GEC. Se ajustaron los datos experimentales al modelo de esfera de acción.

Al analizar los diferentes sistemas PL-GM, no se presentaron diferencias significativas (grado de significancia del 95%) entre los parámetros K_D y Rea calculados a partir del ajuste de los datos al modelo de Eea, con valores de $p=0,210$ para el caso de los sistemas PL-GG y de $p=0,362$ para los sistemas PL-GEC. Esto indica que la presencia de ambos GM no modifica la accesibilidad de la acrilamida a los cromóforos proteicos. Los valores obtenidos de K_D y Rea fueron $7,8 \pm 0,8 \text{ M}^{-1}$ y $9,6 \pm 0,6 \text{ nm}$ respectivamente para los sistemas PL-GG y $7,1 \pm 0,9 \text{ M}^{-1}$ y $9,1 \pm 0,9 \text{ nm}$ para los sistemas PL-GEC.

4.1.1.4 Carga superficial proteica

La medición de los valores de potencial es una herramienta útil para el estudio de las interacciones entre proteínas y polisacáridos [130]. En la Figura 4.4 se muestran los resultados de la medición del potencial de las PL ante la adición de los distintos GM en estudio.

Se obtuvieron valores de $-23 \pm 3 \text{ mV}$ para las muestras conteniendo las PL en ausencia de los GM. La adición de GG y de GEC a las muestras de PL no resultó ser significativa para los valores de potencial obtenidos (grado de significancia del 95%) con

valores de $p=0,271$ y de $p=0,604$ para la GG y la GEC respectivamente. Esto estaría indicando que tanto la GG como la GEC no modificarían la carga superficial de las PL y, por lo tanto, su estabilidad electrostática en solución.

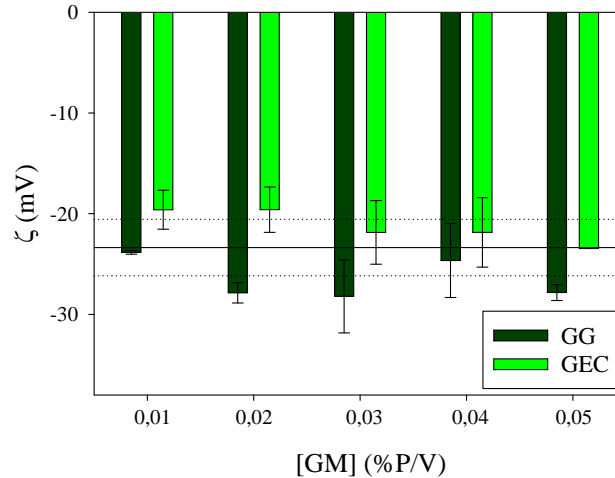


Figura 4.4: Potencial ζ de las muestras conteniendo una concentración de PL de 0,1 g/L con y sin la adición de distintas concentraciones de los GM en estudio (0-0,05%P/V), en medio TRIS-HCl 10 mM, pH 6,4 a 35 °C. Las líneas horizontales que aparecen en el gráfico representan el valor correspondiente al ζ de las PL en ausencia de los GM (-23 ± 3 mV).

Estos resultados concuerdan con lo sugerido por los espectros de fluorescencia nativa, los estudios de S_0 y de *quenching*, que sugieren la ausencia de interacción entre los GM en estudio y las PL.

4.1.2 Evaluación reológica de las mezclas proteínas lácteas-galactomanano

4.1.2.1 Comportamiento reológico de las mezclas proteínas lácteas-galactomanano

La leche tiene un comportamiento reológico correspondiente a un fluido Newtoniano, es decir, la η de ésta es independiente de la $\dot{\gamma}$ utilizada en las mediciones [93]. En la Figura 4.5 se muestran los gráficos de η vs. $\dot{\gamma}$ para los sistemas PL-GG (A) y PL-GEC (B). En los mismos se puede observar que, en ausencia y en presencia de bajas concentraciones de ambos GM (0,0500% para la GG y 0,0750% para la GEC), las mezclas de PL-GM presentan un comportamiento de flujo newtoniano, esto es debido a que predomina el efecto de las PL por sobre el efecto de los GM. Por el contrario, a concentraciones mayores de GG y GEC predomina el efecto de los GM por sobre el de las PL, dando por resultado un comportamiento pseudoplástico. En este tipo de comportamiento de flujo se observa una disminución del valor de la η a altas $\dot{\gamma}$, debido a

que las partículas se orientan en la dirección del flujo disminuyendo así la resistencia al deslizamiento. Este último efecto se evidencia a menores concentraciones en el caso de la GG. Este comportamiento pseudoplástico fue informado por varios autores para soluciones acuosas de los GM en estudio [54, 58].

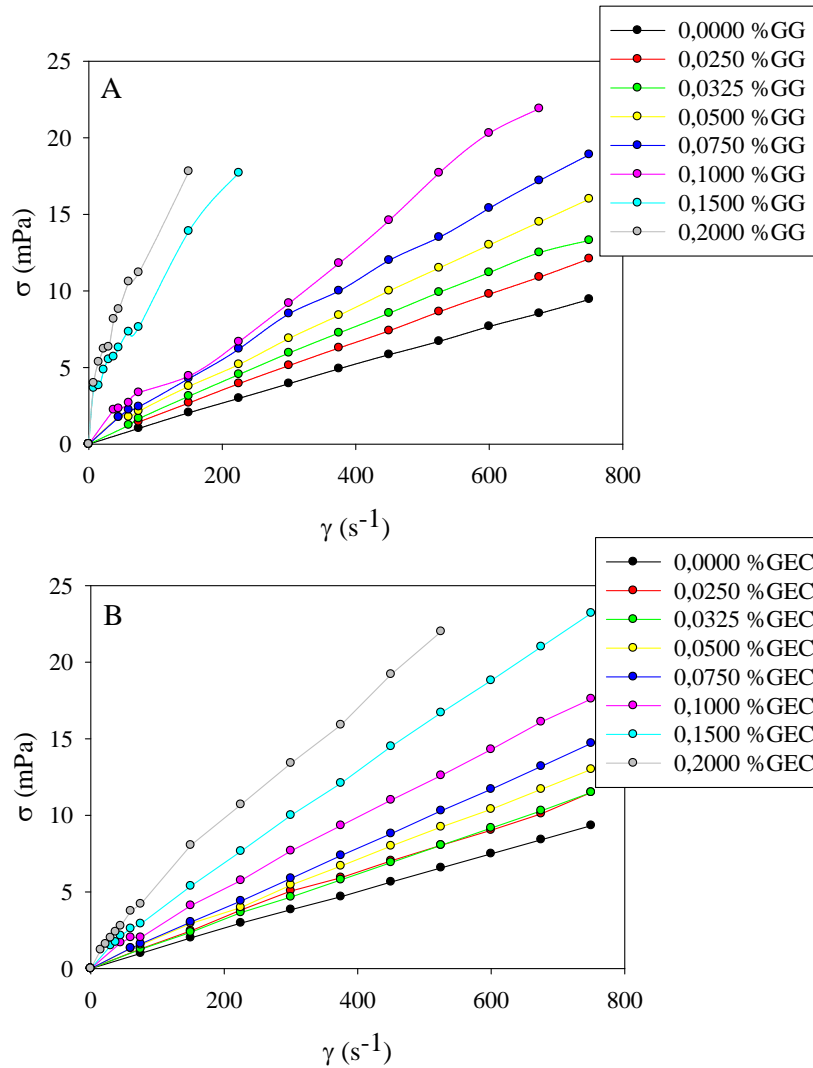


Figura 4.5: Comportamiento reológico de los sistemas A) PL-GG y B) PL-GEC. Todas las determinaciones se realizaron en medio TRIS-HCl 10 mM, pH 6,4 a 35 °C, con una concentración de PL de 0,1 g/L y concentraciones de los GM en un rango de 0-0,2%P/V.

4.1.2.2 Comparación del efecto de los galactomananos sobre la viscosidad de sistemas conteniendo proteínas lácteas

La Figura 4.6 muestra el efecto ocasionado por la presencia de los GM en estudio sobre la de las soluciones de PL. En la misma se observa que ambos HC estudiados, al encontrarse a bajas concentraciones (0,0250%), presentan un efecto

similar sobre la del sistema. A mayores concentraciones, la GG aumenta en mayor medida la que la GEC a una misma concentración de GM.

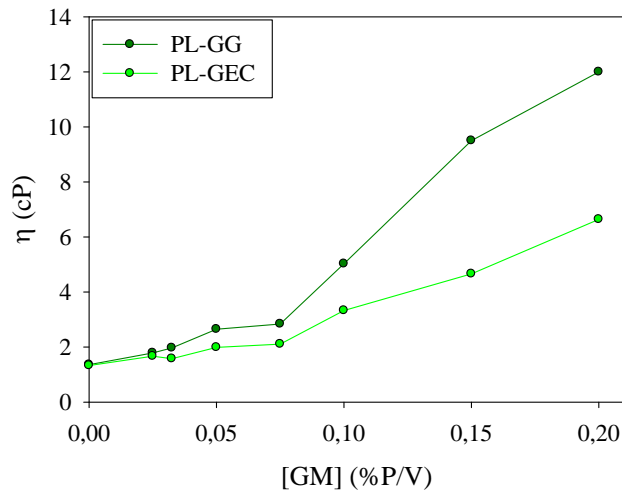


Figura 4.6: Medidas de la viscosidad aparente de los sistemas PL-GG y PL-GEC cuando la se mantuvo en un valor constante de 150 s^{-1} . La concentración de las PL se mantuvo constante en 0,1 g/L mientras que la de los GM varió en el rango de 0-0,20%.

4.1.3 Efecto de la adición de los galactomananos sobre los coágulos de caseínas

Se evaluaron distintas características de los coágulos obtenidos, post acción enzimática del cuajo sobre las MC, frente a la adición de los GM en estudio.

4.1.3.1 Firmeza de los coágulos

Se analizaron los perfiles de los coágulos, formados post acción enzimática del cuajo en ausencia y en presencia de los GM, cuando estos fueron sometidos a un ensayo de penetración. En la Figura 4.7 se exhiben los perfiles de penetrometría de los coágulos de las MC adicionados con diferentes concentraciones de los GM en estudio. Los parámetros firmeza y fuerza de ruptura de éstos se muestran en la Tabla 4.1.

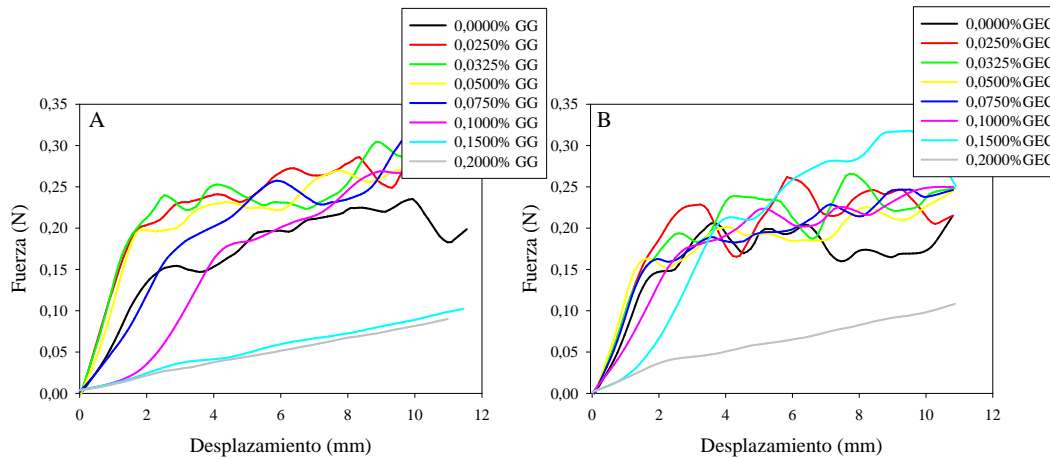


Figura 4.7: Gráficas de Fuerza vs Desplazamiento de la sonda al penetrar los coágulos en presencia de A) GG y B) GEC. Los sistemas en estudio se prepararon con una concentración de PL de 10%P/V y concentraciones variables de los GM dentro del rango 0,0000-0,2000%P/V. En todos los casos los coágulos se obtuvieron adicionando cuajo a los sistemas PL-GM en medio Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 6,4 a 35 °C.

Tabla 4.1: Valor promedio y desvíos estándar de los parámetros de penetración de los coágulos en presencia de GG y GEC.

[GM] (%P/V)	Firmeza (N/mm)		Fuerza de quiebre (N)	
	GG	GEC	GG	GEC
0,0000	0,09±0,03 ^{ab}	0,09±0,01 ^a	0,17±0,02 ^a	0,16±0,02 ^a
0,0250	0,11±0,02 ^a	0,11±0,01 ^{abc}	0,19±0,02 ^a	0,18±0,04 ^{ab}
0,0325	0,13±0,01 ^a	0,10±0,01 ^{abc}	0,2±0,01 ^a	0,17±0,03 ^a
0,0500	0,132±0,009 ^a	0,13±0,01 ^b	0,19±0,01 ^a	0,18±0,02 ^{ab}
0,0750	0,06±0,01 ^b	0,10±0,01 ^{abc}	0,21±0,02 ^a	0,16±0,03 ^a
0,1000	0,016±0,004 ^c	0,09±0,02 ^c	0,5±0,2 ^b	0,16±0,01 ^a
0,1500	0,0080±0,0002 ^c	0,04±0,01 ^d	-	0,24±0,05 ^b
0,2000	0,0078±0,0002 ^c	0,01±0,0003 ^e	-	-

*La misma letra en una misma columna indica que no hay una diferencia significativa entre las muestras analizadas (p 0,05).

Puede inferirse que la firmeza aumenta levemente ante la adición de bajas concentraciones de GG (0,0250-0,0500%P/V) y disminuye luego de añadir concentraciones superiores. Este efecto sobre la firmeza también se observó para los coágulos de MC obtenidos por acidificación con GDL [131]. La fuerza a la cual el coágulo se rompe permaneció sin alteraciones significativas ante la presencia de GG en el rango de concentraciones de 0,0000-0,0750%P/V, aumentando a una concentración de 0,1000%P/V, mientras que a concentraciones superiores a ésta no se pudo observar un punto de ruptura de los coágulos (0,1500-0,2000%P/V). Para el caso de la GEC, se observaron efectos similares a los encontrados para la GG. La firmeza se incrementó

levemente a concentraciones bajas de GEC (0,0250-0,0750%P/V) y luego disminuyó ante la presencia de concentraciones mayores de este GM. La fuerza a la cual se rompió el coágulo no cambió hasta que se adicionó 0,1500%P/V de GEC al sistema, lo que generó un aumento en la fuerza necesaria para romper el coágulo. Para la siguiente concentración ensayada (0,2000%P/V) no se observó ruptura del coágulo.

Una menor fuerza de ruptura de los coágulos estaría indicando una alta fracturabilidad de los mismos y, por ende, que éstos son mecánicamente más débiles y menos resistentes a la penetración [107, 132]. Por otro lado, la falta de la fuerza de ruptura a lo largo del desplazamiento ensayado en el estudio de penetración observada a las concentraciones de 0,1500%P/V y 0,2000%P/V de GG y de 0,2000%P/V de GEC se debería a que, en presencia de estas concentraciones de los GM, resultaría afectado el proceso de coagulación de las MC, obteniéndose coágulos más débiles y/o la no formación de los mismos. La falta de coagulación ocasionada por altas concentraciones de GG (0,1500%P/V) fue previamente reportada para sistemas constituidos por aislados proteicos de proteínas del suero de leche [133].

4.1.3.2 Microestructura de los coágulos

En la Figura 4.8 se muestran imágenes representativas de la microestructura de los coágulos de las diferentes mezclas PL-GM, obtenidas por microscopía confocal. En la misma se puede observar que aparecen en color rojo la malla de red que constituyen las CN, mientras que las zonas en color negro representan la fase no proteica, a la que llamamos “poro” [134]. Se puede observar que, a grandes concentraciones de los GM en estudio, la fase proteica se muestra menos continua e interconectada mientras que la fase no proteica, la que constituye el poro, ocupa mayor volumen. Estos cambios en la microestructura se encuentran relacionados con los cambios observados en los perfiles de penetración.

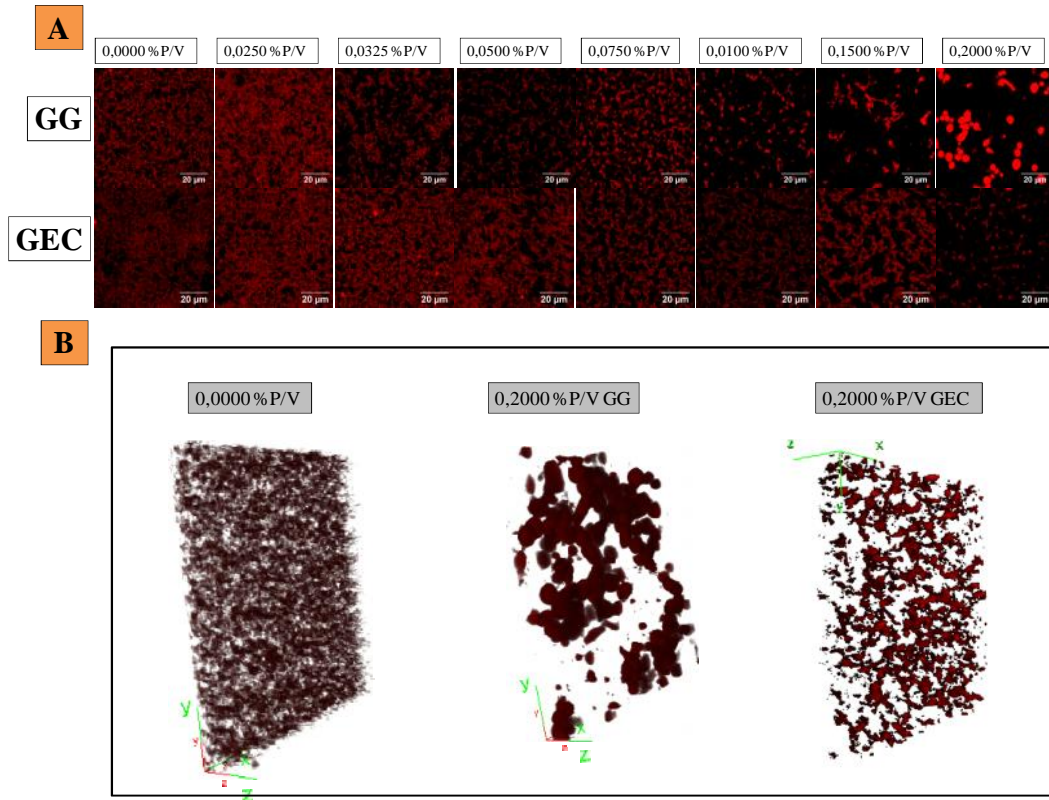


Figura 4.8: A) Imágenes de microscopía confocal de los coágulos de MC en ausencia y en presencia de los GM en estudio (0,0000-0,2000% P/V), tomadas a una profundidad de 1 μm. B) representaciones tridimensionales obtenidas a partir de los *stacks* obtenidos de los coágulos.

En la Figura 4.9 se muestran las variaciones de los parámetros de textura de las imágenes de los coágulos de MC en ausencia y en presencia de GG y GEC, pudiéndose observar para ambos GM una disminución de E y un aumento de H ante el aumento de la concentración de los mismos. Sin embargo, la concentración de GM a la cual ocurren los cambios en los parámetros de textura analizados no es la misma. Para el caso de la GG, estos cambios, con respecto a los coágulos sin la adición de las gomas, se producen a concentraciones menores (0,0325%P/V) que para el caso del agregado de GEC (0,0750%P/V). Puede observarse que, a partir de determinada concentración límite de GM en los sistemas, las partículas proteicas no se encuentren distribuidas homogéneamente en las imágenes y aparecen en sectores determinados, debido a una inversión de fases.

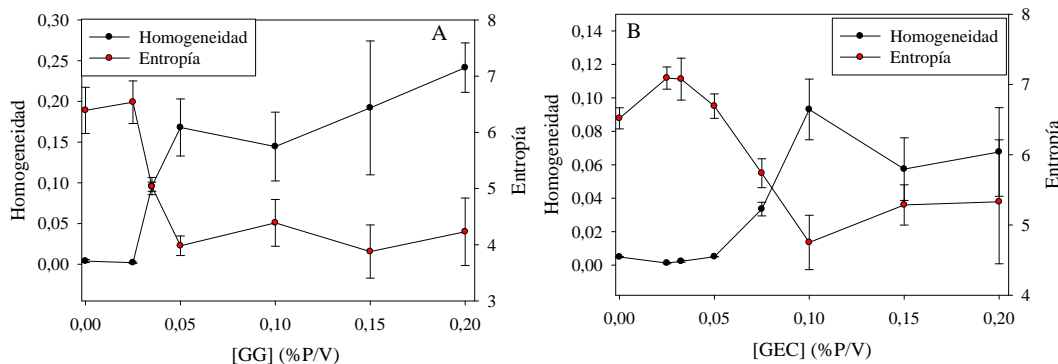


Figura 4.9: Parámetros de textura digital (H y E) obtenidos a partir de las imágenes de microscopía confocal de A) coágulos obtenidos a partir de sistemas PL-GG y B) coágulos obtenidos a partir de sistemas PL-GEC.

Esto podría atribuirse a que, superadas dichas concentraciones límites (0,0325%P/V de GG y de 0,0750%P/V de GEC), ocurriría una microseparación de fases que competiría con el proceso de coagulación. Si bien esta separación de fases no es apreciable macroscópicamente, se debería a la incompatibilidad termodinámica entre ambos biopolímeros. A medida que se incrementa la concentración de GM, la microseparación de fases se hace más intensa dando por resultado que la fase proteica (la red de proteínas) no sea continua, disminuyendo el valor del parámetro H y aumentando el valor de E, resultando en la no formación del coágulo. Contrariamente, en ausencia y a bajas concentraciones de los GM, las partículas se encuentran dispersas más homogéneamente en todo el volumen de la muestra analizada. Esto estaría vinculado a que los sistemas PL-GM en solución se encontrarían formando una sola fase y la microestructura de los coágulos obtenidos a estas concentraciones de GM depende de la cinética de la coagulación. En condiciones de co-solubilidad (bajas concentraciones de los GM), el aumento de la η del medio debido a los GM, disminuye la velocidad de coagulación, permitiendo un reordenamiento de las interacciones CN-CN que conducen a una malla de coágulo más compacta. Este efecto que presenta la GG sobre los coágulos de CN fue reportado para los sistemas NaCAS-GG por Hidalgo y col. [135].

En la Figura 4.10 se muestran los gráficos de cajas obtenidos a partir del análisis de las distribuciones de los tamaños de poro de los coágulos de los sistemas PL-GG y PL-GEC, según el protocolo descrito en la sección 3.2.5.1.2 de Materiales y Métodos.

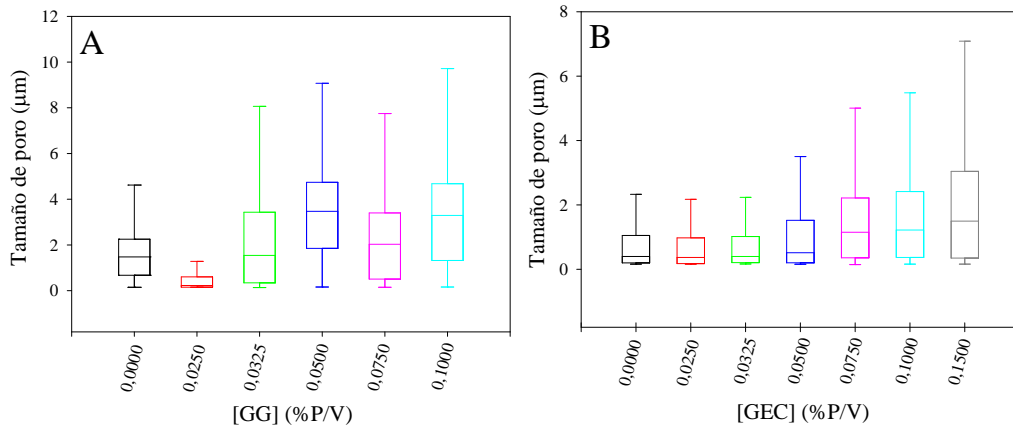


Figura 4.10: Gráfico de cajas de los tamaños de poro obtenidos del análisis de las imágenes de los coágulos en estudio tomadas con un microscopio confocal en ausencia y en presencia de A) GG y B) GEC.

Se observa que la adición de 0,0250%P/V de GG provoca una disminución en los tamaños de los poros debido a que la red proteica está más interconectada, hecho que también se ve reflejado en el aumento de la firmeza observado en el ensayo de penetración. Para concentraciones mayores de GG, las distribuciones de tamaño muestran que el tamaño medio de los poros tiende a valores mayores. En el caso de la GEC, se puede observar que, al aumentar la concentración de este GM, hay una clara tendencia a la obtención de coágulos con tamaños de poro cada vez mayores. No fue posible el cálculo de los tamaños de poro para los sistemas conteniendo 0,1500%P/V y 0,2000%P/V de GG y 0,2000%P/V de GEC ya que, como fuera corroborado por el ensayo de penetración, no se formaron los coágulos a estas concentraciones de GM.

4.1.3.3 Determinación de la capacidad de retención de agua de los coágulos

Se estudió el efecto de la presencia de la GG y la GEC sobre la CRA de los coágulos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.11. En la misma se puede observar que el porcentaje de CRA disminuye con la adición de concentraciones de GG 0,0500%P/V. A concentraciones menores no cambiaron los porcentajes de CRA obtenidos. Este mismo comportamiento fue observado para el caso de coágulos ácidos de los sistemas PL-GG [131], y puede ser atribuido a la incompatibilidad entre las PL y la GG. A medida que aumenta la concentración de GG, tal como se observó en la Figura 4.10, aumenta el tamaño medio de los poros e incluso a las concentraciones más altas no se llegan a formar los coágulos. Cuanto menos interconectada se encuentre la red de

CN, menor será la CRA. Lo mismo ocurrió para los sistemas PL-GEC, pero en el caso de éste último se registraron cambios en la CRA a concentraciones de GEC 0,1000%P/V.

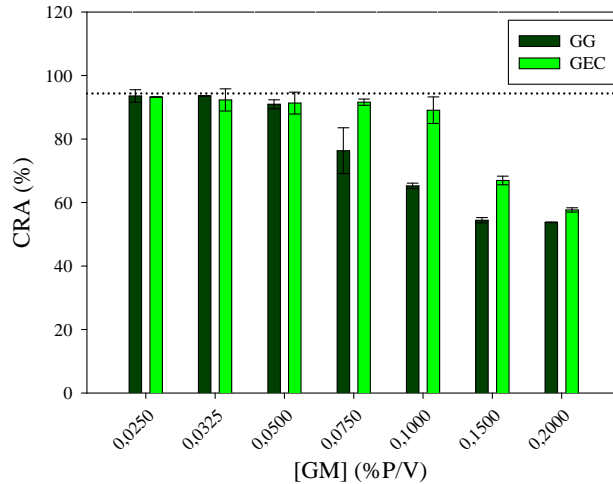


Figura 4.11: CRA de los coágulos obtenidos a partir de mezclas PL-GG y PL-GEC. La línea punteada indica la CRA de los coágulos sin la adición de GM.

4.2 Evaluación de la agregación post enzimática de las caseínas

4.2.1 Efecto de los cosolutos calcio, sacarosa y goma guar sobre la agregación enzimática de las micelas de caseína

Se estudió el efecto de solutos comúnmente adicionados en la elaboración de diversos productos lácteos sobre la agregación post enzimática de las MC inducida por adición de cuajo. Con este fin se analizaron tres factores: concentración de Sac, de Ca^{2+} y de GG sobre las variables respuesta D_f , t_{ag} y β_0 . Los efectos estimados sobre las variables dependientes fueron determinados usando los parámetros estadísticos obtenidos del ANOVA y los valores de p fueron utilizados para confirmar la significancia de dichos factores con un 95% de confianza ($p < 0,05$).

En la Tabla 4.2 se muestran los valores de p obtenidos del ANOVA para cada una de las variables respuestas estudiadas en el diseño experimental. A partir del ANOVA se pudieron obtener ecuaciones modelo que reflejan el comportamiento de las variables respuesta en función de las concentraciones de los cosolutos evaluados.

Tabla 4.2: ANOVA de las respuestas estudiadas en el diseño experimental. Se muestran los valores de p asociados a los factores analizados que resultaron ser significativos para las respuestas estudiadas (p 0,05). También se muestran los valores de p asociados al modelo propuesto y a la falta de ajuste.

	Valores de probabilidad asociada		
	t_{ag}	D_f	θ
Ca^{2+}	-	0,0006	0,0319
Sac	-	-	-
GG	0,0013	0,0316	< 0,0001
Modelo	0,0013	0,0005	< 0,0001
Falta de ajuste	0,0854	0,0826	0,4847

La ecuacion 4.1 vincula el comportamiento de β_0 con los factores estudiados que resultaron ser significativos.

$$\beta_0 = 1,22 + 0,03[Ca^{2+}] + 4,06 [GG] \quad (4.1)$$

El incremento de β_0 indica un aumento del tamaño medio de las MC en suspensión, previo a la adición del cuajo. En el caso del Ca^{2+} , el aumento de la concentración del mismo ocasiona una disminución de la estabilidad electrostática de las MC por disminución de su carga negativa neta [97], lo que induciría la formación de agregados previo a la acción del cuajo, con el consiguiente aumento del tamaño medio de las partículas coloidales. En el caso de la GG, la exclusión de dicho GM de la superficie proteica (sección 4.1.1.2), conduce a un aumento de las interacciones proteína-proteína, conduciendo también a la formación de agregados.

Por otra parte, la presencia de Sac no alteró significativamente los valores de β_0 .

La ecuación 4.2 muestra el modelo para t_{ag} :

$$t_{ag} (s) = 227,87 + 544,78[GG] \quad (4.2)$$

Como puede observarse, la variación de las concentraciones de Sac y Ca^{2+} en los rangos evaluados no resultó significativa para t_{ag} , mientras que dicho parámetro se incrementó al aumentar la concentración de GG. Esto estaría de acuerdo con un importante incremento en la η del medio debida a la presencia de este cosoluto, como fuera reportado en la sección 4.1.2.2. Esto disminuiría la probabilidad de interacción de

las partículas coloidales entre sí debido a la disminución de la velocidad de difusión de las mismas, alargando así el t_{ag} .

Por otra parte, los efectos sobre β_0 deberían provocar el acortamiento del t_{ag} ya que se partiría de MC previamente agregadas (de mayor tamaño medio). Debido a esto, se esperaría que el proceso de agregación fuera más rápido. Sin embargo, por lo comentado previamente, predominaría el efecto que tiene la GG sobre el incremento de la η del medio.

El comportamiento de D_f se modeliza en la ecuación 4.3:

$$D_f = 2,06 + 0,02[Ca^{2+}] + 0,67[GG] \quad (4.3)$$

Solamente los cosolutos Ca^{2+} y GG incrementaron significativamente los valores de D_f , es decir, el grado de compactación de los agregados formados al final del proceso de agregación enzimática, acorde a lo reportado por Dziuba y col. respecto a la estructura fractal de los agregados de CN [136]. El efecto de estos cosolutos sobre D_f está relacionado con la influencia que estos mismos tienen sobre el t_{ag} , ya que al formarse más lentamente los agregados, se posibilita el reordenamiento de las interacciones proteicas con ruptura de algunas y formación de otras nuevas que conducen a la compactación del agregado. Los ajustes de los datos a las ecuaciones modelo reportadas previamente se muestran en forma gráfica en la Figura 4.12.

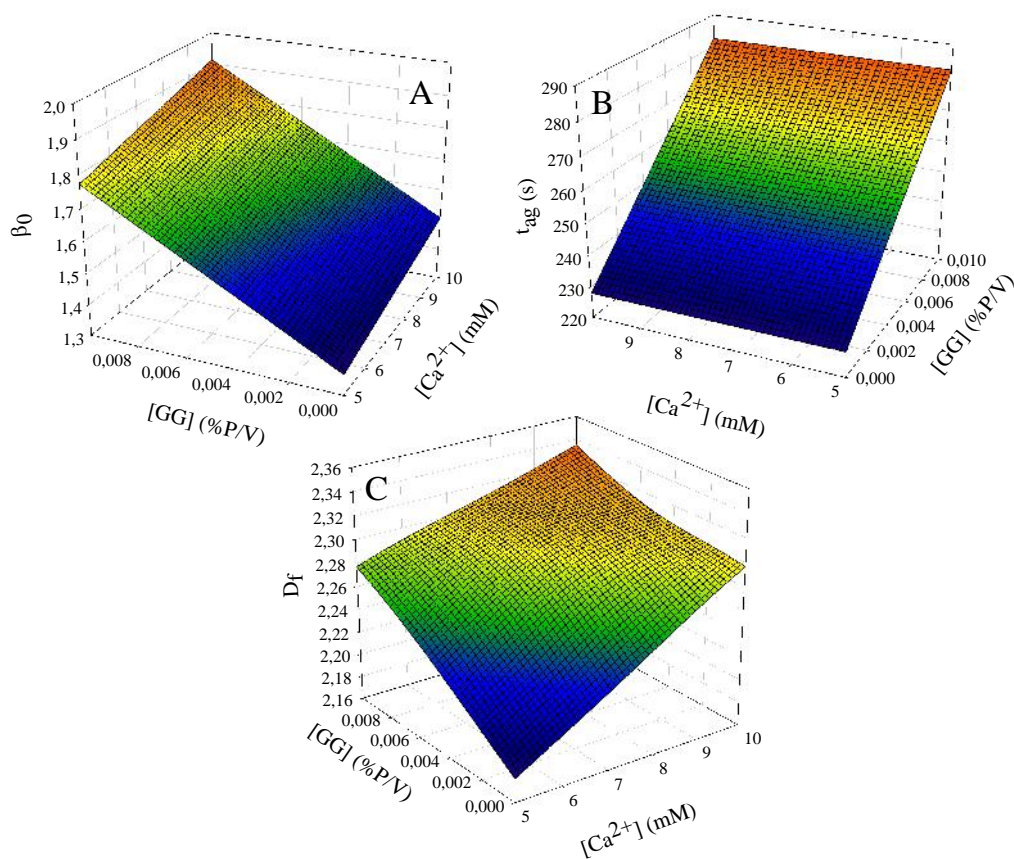


Figura 4.12: Superficies de respuesta que vinculan a A) β_0 , B) t_{ag} y C) D_f con la $[Ca^{2+}]$ y la $[GG]$.

4.2.2 Efecto de los cosolutos calcio, sacarosa y goma espina corona sobre la agregación post enzimática de las micelas de caseína

Se estudió el efecto de Sac, Ca^{2+} y GEC sobre la agregación enzimática de las MC inducida por adición de cuajo utilizando el diseño de experimentos referido en la sección 3.2.4.2.1.

En la Tabla 4.3 se muestran los valores de p obtenidos mediante el test ANOVA para cada una de las variables respuesta estudiadas en el diseño experimental.

Tabla 4.3: ANOVA de las respuestas del diseño experimental. Se muestran los valores de probabilidad asociada a los factores analizados que resultaron ser significativos para las respuestas estudiadas ($p < 0,05$), modelo propuesto y falta de ajuste.

	Valores de probabilidad asociada		
	t_{ag}	D_f	p
Ca^{2+}	-	0,2060	-
Sac	-	-	-
GEC	-	0,2357	< 0,0001
GEC ²	-	0,0038	0,0013
(Ca ²⁺) ²	-	0,0124	-
Modelo	0,2329	0,0048	< 0,0001
Falta de ajuste	0,3237	0,0770	0,7086

Sólo la concentración de GEC afectó el tamaño medio de las MC antes de la adición del cuajo, obteniéndose mayores β_0 (mayor tamaño medio) a medida que aumentaron las concentraciones de GEC. El modelo del efecto de esta variable se muestra en la ecuación 4.4 y en la Figura 4.13.

$$\beta_0 = 1,35 + 5,09[GEC] - 26,02[GEC]^2 \quad (4.4)$$

Por otra parte, ninguno de los cosolutos analizados tuvo influencia significativa sobre la variable respuesta t_{ag} .

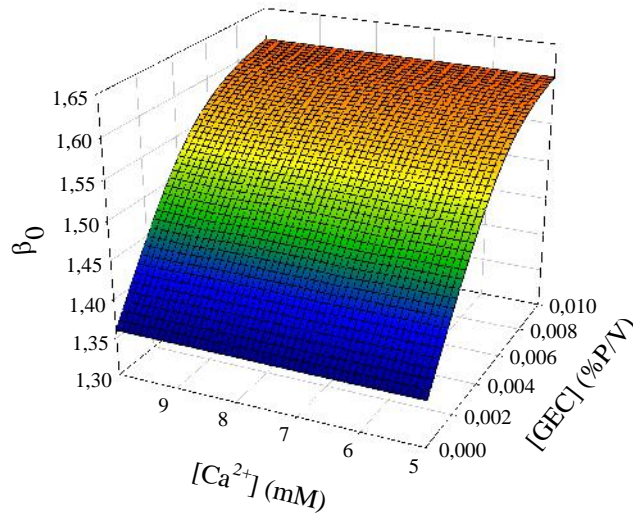


Figura 4.13: Ajuste de la variable respuesta β_0 a los factores que resultaron significativos.

Los factores concentraciones de Ca^{2+} y de GEC tuvieron efecto sobre la respuesta D_f . El comportamiento de D_f se modeliza en la ecuación 4.5.

$$D_f = 1,88 + 0,11[\text{Ca}^{2+}] + 1,74[\text{GEC}] - 0,01[\text{Ca}^{2+}]^2 - 20,23[\text{GEC}]^2 \quad (4.5)$$

Según lo observado en la ecuación modelo propuesta y la Figura 4.14, los factores concentración de Ca^{2+} y de GEC afectan en forma positiva al parámetro D_f de los agregados cuando se encuentran en baja concentración, dando lugar a agregados con mayor grado de compactación. Por el contrario, grandes concentraciones de estos cosolutos afectan de forma negativa al valor de D_f y por ende al grado de compactación, hecho que se ve reflejado por los términos al cuadrado de los factores en la ecuación modelo.

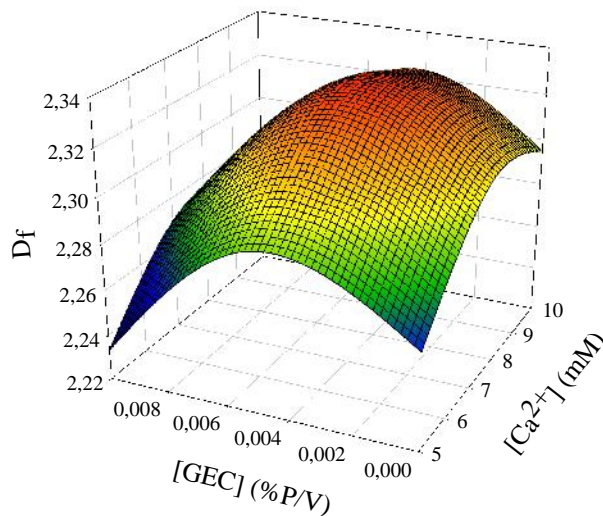


Figura 4.14: Ajuste de la variable respuesta D_f a los factores que resultaron significativos.

4.2.3 Efecto de los iones metálicos calcio, magnesio, zinc y sodio sobre la agregación post enzimática de las micelas de caseína

Se evaluó el efecto de la adición de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} y Na^+ sobre el estado inicial de las MC en solución a través de los cambios en β_0 , sobre el t_{ag} y sobre el grado de compactación de los agregados formados estimado por la D_f , a través de un diseño de experimentos como fuera descrito en la sección 3.2.4.2.2. La Tabla 4.4 muestra los valores de las probabilidades asociadas a los factores que resultaron ser significativos

(p 0,05), así como también los valores de probabilidad asociada a la significancia del modelo y a la falta de ajuste al mismo.

Los resultados indicaron que el efecto de la adición de los distintos cationes dependió tanto de la naturaleza como de la concentración de los mismos. Los estados iniciales de las MC (β_0) no mostraron diferencias significativas ante la adición de los cationes en estudio.

Tabla 4.4: ANOVA de las respuestas estudiadas en el diseño experimental. Se muestran los valores de probabilidad asociados a los factores analizados que resultaron ser significativos para las respuestas estudiadas, al modelo y a la falta de ajuste.

	Valores de probabilidad asociada		
	t_{ag}	Df	o
Ca^{2+}	< 0,0001	0,0983	-
Mg^{2+}	-	0,9401	-
Zn^{2+}	0,2521	0,8872	-
Na^+	< 0,0001	< 0,0001	-
Ca^{2+}/Na^+	< 0,0001	-	-
Zn^{2+}/Na^+	0,0069	0,0365	-
$(Ca^{2+})^2$	-	< 0,0001	-
$(Mg^{2+})^2$	-	0,0005	-
$(Zn^{2+})^2$	-	0,0353	-
Modelo	< 0,0001	< 0,0001	0,6832
Falta de ajuste	0,0607	0,0534	0,2051

En la ecuación 4.6 se muestra la dependencia, en variables no codificadas, del logaritmo natural del t_{ag} con la concentración de los iones que afectaron significativamente a este parámetro. Se seleccionó esta linealización ya que fue la que presentó mejor ajuste considerando la distribución de los residuos.

$$\ln t_{ag} = 5,07 - 0,01[Ca^{2+}] - 2,31[Zn^{2+}] + 0,02[Na^+] - 0,001[Ca^{2+}][Na^+] + 0,036[Zn^{2+}][Na^+] \quad (4.6)$$

En el caso del Ca^{2+} , a medida que se incrementó su concentración en el rango evaluado, disminuyó el t_{ag} . Esto sería consecuencia de la disminución de la estabilidad electrostática de las MC, originalmente con carga neta negativa, por disminución de su potencial de superficie. El mismo efecto se pudo observar, pero en menor medida, para el caso del Zn^{2+} .

Por el contrario, para el Na^+ aumentó el t_{ag} a medida que se incrementó su concentración. En este caso, el aumento de la fuerza iónica del medio en el rango de

concentraciones evaluado puede generar un proceso de *salting-in* y, como consecuencia, la estabilización electrostática de las MC. Estos dos efectos opuestos quedan plasmados en los términos con interacción en la ecuación 4.6.

La adición de Mg^{2+} en el rango de concentraciones estudiado no modificó significativamente al t_{ag} . La Figura 4.15 muestra la dependencia de la variable respuesta t_{ag} en función de las concentraciones de los iones ensayados.

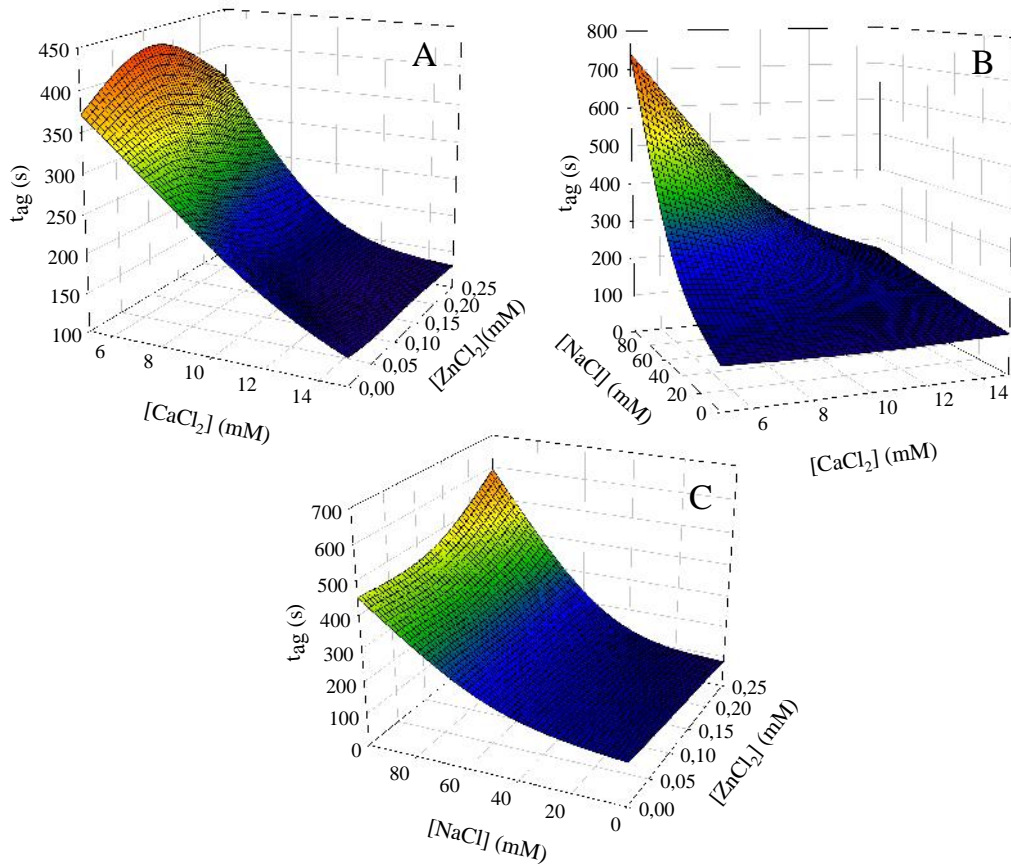


Figura 4.15: Ajuste de la variable respuesta t_{ag} a los factores que resultaron significativos.

En la ecuación 4.7 se muestra el modelado de la respuesta D_f en función de la concentración de los iones estudiados. El ajuste de los datos a esta ecuación se muestra en la Figura 4.16.

$$D_f = 1,92 + 0,06[Ca^{2+}] - 0,023[Mg^{2+}] + 0,79[Zn^{2+}] - 0,0005[Na^+] - 0,003[Ca^{2+}]^2 + 0,002[Mg^{2+}]^2 - 2,27[Zn^{2+}]^2 - 0,004[Zn^{2+}][Na^+] \quad (4.7)$$

El Ca^{2+} y el Zn^{2+} incrementaron el valor de D_f a medida que aumentó su concentración en el medio, es decir, se obtuvieron agregados proteicos con mayor grado de compactación. Este efecto podría estar vinculado a la participación de estos cationes en las interacciones (puentes salinos) que conducen a la compactación de los agregados. Se presentó un valor máximo de D_f a una concentración de 10 mM de Ca^{2+} y de 0,174 mM de Zn^{2+} (en ausencia de Na^+). Superadas estas concentraciones, ambos iones mostraron el comportamiento opuesto que estaría vinculado a su efecto sobre el t_{ag} y al menor tiempo disponible para la compactación de los agregados.

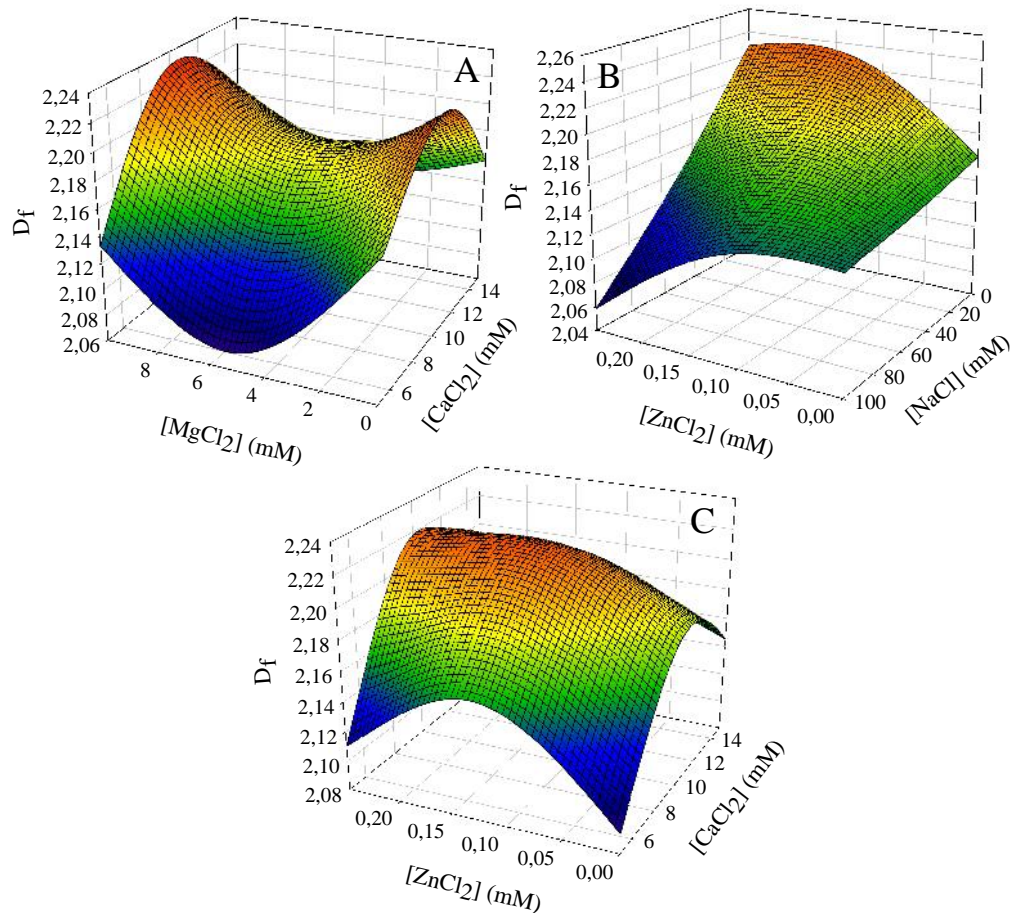


Figura 4.16: Representación gráfica del modelo matemático obtenido del ajuste de la variable respuesta D_f a los factores en estudio.

En forma opuesta, la presencia de Na^+ afectó de forma negativa al parámetro D_f a cualquier concentración, debido probablemente a su efecto sobre el ζ . El Mg^{2+} tuvo un efecto negativo sobre la D_f a bajas concentraciones, alcanzando un valor mínimo de dicho parámetro a una concentración de 5,75 mM. Superada esta concentración, el valor

de D_f comenzó a incrementarse. Philippe y col. reportaron que, para suspensiones de MC suplementadas con cationes, el Mg^{2+} se asocia en menor proporción a las MC que el Ca^{2+} y el Zn^{2+} [137].

4.3 Optimización del proceso de extracción de colesterol de cremas base utilizando -ciclodextrina

Al evaluar los distintos factores que pueden modificar la extracción de Col, a partir del diseño exploratorio informado en el apartado 3.2.6.4, se descartaron los factores tipo de agitación, velocidad de agitación, velocidad de centrifugación, tiempo y temperatura de centrifugación, ya que no resultaron significativos para dicho proceso con una significancia del 95% ($p=0,0387$). Por lo tanto, para el diseño de optimización se eligieron como factores a estudiar: el porcentaje de MG, el tiempo y la temperatura de agitación y la cantidad de β -CD. Mediante el uso de un diseño central compuesto, se analizó la influencia de estos factores sobre el %ExtCol. En la Tabla 4.5 se muestra el ANOVA obtenido a partir de los datos del diseño de optimización.

Tabla 4.5: ANOVA de las respuesta estudiadas en el diseño experimental. Se muestran los valores de probabilidad asociada a las variables analizadas, al modelo y al ajuste.

Fuente	Probabilidad asociada
Modelo	< 0,0001
%MG	0,3510
% -CD	0,0001
t_{agit}	0,5122
T_{agit}	0,0006
$(\% -CD)^2$	0,0002
%MG/ t_{agit}	0,0136
% -CD/t_{agit}	0,0260
Falta de ajuste	0,6949

La ecuación 4.8 muestra el efecto de los distintos factores en estudio con el %ExtCol obtenido:

$$\begin{aligned} \%ExtCol = & 193,35 - 10,79\%MG + 46,08\% -CD - 4,74T_{agit} + 0,92t_{agit} \\ & - 39,15(\% -CD)^2 + 0,25\%MG.T_{agit} + 1,33\% -CD.T_{agit} \end{aligned} \quad (4.8)$$

Capítulo 4: Resultados y Discusión

La ecuación 4.8 pone en evidencia lo ya reportado previamente por otros autores, que el aumento de la concentración de β -CD en el proceso de extracción mejora el %ExtCol de las cremas; pero, por otro lado, un exceso de este compuesto afecta negativamente a la extracción. Este último efecto podría deberse a que las moléculas de β -CD, cuando se encuentran en gran cantidad, podrían competir entre ellas por unirse a las moléculas de Col, produciendo como resultado una disminución de la encapsulación del mismo, que daría lugar a una disminución de los %ExtCol [112].

En cuanto a la T_{agit} , la ecuación predice una disminución del %ExtCol ante un aumento de ésta. Esto puede fundamentarse en el carácter exotérmico de la formación de los complejos que forma la β -CD con distintas moléculas hidrofóbicas como Col, lo que induciría la disociación de estos complejos a elevadas temperaturas [80]. Pero el efecto de la T_{agit} cuando se combina con el %MG y el % β -CD tiene el efecto contrario sobre el %ExtCol. El %ExtCol aumentó al incrementarse el t_{agit} , hecho también reportado con anterioridad, como consecuencia de favorecerse el contacto entre el agente extractor (β -CD) y la molécula a extraer (Col) [8].

La Figura 4.17 muestra el modelado de la respuesta (%ExtCol) en función de los factores estudiados.

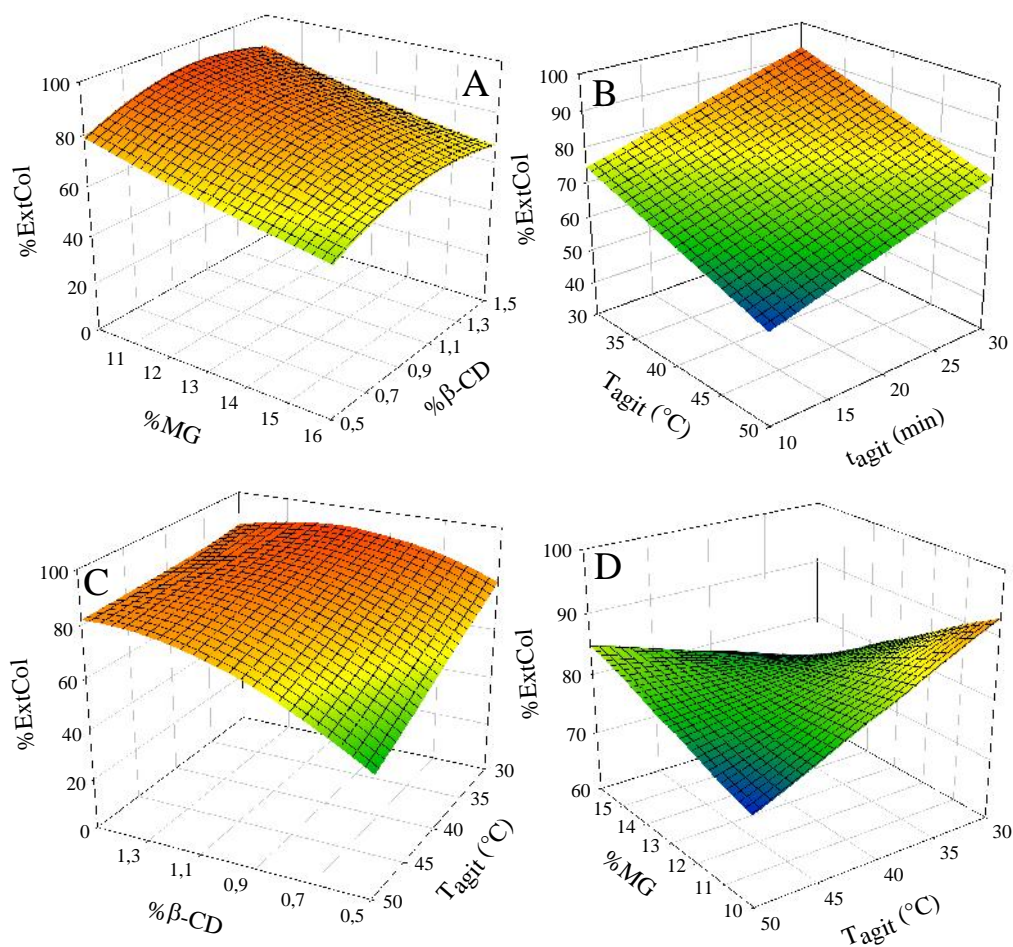


Figura 4.17: Modelado de la respuesta (%ExtCol) en función de los factores estudiados % β -CD, %MG, t_{agit} y T_{agit} .

A partir de la ecuación 4.8 se obtuvieron los valores óptimos de los factores en estudio para obtener el máximo %ExtCol. Como se observa en la Figura 4.17 A, al realizar la extracción del Col con el % β -CD óptimo, se obtiene el %ExtCol máximo independientemente del %MG inicial que contengan las CB. Los valores de las variables optimizados para obtener el máximo %ExtCol y el valor esperado de extracción se muestran a continuación:

$$\left. \begin{array}{l} \%MG= 10,20 \\ \% \beta\text{-CD}= 1,14 \\ T_{agit}= 31,46 \\ t_{agit}= 29,42 \end{array} \right\} \text{Valor de \%ExtCol esperado: } 90,73\%$$

Capítulo 4: Resultados y Discusión

Se verificó si se cumplían los valores predichos por el diseño de optimización mediante la cuantificación del %ExtCol de una muestra de crema base elaborada al 10%MG, realizando la extracción con una relación de 1% de -CD por cada 3,5% de MG a una temperatura de 30 °C y con un tiempo de agitación de 30 min (condiciones próximas a las optimizadas por el diseño). Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado, obteniéndose valores de %ExtCol de 93 ± 1 %. Este resultado valida el diseño de optimización obtenido.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PARTE B: Aplicación del proceso de extracción de colesterol y de la fortificación con sales de zinc en la elaboración de un producto lácteo

4.4 Desarrollo de quesos funcionales

Se desarrollaron quesos frescos tipo Cuartirolo, a los cuales se les extrajo el Col y fueron fortificados con distintas sales de Zn^{2+} : $ZnCl_2$ y $ZnSO_4$, a los que se denominó QZnCl₂ y QZnSO₄ respectivamente. Luego se determinó el %ExtCol y el grado de fortificación con Zn^{2+} de los productos finales. Además, se los caracterizó fisicoquímicamente y se les realizaron evaluaciones reológicas, microestructurales, funcionales y sensoriales, comparándolos con quesos que no recibieron ningún tratamiento (QST) y con quesos elaborados a partir de CB con contenido reducido de Col (QCRC).

El %ExtCol de las CB (10%MG) que se utilizaron para la elaboración de los quesos tratados dio por resultado $93 \pm 1\%$, tal como se informara en el ensayo de validación (apartado 4.3).

4.4.1 Análisis composicional de los quesos

4.4.1.1 Determinación de la concentración de zinc en los quesos

Se cuantificó la cantidad de Zn^{2+} en las muestras de queso elaboradas a partir de CB con y sin los tratamientos de extracción de Col y de fortificación. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.6. En la misma se exhiben la concentración de Zn^{2+} determinada en las distintas muestras de queso, el porcentaje de rendimiento (%Rendimiento) de los quesos (peso de cuajada obtenida cada 100 g de crema usada para su elaboración) y los valores correspondientes al %Fortificación Zn^{2+} (porcentaje de Zn^{2+} recuperado en el queso luego de la fortificación).

Tabla 4.6: Valores promedio y desvíos estándar del contenido de Zn^{2+} en las muestras de queso, los porcentajes de fortificación y rendimiento de los mismos.*

Muestra	[Zn^{2+}] (mg/Kg)	%Rendimiento	% Fortificación Zn^{2+}
QST	(33±2) ^a	(12,2±0,5) ^a	
QCRC	(26±2) ^b	(13,1±0,5) ^{ab}	
QZnCl ₂	(129±8) ^c	(13,5±0,1) ^b	(87±7) ^a
QZnSO ₄	(131±8) ^c	(14±1) ^b	(94±7) ^a

* La misma letra en una misma columna indica que no hay una diferencia significativa entre las muestras analizadas (p 0,05).

Se puede observar que el Zn^{2+} adicionado a la CB con la que se elaboraron los quesos quedó retenido en más del 85% en el producto final. Este porcentaje resulta elevado comparado con los rendimientos de la masa de los quesos, ya que de 100 g de CB empleada para su elaboración se obtienen solamente entre 13-14 g de cuajada. Estos resultados ponen en evidencia lo ya reportado con anterioridad, que existe una interacción entre las moléculas de Zn^{2+} y las MC [65, 138].

4.4.1.2 Determinación del contenido de cenizas

Se determinó el contenido de cenizas de las muestras en estudio luego que éstas fueran calcinadas en una mufla a 105°C. En la Figura 4.18 se muestran los porcentajes de cenizas (%Cenizas) obtenidos para cada una de las muestras de queso en estudio. En la misma se puede observar que no hay una diferencia significativa entre los %Cenizas obtenidos de las distintas muestras estudiadas ($p=0,343$). Por lo tanto, ni la extracción de Col, ni la fortificación con Zn^{2+} modificaron el contenido de cenizas de las muestras de queso analizadas.

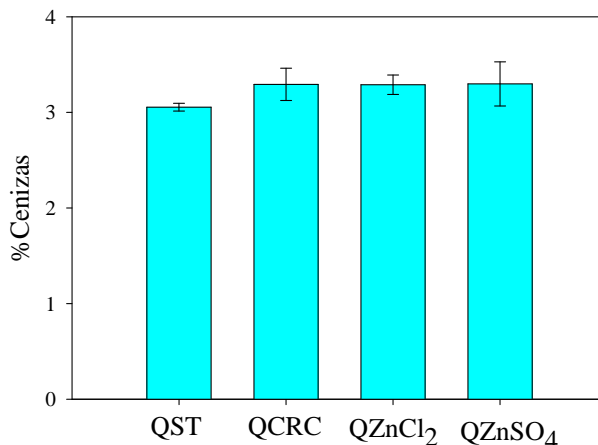


Figura 4.18: Determinación del contenido de cenizas de las muestras de queso en estudio.

4.4.1.3 Determinación del porcentaje de humedad de los quesos

En la Tabla 4.7 se muestran los valores de %Humedad obtenidos para los quesos en estudio. Los mismos variaron muy levemente entre las muestras estudiadas, en donde el QCRC mostró tener un porcentaje de humedad significativamente inferior (95% de confianza) que el resto de las muestras analizadas.

Tabla 4.7: Valores promedio y desvíos estándar de los porcentaje de humedad de los quesos en estudio.*

Muestra	%Humedad
QST	(56,4±0,5) ^a
QCRC	(53,9±0,4) ^b
QZnSO ₄	(55,8±0,9) ^a
QZnCl ₂	(55,8±0,1) ^a

*La misma letra en una misma columna indica que no hay una diferencia significativa entre las muestras analizadas (p 0,05).

4.4.2 Propiedades funcionales

4.4.2.1 Análisis del color

En las Figuras 4.19 A y B se pueden observar las imágenes de los quesos en estudio y los valores que tomaron los parámetros de color para cada una de las muestras, respectivamente. Los valores de luminosidad (L*) se mantienen constantes para los distintos tipos de queso analizados.

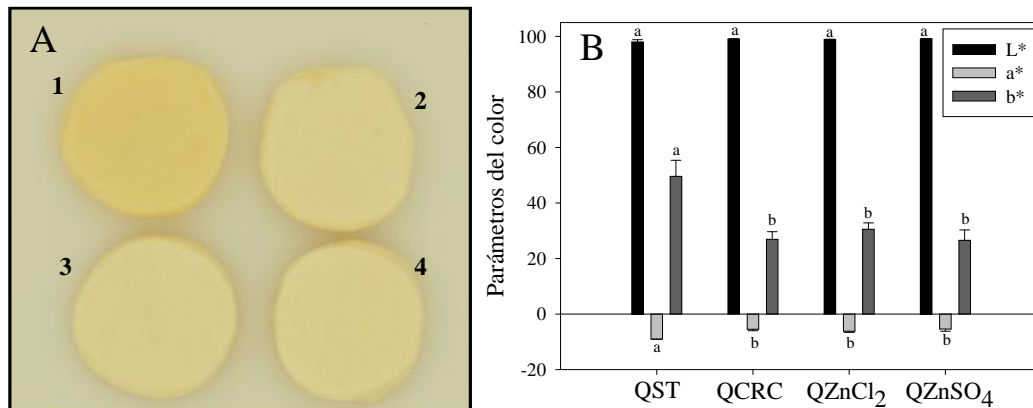


Figura 4.19: A) Imágenes de las muestras analizadas tomadas en condiciones apropiadas de iluminación (1-QST; 2-QCRC; 3-QZnSO₄; 4-QZnCl₂). B) Parámetros de color de las muestras en estudio. La misma letra indica que no hay una diferencia significativa entre las muestras analizadas (p 0,05).

Por otra parte, los valores de los parámetros a* y b* cambian significativamente en los quesos elaborados a partir de las CB sometidas al tratamiento de extracción de Col con respecto a los quesos elaborados a partir de CB sin tratar. Esta alteración en los valores de a* y b* que presentaron las muestras de QCRC, QZnSO₄ y QZnCl₂ con respecto a los valores hallados para los QST se corresponden con una disminución en la intensidad de los matices de los colores verde y amarillo, respectivamente.

Se calcularon los IB de las muestras de queso en estudio (Figura 4.20), obteniéndose como resultado valores negativos de este parámetro para el caso de los QST y valores positivos para las muestras de QCRC, QZnCl₂ y QZnSO₄. Este hecho indica que estos últimos quesos presentan un mayor componente de blanco en sus matices y por el contrario las muestras de QST presentan un mayor componente amarillo. Este hecho concuerda con lo observado en la Figura 4.19 A.

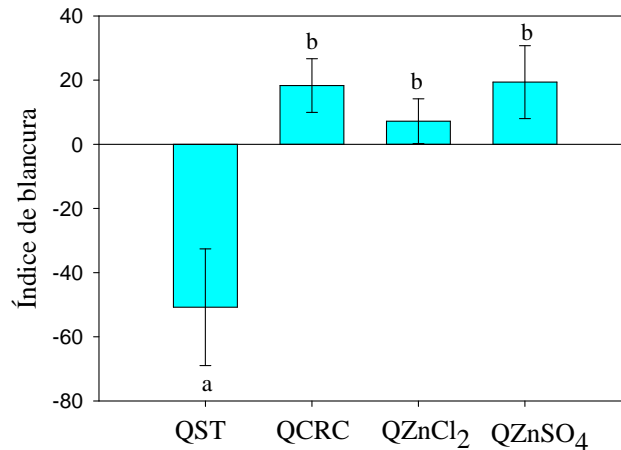


Figura 4.20: Índice de blancura (IB) de las muestras de queso.

Es un hecho reportado que el tamaño de los glóbulos de grasa está relacionado con el color que presentan los productos lácteos [139]. Cuanto menor es el diámetro de éstos, hay más dispersión de luz, que se traduce en un producto con un color más blanco. En base a esto, la mayor intensidad de blanco obtenida para los quesos QCRC, QZnCl₂ y QZnSO₄ sería producto de la disminución del tamaño de los glóbulos grasos como consecuencia del proceso de homogeneización que requiere el protocolo de extracción de Col.

4.4.2.2 Ensayos de derretibilidad

En la Figura 4.21 se muestran las imágenes de los quesos en estudio luego del ensayo de derretibilidad.

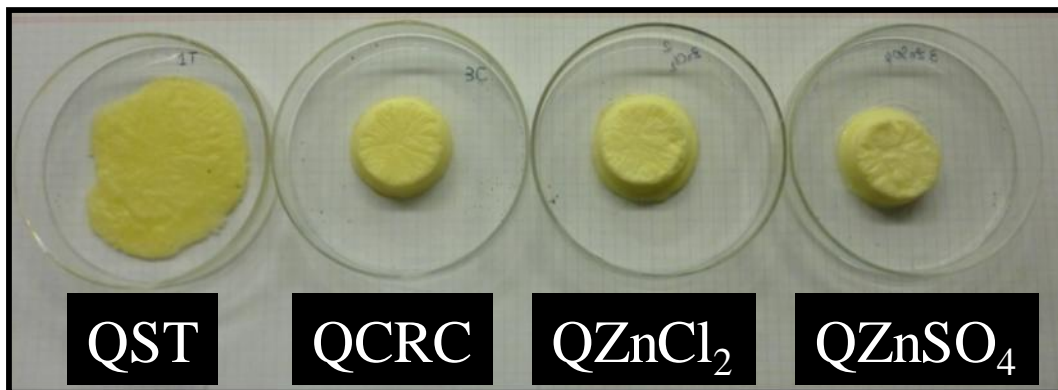


Figura 4.21: Imágenes de las muestras de queso luego de ser sometidas al ensayo de derretibilidad.

La Figura 4.22 muestra los valores promedio de las áreas iniciales y finales para cada una de las muestras. En el caso de las áreas finales se determinaron, mediante ANOVA, las muestras con diferencias estadísticamente significativas al 95% de confianza. Las muestras estadísticamente diferentes se designaron con letras distintas.

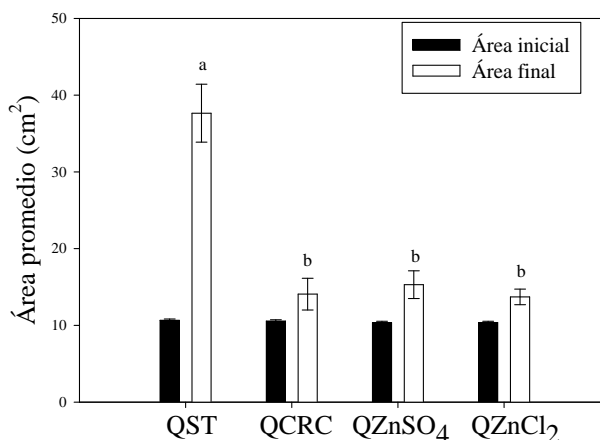


Figura 4.22: Representación gráfica de las áreas de las muestras cilíndricas de los quesos determinadas antes y después del ensayo de derretibilidad. La misma letra indica que no hay una diferencia significativa entre las muestras analizadas ($p < 0,05$).

El QST presentó mayor área final luego del ensayo de fusión, es decir, mayor derretibilidad que el QCRC y los adicionados con sales de Zn^{2+} , observándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), por lo se podría concluir que el proceso de homogeneización afecta significativamente esta propiedad funcional. Esto se debería a que los glóbulos grasos son de menor tamaño y se encuentran distribuidos más uniformemente que en los QST [139].

4.4.3 Propiedades reológicas: Estudio de penetrometría

La firmeza de los quesos, cuando la sonda penetró 10 mm a los mismos, se muestra en la Figura 4.23. En la misma se observa una diferencia estadísticamente significativa entre los QST y los que recibieron el tratamiento de extracción del Col con la -CD (QCRC, QZnSO₄ y QZnCl₂). La firmeza de estos últimos a los 10 mm de penetración resultó menor que la de los QST. Esto se debería a que el proceso de homogeneización mecánica al que se sometieron las cremas en el protocolo de extracción de Col afecta la estructura de las proteínas, ocasionando que las CN se incorporen dentro de la membrana de los glóbulos de grasa, dando lugar a una estructura más débil por la menor cantidad de interacciones CN-CN [84].

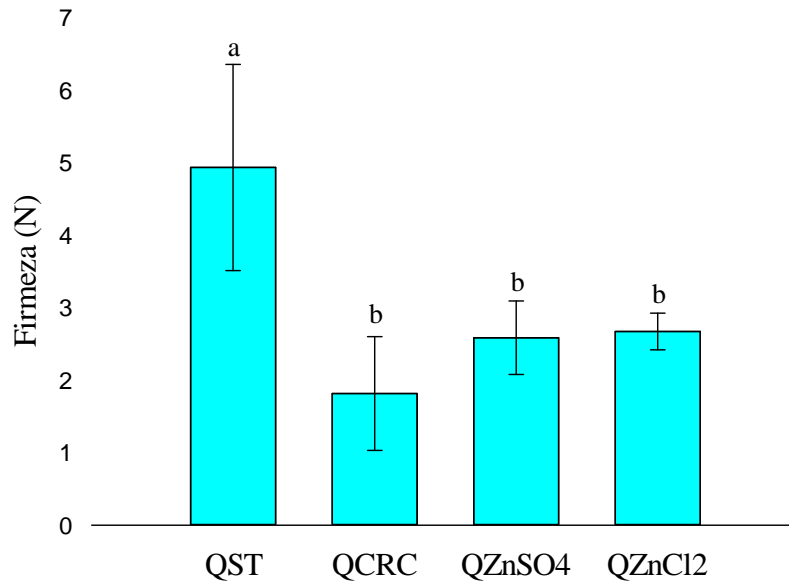


Figura 4.23: Firmeza de los quesos en estudio cuando la sonda cilíndrica los penetra 10 mm. La misma letra indica que no hay una diferencia significativa entre las muestras analizadas (p 0,05).

4.4.4 Propiedades microestructurales: Análisis de imágenes

En la Figura 4.24 se pueden observar las imágenes obtenidas con el microscopio confocal y los gráficos de cajas de las distribuciones de tamaños de poro, mientras que en la Tabla 4.8 se muestran los parámetros de textura de las distintas muestras de queso analizadas.

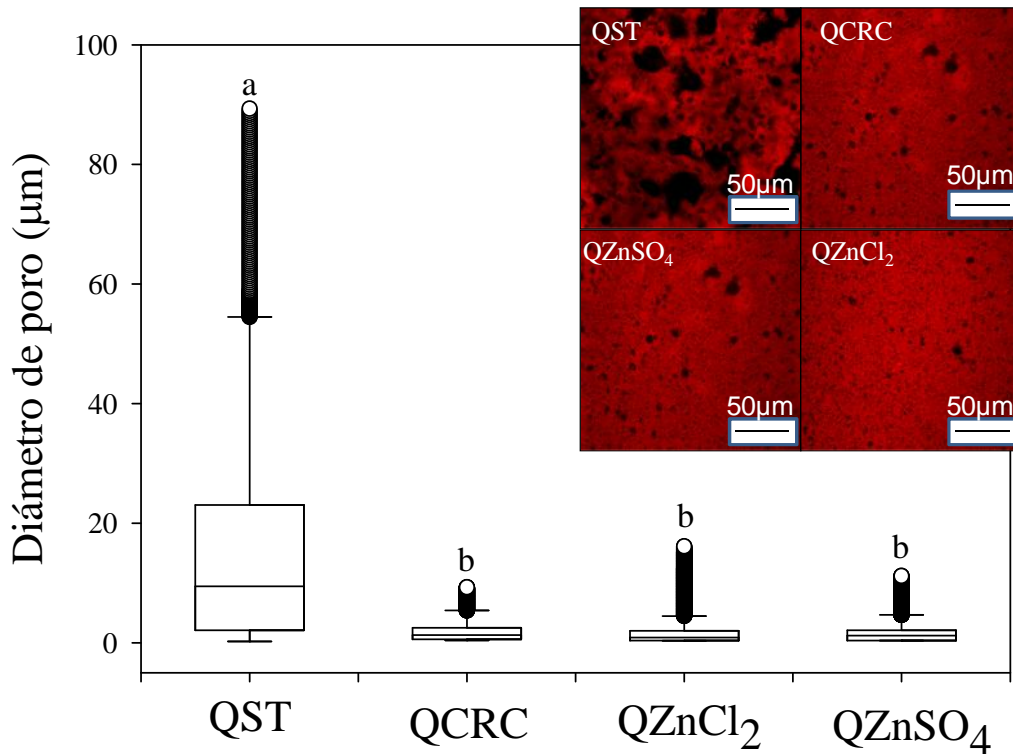


Figura 4.24: Gráficos de cajas de las distribuciones de diámetro de poro de los quesos. La misma letra indica que no hay una diferencia significativa entre las muestras analizadas ($p < 0,05$). Inserto: Imágenes de la microestructura de los quesos en estudio obtenidas mediante microscopía confocal.

Tabla 4.8: Valores promedio y desvíos estándar de los parámetros de textura de las imágenes obtenidas por microscopía confocal.*

Parámetros de textura	QST	QCRC	QZnSO ₄	QZnCl ₂
S	5,8±0,2 ^a	5,4±0,1 ^b	5,24±0,02 ^b	5,28±0,08 ^b
K	0,043±0,005 ^a	0,017±0,002 ^b	0,014±0,001 ^b	0,016±0,001 ^b
² (N)	2.900±300 ^a	1.100±100 ^b	930±60 ^b	1.050±80 ^b
U	0,023±0,004 ^a	0,031±0,003 ^b	0,031±0,001 ^b	0,030±0,002 ^b

*La misma letra en una misma fila indica que no hay una diferencia significativa entre las muestras analizadas ($p < 0,05$).

Se puede observar que los valores de los parámetros S, K y σ^2 (N) disminuyen en el QCRC y en los quesos fortificados con las distintas sales, con respecto a los valores observados para el QST, mientras que se observó que el parámetro U aumenta. Un incremento en el valor de U y una disminución en los valores de S, K y σ^2 (N) se corresponden con una estructura en donde las partículas se encuentran dispersadas uniformemente por toda la imagen. Como resultado del proceso de homogenización al

que se sometió a las CB con la finalidad de extraer el Col, se obtuvieron quesos con poros más pequeños y distribuidos homogéneamente a lo largo de toda la imagen, mientras que para el QST se pueden observar poros más grandes y más irregulares, ubicados en sectores bien definidos de la imagen.

Estos resultados son consistentes con la menor firmeza obtenida para los quesos sometidos al tratamiento de homogeneización. Por otra parte, el hecho de que no se observaron diferencias ni en los valores de los parámetros de textura analizados ni en los tamaños de poro entre las muestras con contenido de Col reducido ya sea fortificadas o no con las sales de Zn^{2+} , confirma que lo que estaría cambiando la microestructura de los quesos no sería la adición de las sales, sino el proceso de homogeneización mecánica.

4.4.5 Análisis sensorial

Las características sensoriales de los quesos fueron evaluadas por un panel sensorial entrenado. Los resultados del mismo se muestran en forma gráfica en la Figura 4.25, mientras que en la Tabla 4.9 se pueden observar los valores promedio que adquirieron los descriptores para cada una de las muestras y los valores de probabilidad asociada obtenidos mediante ANOVA de los datos, en donde una $p < 0,05$ indica que hay diferencia significativa entre los mismos (95% de confianza).

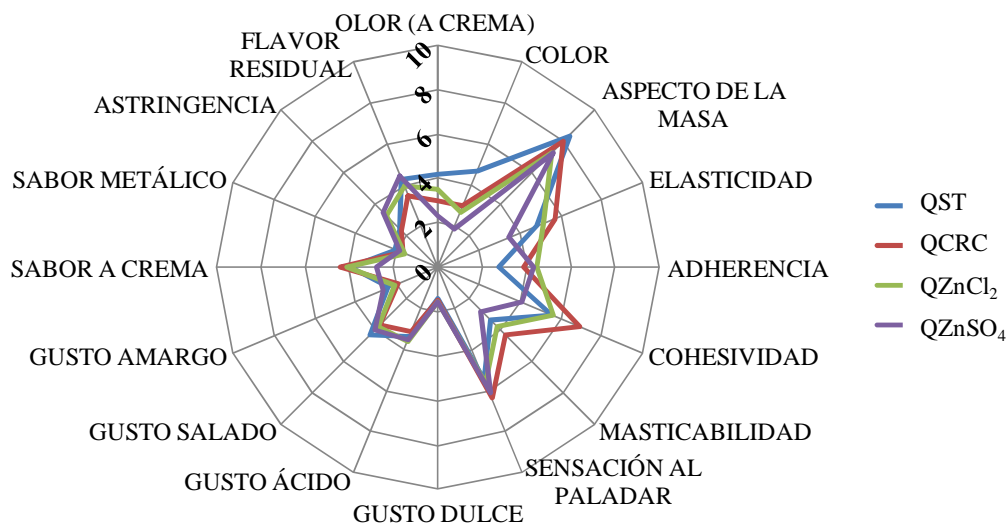


Figura 4.25: Diagrama de tela de araña: Representación gráfica de los valores promedio que presentaron los descriptores sensoriales para cada muestra de queso analizada.

Capítulo 4: Resultados y Discusión

Tabla 4.9: Valores promedio, desvíos estándar y valores de probabilidad asociadas de los ANOVA de los descriptores analizados para las muestras de queso estudiadas.*

	Olor	Color	Aspecto de la masa	Elasticidad	Adherencia al paladar	Cohesividad
QST	4,15±1,70 ^c	4,71±1,75 ^b	8,39±0,55	4,83±2,12 ^b	2,77±1,37 ^a	5,54±1,77 ^{ab}
QCRC	2,40±1,96 ^{ab}	2,98±1,35 ^a	7,98±0,98	5,70±1,47 ^b	3,88±1,58 ^{ab}	6,91±1,19 ^b
QZnCl ₂	3,54±2,10 ^{bc}	2,71±1,20 ^a	7,23±2,03	5,17±2,57 ^b	5,01±2,44 ^b	5,65±1,83 ^b
QZnSO ₄	1,69±1,88 ^a	1,87±1,07 ^a	7,32±2,24	2,76±2,28 ^a	5,58±3,44 ^b	4,09±1,39 ^a
p	0,0190	0,0012	0,4103	0,0243	0,0413	0,0075
	Masticabilidad	Sensación al paladar	Gusto dulce	Gusto ácido	Gusto salado	Gusto amargo
QST	3,34±1,69	5,43±2,10	1,39±1,03	3,37±1,69	4,29±1,61	1,98±1,47
QCRC	4,29±1,46	6,39±1,20	1,51±1,04	3,10±1,05	3,67±1,69	1,98±0,66
QZnCl ₂	3,79±0,87	5,61±1,55	1,59±1,18	3,61±2,20	3,81±1,11	1,70±1,48
QZnSO ₄	2,77±1,01	6,14±1,72	1,58±1,11	3,53±1,62	3,97±1,94	2,64±1,40
p	0,1128	0,6060	0,9797	0,9244	0,8717	0,2703
	Sabor a crema	Sabor metálico	Astringencia	Flavor residual		
QST	3,44±1,84	2,07±1,67	1,84±1,93	4,29±2,87		
QCRC	4,38±1,43	1,34±1,43	2,30±1,15	3,49±1,63		
QZnCl ₂	4,10±1,92	1,63±0,88	2,68±2,16	4,00±1,70		
QZnSO ₄	2,80±1,75	1,89±1,07	3,53±1,88	4,42±2,03		
p	0,1821	0,6292	0,1042	0,8001		

* La misma letra en una misma columna indica que no hay una diferencia significativa entre las muestras analizadas (p 0,05).

- **Apariencia**

El aspecto de la masa de los quesos fue homogéneo, no evidenciándose diferencias significativas entre las muestras analizadas, obteniéndose puntajes para este descriptor cercanos al extremo superior (9,0). El color fue más intenso en el caso de los QST, hecho también evidenciado en el ensayo colorimétrico instrumental.

- **Textura**

Se observó que el QZnSO₄ presentó valores menores que las demás muestras para los descriptores elasticidad y cohesividad. La adherencia al paladar de los quesos

adicionados con sales fue mayor. Todos los quesos presentaron masticabilidad y sensación al paladar estadísticamente similares.

- **Flavor**

El olor a crema se detectó con mayor intensidad en el QST, mientras que fue menor en el caso del QZnSO₄. El gusto dulce fue detectado en baja intensidad (casi nada perceptible) en todas las muestras, por lo que se descartaría la posibilidad de que el remanente de -CD influya en la percepción de este gusto. El gusto ácido, salado y amargo fue poco percibido entre las diferentes muestras, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre las mismas. El sabor a crema se detectó de manera similar en todas las muestras, por lo tanto, el proceso de extracción de Col no alteró las propiedades organolépticas de la crema. Los valores de los descriptores sabor metálico y astringencia fueron muy bajos en todas las muestras, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre las mismas.

Estos resultados son consistentes con lo reportado anteriormente por Gulbas y Saldamli [69], por Abd-Rabou y col. [70] y por Kahraman y Ustunol [68]. Estos autores estudiaron el efecto de la fortificación con Zn²⁺ sobre las características sensoriales de otros productos lácteos, y encontraron que no se afectaban negativamente las mismas, como lo sugieren otros autores [5, 140]. Además, no se encontraron diferencias entre las muestras de QZnCl₂ y QZnZSO₄ para todos los descriptores estudiados menos para los de elasticidad y cohesividad, para los cuales el QZnCl₂ mostró valores más similares a los del QST.

Los quesos fortificados con Zn²⁺ y con contenido reducido de Col resultaron ser muy similares al QST. Las diferencias encontradas en los ensayos de firmeza, microestructura, derretibilidad y color, atribuibles al proceso de homogeneización mecánica al que fueron sometidas las CB con el objetivo de extraer el Col, no afectaron de forma negativa las características organolépticas de los quesos analizados.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

Los resultados de las determinaciones de los espectros de fluorescencia intrínseca, hidrofobicidad superficial, *quenching* de la fluorescencia con acrilamida y carga superficial de las partículas proteicas sugieren una exclusión preferencial de la GG y la GEC de la superficie proteica y, por lo tanto, la ausencia de interacción entre las PL y los GM.

Se determinó que la presencia de la GG aumenta el tiempo necesario para que comience la agregación de las micelas de caseína proteolizadas como consecuencia del aumento de la viscosidad del sistema que provoca una disminución de la velocidad de difusión de las partículas coloidales, lo que a su vez conduce a la obtención de agregados con un grado de compactación mayor (mayor dimensión fractal). Este último hecho surge como consecuencia de que al formarse más lentamente los agregados hay tiempo para que se produzca un reordenamiento mayor de las estructuras y esto conduce a la formación de agregados más compactos. Por otra parte, la goma espina corona no modifica el tiempo de agregación de forma significativa pero sí afecta los valores de dimensión fractal, aumentando este valor cuando se encuentra en bajas concentraciones, mientras que a mayores concentraciones lo disminuye por competencia con la microseparación de fases segregativa. El Ca^{2+} en este sistema tuvo el mismo comportamiento que la GEC para el parámetro dimensión fractal.

La microestructura de los coágulos, obtenidos por acción de la quimosina sobre las micelas de caseína y observada mediante microscopía confocal, resultó ser dependiente de la competencia entre el proceso de coagulación y el proceso de separación de fases entre los biopolímeros del sistema. Adicionalmente, la separación de fases ocurre a menores concentraciones para el caso de la GG que para la GEC.

En conclusión, se determinó que la GEC posee un comportamiento comparable a la GG en cuanto a su interacción con las PL y sobre las características microestructurales y texturales que le confieren a los coágulos post hidrólisis enzimática de las micelas de caseína. Sin embargo, la GEC posee un menor poder espesante que la GG, por lo tanto sería necesario para el eventual reemplazo de este último GM el empleo de mayores concentraciones de GEC para lograr un efecto espesante similar sobre los sistemas proteicos.

En base a los resultados obtenidos del estudio comparativo de los GM, GG y GEC, se puede pensar en un posible reemplazo de la GG por un producto autóctono como la GEC. Queda planteada la posibilidad de hacer pruebas ulteriores en algún

producto lácteo para corroborar si el comportamiento observado en los sistemas modelo ensayados en este trabajo de tesis se corresponde con lo observado en un sistema alimentario.

Del estudio del efecto de los cationes sobre la agregación enzimática de las MC se puede concluir que las concentraciones ensayadas de Ca^{2+} , Zn^{2+} y Na^+ afectaron significativamente a los dos parámetros de agregación estudiados: el tiempo al cual comienza la agregación y el grado de compactación de los agregados finales, mientras que la adición de Mg^{2+} sólo tuvo influencia sobre el último. Se determinó que el Ca^{2+} y el Zn^{2+} disminuyeron el tiempo de agregación como consecuencia de la desestabilización de las MC por neutralización de las cargas superficiales negativas. Por otro lado, el Na^+ tuvo el efecto contrario como consecuencia de un proceso de *salting-in*. El efecto de los distintos cationes sobre el grado de compactación de los agregados finales dependió del tipo y concentración del catión, y es consecuencia de varios factores: la modificación del potencial electrocinético proteico, la cinética del proceso de agregación y la participación de los cationes en puentes salinos durante la formación del agregado.

Con miras al desarrollo de quesos funcionales, se determinaron las condiciones óptimas para la extracción del Col de las CB que se utilizaron para la elaboración de los quesos. Según el diseño experimental realizado se puede predecir que a concentraciones ensayadas intermedias de $-\text{CD}$, bajas temperaturas y altos tiempos de agitación, se puede lograr un %ExtCol superior al 90%.

En base a esto, se elaboraron quesos frescos tipo Cuartirolo con una reducción del contenido de Col del 93% y una fortificación con Zn^{2+} superior al 85%. Una porción de 30 g de queso fresco aportaría un 56% de la IDR para hombres adultos y el 80% para las mujeres. En cuanto a las características sensoriales de los quesos fortificados con Zn^{2+} y con contenido reducido de Col, resultaron ser muy similares a las del queso sin tratamiento. El sabor dulce se detectó en muy baja intensidad, indicando que los restos de $-\text{CD}$, que podrían haber quedado como remanente de su uso para la extracción del Col de las CB, no tuvieron incidencia significativa sobre el sabor del producto. Además, se descartó que la presencia de las sales de Zn^{2+} en las concentraciones ensayadas le confiera un gusto metálico y astringente a los quesos fortificados.

Las diferencias encontradas en los ensayos de firmeza, microestructura, derretibilidad y color de los quesos son atribuibles al proceso de homogeneización mecánica al que fueron sometidas las cremas base con el objetivo de optimizar la

Conclusiones

extracción del Col y no a la adición de las sales de Zn^{2+} o la presencia de la -CD. No obstante, estas diferencias no afectaron de forma negativa las características organolépticas de los quesos analizados.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, se puede concluir que se ha podido lograr un producto lácteo funcional, con aporte nutricional extra de Zn^{2+} y con reducción del contenido de Col y manteniendo las características organolépticas del queso tradicional.

Los resultados obtenidos en la elaboración en escala piloto de este queso fresco tipo Cuartirolo con contenido reducido de Col y fortificado con sales de Zn^{2+} serán utilizados como base para el escalado a nivel industrial por transferencia a una empresa láctea regional, con el fin de satisfacer así las demandas locales de nuevos productos y contribuir con el desarrollo industrial de la región.

CAPÍTULO 6: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bulut-Solak, B., y O'Mahony, J. A. (2015) Rheological and microstructural properties of rennet-induced milk protein gels formed with *Orchis anatolica* gum, *International Dairy Journal* 51, 59-64.
2. Hee, L. L. Y., Jacquot, M., Hardy, J., y Desobry, S. (2008) Formulating polymeric gels simulating soft cheeses' texture, *Food Hydrocolloids* 22, 925-933.
3. Funami, T. (2011) Next target for food hydrocolloid studies: Texture design of foods using hydrocolloid technology, *Food Hydrocolloids* 25, 1904-1914.
4. Renard, D., van de Velde, F., y Visschers, R. W. (2006) The gap between food gel structure, texture and perception, *Food Hydrocolloids* 20, 423-431.
5. Salgueiro, M. J., Zubillaga, M., Lysionek, A., Caro, R., Weill, R., y Boccio, J. (2002) Fortification strategies to combat zinc and iron deficiency, *Nutrition Reviews* 60, 52-58.
6. Dunkley, W. L. (1982) Reducing fat in milk and dairy products by processing, *Journal of Dairy Science* 65, 454-458.
7. Kwak, H., Jung, C., Shim, S., y Ahn, J. (2002) Removal of cholesterol from Cheddar cheese by β -cyclodextrin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 7293-7298.
8. Ahn, J., y Kwak, H. (1999) Optimizing cholesterol removal in cream using β -cyclodextrin and response surface methodology, *Journal of Food Science* 64, 629-632.
9. Dias, H. M. A. M., Berbic, F., Pedrochi, F., Baesso, M. L., y Matioli, G. (2010) Butter cholesterol removal using different complexation methods with β -cyclodextrin, and the contribution of photoacoustic spectroscopy to the evaluation of the complex, *Food Research International* 43, 1104-1110.
10. Kim, S.-Y., Bae, H.-Y., Kim, H.-Y., Ahn, J., y Kwak, H.-S. (2008) Properties of cholesterol-reduced Camembert cheese made by crosslinked β -cyclodextrin, *International Journal of Dairy Technology* 61, 364-371.
11. Fox, P. (2001) Milk proteins as food ingredients, *International journal of dairy technology* 54, 41-55.
12. Dickinson, E., y Stainsby, G. (1982) *Colloids in food*, Applied Science Publishers

Capítulo 6: Referencias Bibliográficas

13. Walstra, P., y Jenness, R. (1984) *Dairy chemistry & physics*, John Wiley & Sons
14. Belitz, H., Grosch, W., y Schieberle, P. (2009) *Food Chemistry*, Springer
15. Law, B. A., y Tamime, A. Y. (2011) *Technology of cheesemaking*, John Wiley & Sons
16. Boland, M., Singh, H., y Thompson, A. (2014) *Milk proteins: from expression to food*, Academic Press
17. Damodaran, S., Parkin, K. L., y Fennema, O. R. (2010) *Química de alimentos de Fennema*, Artmed
18. Holt, C. (1982) Inorganic constituents of milk III. The colloidal calcium phosphate of cow's milk, *Journal of Dairy Research* 49, 29-38.
19. Van Kemenade, M., y de Bruyn, P. (1989) The influence of casein on the kinetics of hydroxyapatite precipitation, *Journal of Colloid and Interface Science* 129, 1-14.
20. Holt, C. (1997) The milk salts and their interaction with casein, *Advanced Dairy Chemistry* Springer
21. Aoki, T., Umeda, T., y Kako, Y. (1990) Cleavage of the linkage between colloidal calcium phosphate and casein on heating milk at high temperature, *Journal of Dairy Research* 57, 349-354.
22. Euston, S. R., y Hirst, R. L. (1999) Comparison of the concentration-dependent emulsifying properties of protein products containing aggregated and non-aggregated milk protein, *International Dairy Journal* 9, 693-701.
23. Fox, P. F. (2008) *Milk proteins: From expression to food*, Elsevier
24. Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T., Messens, K., y Van Camp, J. (2008) Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material, *International Dairy Journal* 18, 436-457.
25. Horne, D. (2006) Casein micelle structure: Models and muddles, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 11, 148-153.
26. West, D. (1986) Structure and function of the phosphorylated residues of casein, *Journal of Dairy Research* 53, 333-352.
27. Alvarez, E., Risso, P., Gatti, C., Burgos, M., y Suarez Sala, V. (2007) Calcium-induced aggregation of bovine caseins: effect of phosphate and citrate, *Colloid and Polymer Science* 285, 507-514.

28. Farrell, H., Kumosinski, T. F., Malin, E. L., y Brown, E. M. (2002) The caseins of milk as calcium-binding proteins, *Calcium-Binding Protein Protocols*, Humana Press
29. Dalglish, D., Spagnuolo, P., y Goff, H. (2004) A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy, *International Dairy Journal* 14, 1025-1031.
30. Schmidt, D. (1982) Association of caseins and casein micelle structure, *Developments in dairy chemistry I*, 61-86.
31. De Kruif, C. (1999) Casein micelle interactions, *International Dairy Journal* 9, 183-188.
32. Horne, D. (1998) Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products, *International Dairy Journal* 8, 171-177.
33. Carlson, A., Hill, C., y Olson, N. (1987) Kinetics of milk coagulation: II. Kinetics of the secondary phase: Micelle flocculation, *Biotechnology and Bioengineering* 29, 590-600.
34. De Kruif, C. (1997) Skim milk acidification, *Journal of Colloid and Interface Science* 185, 19-25.
35. Mohammad, K., y Fox, P. (1987) Heat-induced microstructural changes in casein micelles before and after heat coagulation, *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 22, 191-203.
36. Tuinier, R., y De Kruif, C. (2002) Stability of casein micelles in milk, *The Journal of chemical physics* 117, 1290.
37. Pires, M., Gatti, C., Orellana, G., y Morales, E. (2004) Rennet coagulation of casein micelles and heated casein micelles in presence of sucrose or lactose, *Food Research International* 37, 95-101.
38. Lucey, J. (2002) Formation and physical properties of milk protein gels, *Journal of Dairy Science* 85, 281-294.
39. Walstra, P. (1993) The syneresis of curd, *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, Springer
40. Rinaudo, M. (2001) Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states, *Food Hydrocolloids* 15, 433-440.
41. De Kruif, C., y Tuinier, R. (2001) Polysaccharide protein interactions, *Food Hydrocolloids* 15, 555-563.

42. Dickinson, E. (2003) Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems, *Food Hydrocolloids* 17, 25-39.
43. Li, J., y Nie, S. (2015) The functional and nutritional aspects of hydrocolloids in foods, *Food Hydrocolloids*.
44. Nussinovitch, A., y Hirashima, M. (2013) *Cooking innovations: using hydrocolloids for thickening, gelling, and emulsification*, CRC Press
45. Glicksman, M. (1962) Utilization of natural polysaccharide gums in the food industry, *Advances in food research* 11, 109-200.
46. Pasquel, A. (2001) Gomas: una aproximación a la industria de alimentos, *Revista Amazónica de investigación alimentaria* 1, 1-8.
47. Aspinall, G. (1959) Structural chemistry of the hemicelluloses, *Advances in carbohydrate chemistry* 14, 429-468.
48. Gorin, P., y Spencer, J. (1968) Structural chemistry of fungal polysaccharides, *Advances in carbohydrate chemistry* 23, 367-417.
49. Lloyd, K. O. (1970) Isolation, characterization, and partial structure of peptido galactomannans from the yeast form of *Cladosporium werneckii*, *Biochemistry* 9, 3446-3453.
50. Srivastava, M., y Kapoor, V. (2005) Seed galactomannans: an overview, *Chemistry & Biodiversity* 2, 295-317.
51. Prajapati, V. D., Jani, G. K., Moradiya, N. G., Randeria, N. P., Nagar, B. J., Naikwadi, N. N., y Variya, B. C. (2013) Galactomannan: a versatile biodegradable seed polysaccharide, *International Journal of Biological Macromolecules* 60, 83-92.
52. Mazza, G., y Biliaderis, C. (1989) Functional properties of flax seed mucilage, *Journal of Food Science* 54, 1302-1305.
53. Dickinson, E. (1998) Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions, *Trends in Food Science & Technology* 9, 347-354.
54. Perduca, M. J., Spotti, M. J., Santiago, L. G., Judis, M. A., Rubiolo, A. C., y Carrara, C. R. (2013) Rheological characterization of the hydrocolloid from *Gleditsia amorphoides* seeds, *LWT - Food Science and Technology* 51, 143-147.
55. Spotti, M. J., Santiago, L. G., Rubiolo, A. C., y Carrara, C. R. (2012) Mechanical and microstructural properties of milk whey protein/espina corona gum mixed gels, *LWT-Food Science and Technology* 48, 69-74.

Capítulo 6: Referencias Bibliográficas

56. Pavón, Y. L., Lazzaroni, S. M., Sabbag, N. G., y Rozycki, S. D. (2014) Simultaneous effects of gelatin and espina corona gum on rheological, physical and sensory properties of cholesterol-reduced probiotic yoghurts, *International Journal of Food Science & Technology* 49, 2245-4451.
57. Elfak, A. M., Pass, G., y Phillips, G. O. (1979) The effect of shear rate on the viscosity of solutions of guar gum and locust bean gum, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 30, 439-444.
58. Doublier, J., y Launay, B. (1981) Rheology of galactomannan solutions: comparative study of guar gum and locust bean gum, *Journal of texture studies* 12, 151-172.
59. Williams, P., y Phillips, G. (2003) Gums: Food uses, *Encyclopedia of food science and nutrition* 2, 3,001-007.
60. Siro, I., Kapolna, E., Kapolna, B., y Lugasi, A. (2008) Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review, *Appetite* 51, 456-467.
61. Rosado, J. L. (2003) Zinc and copper: proposed fortification levels and recommended zinc compounds, *The Journal of Nutrition* 133, 2985-2989.
62. Rubio, C., González Weller, D., Martín-Izquierdo, R., Revert, C., Rodríguez, I., y Hardisson, A. (2007) El zinc: oligoelemento esencial, *Nutrición Hospitalaria* 22, 101-107.
63. Salgueiro, M. J., Zubillaga, M., Lysionek, A., Sarabia, M. I., Caro, R., De Paoli, T., Hager, A., Weill, R., y Boccio, J. (2000) Zinc as an essential micronutrient: a review, *Nutrition Research* 20, 737-755.
64. Al-Awadi, F., y Srikumar, T. (2001) Trace elements and their distribution in protein fractions of camel milk in comparison to other commonly consumed milks, *Journal of Dairy Research* 68, 463-469.
65. Singh, H., Flynn, A., y Fox, P. F. (1989) Zinc binding in bovine milk, *Journal of Dairy Research* 56, 249-263.
66. Reilly, C. (1996) Too much of a good thing? The problem of trace element fortification of foods, *Trends in Food Science & Technology* 7, 139-142.
67. Drago, S., y Valencia, M. (2002) Effect of fermentation on iron, zinc, and calcium availability from iron-fortified dairy products, *Journal of Food Science* 67, 3130-3134.

Capítulo 6: Referencias Bibliográficas

68. Kahraman, O., y Ustunol, Z. (2012) Effect of zinc fortification on Cheddar cheese quality, *Journal of Dairy Science* 95, 2840-2847.
69. Gulbas, S. Y., y Saldamli, I. (2005) The effect of selenium and zinc fortification on the quality of Turkish white cheese, *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 56, 141-146.
70. Abd-Rabou, N., Zaghoul, A., Seleet, F., y El-Hofi, M. (2010) Properties of Edam cheese fortified by dietary zinc salts, *Journal of American Science* 6, 441-446.
71. El-Din, A. G., Hassan, A., El-Behairy, S., y Mohamed, E. (2012) Impact of zinc and iron salts fortification of buffalo's milk on the dairy product, *World Journal of Dairy & Food Sciences* 7, 21-27.
72. Larsen, J., y Froning, G. (1981) Extraction and processing of various components from egg yolk, *Poultry Science* 60, 160-167.
73. Micich, T. J. (1990) Behavior of polymer-supported digitonin with cholesterol in the absence and presence of butter oil, *Journal of agricultural and food chemistry* 38, 1839-1843.
74. Watanabe, K., Aihara, H., Nakagawa, Y., Nakamura, R., y Sasaki, T. (1989) Properties of the purified extracellular cholesterol oxidase from *Rhodococcus equi* No. 23, *Journal of agricultural and food chemistry* 37, 1178-1182.
75. Ong, C., Lee, H., y Li, S. (1990) Supercritical fluid extraction and chromatography of cholesterol in food samples, *Journal of Chromatography A* 515, 509-513.
76. Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J., Rial-Otero, R., y Simal-Gándara, J. (2009) A review on the use of cyclodextrins in foods, *Food Hydrocolloids* 23, 1631-1640.
77. Singh, M., Sharma, R., y Banerjee, U. (2002) Biotechnological applications of cyclodextrins, *Biotechnology advances* 20, 341-359.
78. Challa, R., Ahuja, A., Ali, J., y Khar, R. K. (2005) Cyclodextrins in drug delivery: An updated review, *AAPS PharmSciTech* 6, 329-357.
79. Cloudy, P., Letoffe, J., Germain, P., Bastide, J., Bayol, A., Blasquez, S., Rao, R., y Gonzalez, B. (1991) Physicochemical characterization of cholesterol-beta cyclodextrin inclusion complexes, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 37, 2497-2506.

Capítulo 6: Referencias Bibliográficas

80. Yamamoto, S., Kurihara, H., Mutoh, T., Xing, X.-h., y Unno, H. (2005) Cholesterol recovery from inclusion complex of α -cyclodextrin and cholesterol by aeration at elevated temperatures, *Biochemical engineering journal* 22, 197-205.
81. McMahon, D. J., Alleyne, M., Fife, R., y Oberg, C. (1996) Use of fat replacers in low fat Mozzarella cheese, *Journal of Dairy Science* 79, 1911-1921.
82. Parodi, P. W. (2009) Has the association between saturated fatty acids, serum cholesterol and coronary heart disease been over emphasized?, *International Dairy Journal* 19, 345-361.
83. Kim, S. Y., Hong, E. K., Ahn, J., y Kwak, H. S. (2009) Chemical and sensory properties of cholesterol-reduced processed cheese spread, *International journal of dairy technology* 62, 348-353.
84. Kwak, H., Nam, C., y Ahn, J. (2001) Low cholesterol Mozzarella cheese obtained from homogenized and β -cyclodextrin-treated milk, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 14, 268-275.
85. Jung, H., Ganesan, P., Lee, S., y Kwak, H. (2013) Comparative study of flavor in cholesterol-removed Gouda cheese and Gouda cheese during ripening, *Journal of Dairy Science* 96, 1972-1983.
86. Kuaye, A. Y. (1994) An ultraviolet spectrophotometric method to determine milk protein content in alkaline medium, *Food Chemistry* 49, 207-211.
87. Lakowicz, J. R. (2010) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer
88. Kato, A., y Nakai, S. (1980) Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure* 624, 13-20.
89. Anema, S., y Klostermeyer, H. (1996) ζ -Potentials of casein micelles from reconstituted skim milk heated at 120 C, *International Dairy Journal* 6, 673-687.
90. Tholstrup Sejersen, M., Salomonsen, T., Ipsen, R., Clark, R., Rolin, C., y Balling Engelsen, S. (2007) Zeta potential of pectin-stabilised casein aggregates in acidified milk drinks, *International Dairy Journal* 17, 302-307.
91. Dalgleish, D. G. (1984) Measurement of electrophoretic mobilities and zeta-potentials of particles from milk using laser Doppler electrophoresis, *Journal of Dairy Research* 51, 425-438.

92. Tabilo-Munizaga, G., y Barbosa-Cánovas, G. V. (2005) Rheology for the food industry, *Journal of Food Engineering* 67, 147-156.
93. Rao, M. (2010) *Rheology of fluid and semisolid foods: principles and applications: principles and applications*, Springer
94. Risso, P., Relling, V., Armesto, M., Pires, M., y Gatti, C. (2007) Effect of size, proteic composition, and heat treatment on the colloidal stability of proteolyzed bovine casein micelles, *Colloid and Polymer Science* 285, 809-817.
95. Horne, D. S. (1987) Determination of the fractal dimension using turbidimetric techniques. Application to aggregating protein systems, *Faraday Discussions of the Chemical Society* 83, 259-270.
96. Hagiwara, T., Kumagai, H., Matsunaga, T., y Nakamura, K. (1997) Analysis of aggregate structure in food protein gels with the concept of fractal, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 61, 1663-1667.
97. Alvarez, E. M., Risso, P. H., Canales, M. A. M., Pires, M. S., y Gatti, C. A. (2008) Hydrodynamic properties–structure relationship for sodium caseinates in presence of calcium, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 327, 51-56.
98. Antipova, A., Semenova, M., y Belyakova, L. (1999) The effect of sucrose on the thermodynamic properties of ovalbumin and sodium caseinate in bulk solution and at air–water interface, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 12, 261-270.
99. Tromp, R. H., van de Velde, F., van Riel, J., y Paques, M. (2001) Confocal scanning light microscopy (CSLM) on mixtures of gelatine and polysaccharides, *Food research international* 34, 931-938.
100. Hassan, A., Frank, J., Farmer, M., Schmidt, K., y Shalabi, S. (1995) Formation of yogurt microstructure and three-dimensional visualization as determined by confocal scanning laser microscopy, *Journal of Dairy Science* 78, 2629-2636.
101. Mellema, M., Heesakkers, J., Van Opheusden, J., y Van Vliet, T. (2000) Structure and scaling behavior of aging rennet-induced casein gels examined by confocal microscopy and permeametry, *Langmuir* 16, 6847-6854.
102. Doube, M., Klosowski, M. M., Arganda-Carreras, I., Cordelières, F. P., Dougherty, R. P., Jackson, J. S., Schmid, B., Hutchinson, J. R., y Shefelbine, S. J. (2010) BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ, *Bone* 47, 1076-1079.

Capítulo 6: Referencias Bibliográficas

103. Hildebrand, T., y Rügsegger, P. (1997) A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images, *Journal of Microscopy* 185, 67-75.
104. Zheng, C., Sun, D.-W., y Zheng, L. (2006) Recent applications of image texture for evaluation of food qualities—a review, *Trends in Food Science & Technology* 17, 113-128.
105. Haralick, R. M., Shanmugam, K., y Dinstein, I. H. (1973) Textural features for image classification, *Systems, Man and Cybernetics, IEEE Transactions on* 3, 610-621.
106. Pang, Z., Deeth, H., Sharma, R., y Bansal, N. (2015) Effect of addition of gelatin on the rheological and microstructural properties of acid milk protein gels, *Food Hydrocolloids* 43, 340-351.
107. Fiszman, S. M., y Salvador, A. (1999) Effect of gelatine on the texture of yoghurt and of acid-heat-induced milk gels, *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A* 208, 100-105.
108. Metzger, L. E., y Mistry, V. V. (1994) A new approach using homogenization of cream in the manufacture of reduced fat Cheddar cheese. 1. Manufacture, composition, and yield, *Journal of Dairy Science* 77, 3506-3515.
109. Massart, D. L., Vandeginste, B. G. M., Buydens, L. M. C., De Jong, S., Lewi, P. J., y Smeyers-Verbeke, J. (1997) *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Elsevier
110. Ba , D., y Boyacı, . H. (2007) Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology, *Journal of Food Engineering* 78, 836-845.
111. Han, E. M., Kim, S. H., Ahn, J., y Kwak, H. S. (2007) Optimizing cholesterol removal from cream using -cyclodextrin crosslinked with adipic acid, *International Journal of Dairy Technology* 60, 31-36.
112. Lee, D. K., Ahn, J., y Kwak, H. S. (1999) Cholesterol removal from homogenized milk with -cyclodextrin, *Journal of Dairy Science* 82, 2327-2330.
113. AOAC (1990) *Official methods of analysis* 15th ed., AOAC International
114. Guinee, T. P. (2002) The functionality of cheese as an ingredient: a review, *Australian journal of dairy technology* 57, 79.

115. Metzger, L. E., Barbano, D. M., Kindstedt, P. S., y Guo, M. R. (2001) Effect of milk preacidification on low fat Mozzarella cheese: II. Chemical and functional properties during storage, *Journal of Dairy Science* 84, 1348-1356.
116. Kindstedt, P. S., Kiely, L. J., y Gilmore, J. A. (1992) Variation in Composition and Functional Properties Within Brine-Salted Mozzarella Cheese¹, *Journal of Dairy Science* 75, 2913-2921.
117. Muthukumarappan, K., Wang, Y. C., y Gunasekaran, S. (1999) Modified Schreiber test for evaluation of Mozzarella cheese meltability, *Journal of Dairy Science* 82, 1068-1071.
118. Ibáñez, R. A., Waldron, D. S., y McSweeney, P. L. (2015) Effect of fat content and temperature on the translucency of Cheddar cheese, *International Dairy Journal*.
119. Mendoza, F., y Aguilera, J. (2004) Application of image analysis for classification of ripening bananas, *Journal of Food Science* 69, E471-E477.
120. Soazo, M., Pérez, L. M., Rubiolo, A. C., y Verdini, R. A. (2014) Prefreezing application of whey protein-based edible coating to maintain quality attributes of strawberries, *International Journal of Food Science & Technology*.
121. Yam, K. L., y Papadakis, S. E. (2004) A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces, *Journal of Food Engineering* 61, 137-142.
122. Salcedo-Chávez, B., Osuna-Castro, J. A., Guevara-Lara, F., Domínguez-Domínguez, J., y Paredes-López, O. (2002) Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds, *Journal of agricultural and food chemistry* 50, 6515-6520.
123. Sanchez, C., Beauregard, J., Chassagne, M., Bimbenet, J., y Hardy, J. (1995) Effects of processing on rheology and structure of double cream cheese, *Food research international* 28, 547-552.
124. Blonk, J., y Van Aalst, H. (1993) Confocal scanning light microscopy in food research, *Food research international* 26, 297-311.
125. Dürrenberger, M. B., Handschin, S., Conde-Petit, B., y Escher, F. (2001) Visualization of food structure by confocal laser scanning microscopy (CLSM), *LWT-Food Science and Technology* 34, 11-17.
126. Auty, M. A., Twomey, M., Guinee, T. P., y Mulvihill, D. M. (2001) Development and application of confocal scanning laser microscopy methods

- for studying the distribution of fat and protein in selected dairy products, *Journal of Dairy Research* 68, 417-427.
127. Gonzalez, R. C., y Woods, R. E. (2002) Digital image processing, *Prentice Hall*, 462-463.
128. Ingrassia, R., Costa, J. P., Hidalgo, M. E., Mancilla Canales, M., Castellini, H., Riquelme, B., y Risso, P. (2013) Application of a digital image procedure to evaluate microstructure of caseinate and soy protein acid gels, *LWT - Food Science and Technology* 53, 120-127.
129. Drake, M. (2007) Invited review: Sensory analysis of dairy foods, *Journal of Dairy Science* 90, 4925-4937.
130. Cheng, J., Ma, Y., Li, X., Yan, T., y Cui, J. (2015) Effects of milk protein-polysaccharide interactions on the stability of ice cream mix model systems, *Food Hydrocolloids* 45, 327-336.
131. Pang, Z., Deeth, H., y Bansal, N. (2015) Effect of polysaccharides with different ionic charge on the rheological, microstructural and textural properties of acid milk gels, *Food research international*.
132. Pang, Z., Deeth, H., Sopade, P., Sharma, R., y Bansal, N. (2014) Rheology, texture and microstructure of gelatin gels with and without milk proteins, *Food Hydrocolloids* 35, 484-493.
133. De Jong, S., y Van de Velde, F. (2007) Charge density of polysaccharide controls microstructure and large deformation properties of mixed gels, *Food Hydrocolloids* 21, 1172-1187.
134. Van den Berg, L., Van Vliet, T., Van der Linden, E., Van Boekel, M., y Van De Velde, F. (2007) Breakdown properties and sensory perception of whey proteins/polysaccharide mixed gels as a function of microstructure, *Food Hydrocolloids* 21, 961-976.
135. Hidalgo, M. E., Fontana, M., Armendariz, M., Riquelme, B., Wagner, J. R., y Risso, P. (2014) Acid-induced aggregation and gelation of sodium caseinate-guar gum mixtures, *Food Biophysics*, 1-14.
136. Dziuba, J., Smoczynski, M., Dziuba, Z., y Smoczynski, L. (1997) A new fractal approach to the structure of casein gels, *Milchwissenschaft* 52, 448-451.
137. Philippe, M., Le Graët, Y., y Gaucheron, F. (2005) The effects of different cations on the physicochemical characteristics of casein micelles, *Food Chemistry* 90, 673-683.

Capítulo 6: Referencias Bibliográficas

138. Pomastowski, P., Sprynskyy, M., y Buszewski, B. (2014) The study of zinc ions binding to casein, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 120, 21-27.
139. Cunha, C. R., Grimaldi, R., Alcantara, M. R., y Viotto, W. H. (2013) Effect of the type of fat on rheology, functional properties and sensory acceptance of spreadable cheese analogue, *International journal of dairy technology* 66, 54-62.
140. Boccio, J., y Monteiro, J. B. (2004) Food fortification with iron and zinc: pros and cons from a dietary and nutritional viewpoint, *Revista de Nutrição* 17, 71-78.