

Capítulo 3. Interacción caseinato de sodio bovino - polisacáridos: propiedades fisicoquímicas, reológicas y estructurales

Dra. María Eugenia Hidalgo y Dra. Patricia Risso

Universidad Nacional de Rosario (UNR) – Instituto de Física de Rosario (IFIR-CONICET)

3.1. Caseinato de sodio bovino (NaCAS): características generales y propiedades funcionales

Las caseínas (CN), fosfoproteínas específicas de la leche bovina, representan alrededor del 80% (~26 g/kg) del total de las proteínas lácteas e incluyen cuatro tipos de cadenas polipeptídicas principales llamadas caseínas α_{S1} (α_{S1} -CN), α_{S2} (α_{S2} -CN), β (β -CN) y κ (κ -CN), además de algunos derivados formados por proteólisis de estas cadenas, como la γ -caseína (γ -CN). Todas estas cadenas tienen en común ser proteínas conjugadas con al menos un grupo fosfato por molécula esterificado a residuos de serina y ocasionalmente a treonina (enlaces éster-fosfato); propiedad que ninguna de las proteínas del suero lácteo posee (Walstra *et al.*, 1984; West, 1986). Todas las CN tienen una pronunciada tendencia a asociarse, en general tienden a auto asociarse en las condiciones de pH y fuerza iónica de la leche, aunque presentan ciertas diferencias frente a los niveles de calcio y a la temperatura del medio (Farrell *et al.*, 2002).

Ninguno de los cuatro tipos de CN tiene una estructura secundaria muy organizada, sólo α -hélices y láminas β de longitudes cortas. El gran número y la distribución uniforme de los restos de prolina impiden una conformación secundaria empaquetada y ordenada, por lo tanto, están compuestas por distintos dominios funcionales. Estas proteínas poseen naturaleza reomórfica, es decir son estructuras completamente dinámicas, pudiendo pasar de estructura secundaria a cuaternaria sin formar complejos intermedios terciarios (Swaisgood, 1982; Holt and Sawyer, 1993; Farrell *et al.*, 2003). 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 debido a la carga superficial negativa al pH de la leche, 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 calcio (Alvarez *et al.*, 2007).

El caseinato de sodio bovino (NaCAS) se obtiene por redisolución, en solución acuosa de NaOH, de las CN previamente precipitadas en su pI (caseína ácida). En general, la composición en CN del NaCAS es similar a la de las micelas de CN en la leche bovina: 44% de α_S -CN, 31% de β -CN y 14% de κ -CN (Hiller and Lorenzen, 2008).

Las partículas de NaCAS pueden encontrarse en solución acuosa como moléculas proteicas individuales, oligómeros o nanopartículas proteicas y hasta como submicelas de CN. A baja fuerza iónica y lejos del pI , cuando predominan las interacciones electrostáticas, el NaCAS (hasta concentraciones del 5%) estaría en forma de moléculas de CN individuales. Si se adicionan sales monovalentes se forman pequeños agregados micelares debido al apantallamiento de las interacciones electrostáticas y a la consiguiente asociación de las CN por interacción hidrofóbica. El grado de asociación depende del balance entre ambos tipos de interacciones y aumenta con el incremento de la fuerza iónica, la temperatura y el descenso del pH. Además, pueden estar presentes una pequeña proporción de partículas de mayor tamaño (con un radio hidrodinámico R_h

~ 60 nm), probablemente complejos que contienen grasa y proteína, las cuales pueden ser removidas por ultracentrifugación (HadjSadok *et al.*, 2008).

Este NaCAS es un aditivo muy utilizado por la industria alimentaria debido a sus propiedades nutricionales y funcionales. En general, el NaCAS posee:

- ✓ Carga neta negativa.
- ✓ Estructura flexible, dando lugar a la formación de soluciones viscosas.
- ✓ Alta solubilidad en agua.
- ✓ Zonas hidrofóbicas, que favorecen la disposición de agua estructurada como así también la interacción con lípidos.
- ✓ Estabilidad al calor, lo que los convierte en excelentes nutrientes.

Por otro lado el NaCAS presenta las siguientes propiedades funcionales (Walstra *et al.*, 1984; Walstra and de Roos, 1993; Gaucheron, 1997):

- ✓ Estabiliza emulsiones debido a su capacidad para interactuar con el agua y las grasas (agente estabilizante, emulsificante).
- ✓ Beneficia la aireación y/o el batido, mejorando la calidad de las espumas que forma (agente espumante).
- ✓ Favorece la formación de geles (agente gelificante).
- ✓ Interacciona con lípidos actuando como bloqueador de grasas. En general, el NaCAS mejora la retención de agua, haciendo que los productos que deben freírse retengan menor cantidad de aceite. De esta manera es posible obtener margarinas bajas en calorías al emulsionar mayor cantidad de agua en la grasa, base de este producto.
- ✓ Confiere jugosidad a derivados cárnicos, embutidos y fiambres debido a su resistencia al calor y adhesividad, colaborando así en la texturización del alimento.

Entre las industrias alimentarias que emplean el NaCAS como aditivo se destacan la industria panadera, láctea, cárnica y de bebidas. Además suelen utilizarse en aplicaciones medicinales y dietarias como así también en la formación de films y coberturas de productos texturados en general (snacks), en la elaboración de comidas rápidas o pre elaboradas y en la industria de golosinas y dulces (Ennis and Mulvihill, 2000).

Entre todas las propiedades funcionales del NaCAS útiles para la industria alimentaria, en este capítulo profundizaremos en su capacidad de agregar y gelificar por acidificación, proceso base en la elaboración de derivados lácteos como yogur y postres.

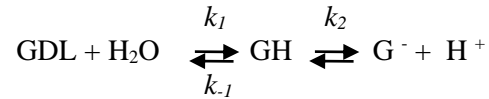
3.2. Agregación y gelación ácidas del NaCAS

Durante la acidificación, las partículas y/o sub micelas de NaCAS disminuyen su estabilidad electrostática por reducción de la carga superficial neta negativa y, en cercanías del pI, a bajas concentraciones proteicas, se forman agregados solubles (de Kruif, 1997). Sin embargo, cuando la concentración proteica es más alta, los agregados tienen un tamaño lo suficientemente grande como para formar una malla o red de gel (Lucey *et al.*, 1997). Estos geles, formados a partir de la agregación desordenada, son turbios y de estructura particulada, con valores bajos de módulo elástico (G') (Verheul and Roefs, 1998).

La formación de estos agregados y/o geles proteicos por reducción del pH puede realizarse lentamente, a través del empleo de cultivos lácticos, o rápidamente, por acidificación directa. En el proceso tradicional, la leche es acidificada como consecuencia de la fermentación de la lactosa a ácido láctico a cargo de las bacterias lácticas naturalmente presentes en ella o adicionadas durante su procesamiento. Un procedimiento que ha ganado la atención de la industria alimentaria es la acidificación directa por la adición de una lactona, la glucono- δ -lactona (GDL). Dependiendo de la

concentración y la temperatura, la hidrólisis de la GDL puede promover una reducción lenta del pH (de Kruif, 1997), simulando la fermentación láctica.

La GDL es un éster interno que en medio acuoso se hidroliza espontáneamente para formar ácido D-glucónico, que al ser un ácido débil se disocia de acuerdo con la reacción:



donde GH es ácido glucónico, G^- gluconato, k_1 y k_2 las constantes de velocidad directa y k_{-1} corresponde a la constante de velocidad inversa. Si bien ambas etapas de reacción son básicamente reacciones de equilibrio, podemos considerar el primer paso como una degradación de primer orden de reacción a valores de pH superiores a 4,6. Por encima de este pH, la concentración de GH es tan baja que la reacción inversa es insignificante. Además, k_1 es mucho mayor que k_{-1} , por lo tanto, la cinética de hidrólisis de la GDL es considerada de primer orden:

$$[\text{GDL}] = [\text{GDL}]_0 e^{-k_1 t}$$

Por otro lado, el uso de GDL resulta beneficioso ya que evita algunas de las dificultades asociadas a la utilización de bacterias, tales como la actividad y variabilidad en función del tipo de microorganismo empleado. Además, durante la agregación y/o gelación con GDL, el pH final del sistema resulta ser función de la cantidad de lactona adicionada, mientras que las bacterias producen ácido hasta que se auto inhiben o mueren por el bajo pH del medio (Lucey *et al.*, 1998).

La velocidad del proceso de agregación y/o gelación va a ser afectada por la velocidad de hidrólisis de la GDL, que determina la cinética de aparición de protones que neutralizarán los residuos proteicos cargados negativamente (de Kruif, 1997). Se define R como la relación en masa de GDL y NaCAS:

$$R = \frac{\% \text{ P/P GDL}}{\% \text{ P/P NaCAS}}$$

3.2.1. Evaluación de la agregación ácida del NaCAS por turbidimetría

La cinética de la agregación ácida puede ser evaluada por diversos métodos. Los posibles cambios de tamaño de las partículas de NaCAS durante la agregación ácida pueden estudiarse basándose en la dependencia de la turbidez (τ) con la longitud de onda (λ) en un rango de λ donde no absorben los cromóforos proteicos (400-700 nm) (Horne, 1987; Risso *et al.*, 2007). Los resultados de estudios de simulación por computadoras utilizando diferentes modelos de agregación han promovido el definir la estructura de los agregados coloidales en términos del concepto de dimensión fractal (Worning *et al.*, 1998). Un objeto fractal es aquel que puede ser dividido en pequeñas partes discretas donde cada una de ellas es una réplica verdadera reducida del objeto original. Estas pequeñas partes pueden obtenerse del objeto entero a través de una transformación de similaridad (Dziuba *et al.*, 1999). Los fractales, la dimensión y la geometría fractal en general son utilizados para caracterizar estructuras desordenadas tales como los agregados coloidales y también para describir el proceso de agregación.

Los objetos fractales conservan las mismas características morfológicas independientemente de la escala, es decir, que cada subunidad de un dado agregado tiene las mismas características morfológicas del agregado entero (Horne, 1989). Por lo tanto, la dimensión fractal (D_f) está vinculada al grado de estructuración interna o grado de compactación de un objeto fractal.

A través de la evaluación de un parámetro al que denominaremos β , vinculado al tamaño medio de las partículas y/o a su grado de compactación, se puede estudiar el estado de los agregados de NaCAS formados durante la agregación ácida inducida por GDL (Hidalgo *et al.*, 2011). Dicho parámetro β se puede calcular a partir de la pendiente de gráficos lineales de $\log \tau$ vs. $\log \lambda$, en el citado rango de λ , midiendo la τ a intervalos frecuentes durante el tiempo necesario para alcanzar un máximo de τ durante la agregación del sistema (Horne, 1987):

$$\beta = 4,2 + \frac{\partial \log \tau}{\partial \log \lambda}$$

En la Figura 1 se muestra un ejemplo de las curvas obtenidas durante la acidificación de NaCAS 0,5 %^{P/P}, R 0,5 y temperatura (T) de 35 °C. Se observa la existencia de dos etapas bien definidas; en la primera etapa, que es mucho más lenta, se verifica un aumento gradual de la τ (Figura 1A) y un descenso del parámetro β (Figura 1B) a lo largo del tiempo y a medida que desciende exponencialmente el pH (Figura 1C). A pH cercano al pI de las CN, cuando la estabilidad electrostática disminuye marcadamente, se inicia la segunda etapa, reflejada por un aumento brusco de la τ y de β debido al incremento en el número de colisiones entre las moléculas proteicas, lo que conduce a la formación y crecimiento de los agregados. La ruptura y posterior formación de interacciones dentro y entre los agregados trae como consecuencia un reordenamiento que determina el grado de compactación final de los agregados (D_f), que puede ser estimado como el máximo valor de β alcanzado.

Figura 1

El NaCAS en solución acuosa presenta un considerable nivel de autoasociación, y algunos autores reportan que se encuentra en forma de submicelas o micelas (Fox PF, 1983; Farrell *et al.*, 1996). Otros autores han sugerido que el NaCAS se asocia en pequeños agregados bien definidos con un grado de asociación que depende de las condiciones del medio, tales como T, pH y fuerza iónica. Pitkowski y col. informaron la existencia de agregados tipo estrellas con un centro hidrofóbico y una corona hidrofílica cargada (Pitkowski *et al.*, 2008). Los gráficos de la Figura 1 sugieren una primera etapa formada por una lenta disociación de estos agregados o submicelas de NaCAS, seguida por una etapa de agregación de estas pequeñas partículas para formar agregados más grandes.

A partir de estos gráficos pueden determinarse el tiempo al cual comienza la agregación o segunda etapa (t_{ag}), el pH en el t_{ag} (pH_{ag}) y el grado de compactación de los agregados formados estimado por la D_f . Posibles cambios en la cinética de agregación debido a modificaciones de las variables fisicoquímicas (T, R, fuerza iónica) o la adición de cosolutos, puede ser evaluados a través del seguimiento de dichos parámetros.

Por ejemplo, al evaluar el efecto de T y de R sobre el proceso de agregación ácida del NaCAS, se observa que t_{ag} aumenta al disminuir R y T, siendo el efecto de la primera variable mucho más significativo (Figura 2). Un incremento de R conduce a un aumento en la velocidad de descenso de pH y, por lo tanto, a una disminución del tiempo necesario para que se desestabilicen las partículas de NaCAS y comiencen a

agregar. El ascenso de la T favorece las interacciones hidrofóbicas que participan en el proceso de agregación y, por otra parte, aumenta la velocidad de hidrólisis de la GDL y con ello la velocidad de descenso de pH. Es decir, que controlando la T y la cantidad de GDL adicionada se puede regular la cinética del proceso de agregación ácida del NaCAS.

Figura 2

Por otra parte, el pH_{ag} disminuye con el aumento de la T, mientras que la variación de R no resulta significativa. Para que comience la agregación es necesario eliminar la repulsión electrostática debida a las cargas superficiales negativas de las partículas de NaCAS y esto se consigue por fijación de los protones producto de la disociación del ácido glucónico. Los resultados indican que, a medida que aumenta T, se necesita una mayor concentración de protones para desestabilizar electrostáticamente al NaCAS, es decir menor pH. Se sabe que para un polielectrolito en solución acuosa:

$$\left(\frac{\partial pH}{\partial T} \right)_{\alpha, p} = - \text{cte} \frac{\Delta H_{d,i}}{R T^2}$$

siendo α la fracción de moles de protones fijados, p la presión, R la constante de los gases y $\Delta H_{d,i}$ la variación de entalpía de disociación de los protones de los residuos aminoacídicos (de Kruif, 1997). Dado que el pH disminuye al aumentar T, la derivada es negativa y, en consecuencia, $\Delta H_{d,i}$ resulta positiva. Por lo tanto, la variación de entalpía de fijación de los protones a los residuos aminoacídicos es negativa, es decir, la reacción de protonación es exotérmica.

En el caso de la D_f , ninguna de las variables resulta significativa. Es decir que el grado de compactación de los agregados no fue significativamente modificado ante las variaciones de T y R en los rangos ensayados.

3.2.2. Evaluación de la gelación ácida del NaCAS por reología

Los geles de CN y NaCAS son responsables de la mayoría de las propiedades reológicas (elasticidad, resistencia, dureza) de los quesos y otros productos lácteos y alimenticios en general. Estas propiedades son evaluadas como un método de control de calidad en la industria alimentaria para mejorar la estructura/textura de los alimentos (Dahbi *et al.*, 2010).

Literalmente, la palabra reología significa “estudio del fluir”, ya que proviene de las palabras griegas reo (fluir), y logos (ciencia), pero el campo de acción de la reología es mucho más amplio de lo que parece significar su nombre ya que la misma estudia cómo un material deformable reacciona bajo la influencia de las fuerzas aplicadas. Actualmente las técnicas reológicas son muy importantes para analizar los diferentes pasos involucrados en el proceso de formación de los geles, así como para evaluar la textura y las características sensoriales de los productos finales. El beneficio de usar métodos reológicos para estudiar los componentes mecánicos de la textura es que estos pueden ser relacionados con teorías que explican los mecanismos moleculares involucrados. Estas teorías pueden describir al alimento y predecir la influencia de varios de sus ingredientes o de las condiciones de procesamiento sobre el producto final. Sin embargo, los modelos para predecir sistemas complejos, tales como los productos lácteos, necesitan ser modificados continuamente con el fin de relacionarlos con la textura del alimento más estrechamente. En este caso, la utilización de sistemas

modelo es muy importante para proveer un marco científico adecuado (Foegeding *et al.*, 2003). Los factores principales que afectan las propiedades reológicas de los geles proteicos inducidos por acidez son el contenido proteico, el pH, la fuerza iónica y la presencia de otros componentes (Capitani *et al.*, 2007).

El comportamiento reológico a bajas deformaciones es una técnica utilizada para obtener información sobre la estructura y viscoelasticidad del producto formado (Stanley *et al.*, 1996). Este método se implementa dentro de la región viscoelástica y, por lo tanto, es un método no destructivo de la estructura básica (Karami *et al.*, 2009). Las propiedades mecánicas pueden explicarse considerando la estructura de los geles coloidales como una red de agregados fractales empaquetados o en forma de racimos (Shih *et al.*, 1990).

A partir de ensayos reológicos oscilatorios realizados en un reómetro de tensión controlada (AR-G2, Texas Instruments) con geometría tipo cono, valores constantes de tensión de oscilación (0,1 Pa) y de frecuencia (0,1 Hz), se miden los valores de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') (cada 20,8 s) durante la gelación ácida inducida por adición de GDL, siendo la T controlada con un baño con recirculador conectado al plato Peltier del instrumento. Como se observa en la Figura 3, se pueden estimar el tiempo de gel (t_{gel}) como el tiempo al cual coinciden G' y G'' , el pH correspondiente al t_{gel} (pH_{gel}) y el máximo valor de G' alcanzado ($G'_{m\acute{a}x}$).

Figura 3

Para una dada concentración de NaCAS, el t_{gel} y el pH_{gel} disminuyen a medida que aumenta R, es decir, la cantidad de GDL adicionada. Esto puede deberse, como se comentara anteriormente, al incremento en la velocidad de descenso del pH cuando crece R. Por otra parte, no se observan diferencias significativas en los valores de $G'_{m\acute{a}x}$ obtenidos, es decir, en el grado de elasticidad de los geles formados.

3.2.2. Evaluación de la microestructura de los geles ácidos de NaCAS

La microestructura de los geles ácidos proteicos se puede evaluar mediante el análisis digital de las imágenes obtenidas por microscopía óptica convencional (OCM) (Ingrassia *et al.*, 2013).

Luego de adicionada la GDL, se colocan las muestras en placas LAB-TEK II de ocho compartimientos, se incuban a T constante y humedad controlada hasta finalizada la reacción de gelación. Luego, los sistemas gelificados se observan por OCM con un objetivo de inmersión de 100x. La cámara digital se programa para la obtención de imágenes de los geles con un zoom de 9.1 x y un adaptador de 52mm.

El diámetro medio de los poros formados durante el proceso de gelación ácida se estima utilizando el software Image J, de acuerdo a Pugnaroni y col. (Pugnaroni *et al.*, 2005). Estos valores se promedian, obteniéndose el valor del tamaño medio de los intersticios o poros. Para determinar a cuántos μm equivale un píxel de las imágenes obtenidas, se toman fotografías de una regla de 1cm de longitud que posee 100 divisiones. A partir de esta técnica se obtiene que 1 píxel = $(0,0645 \pm 0,0005) \mu m$, es decir, que la resolución resulta igual a 15,5 píxel/ μm (Costa, 2011).

A partir del ensayo del efecto de la velocidad de gelación (distintos R) sobre la microestructura de los geles ácidos de NaCAS, se puede observar que a menor velocidad de gelación (menor R), los geles muestran una mayor estructuración, presentando un aspecto más compacto y poros de menor tamaño (Figura 4). Esto se debe a que, si el proceso se realiza lentamente, la malla de gel puede reestructurarse por ruptura de algunas interacciones y formación de otras nuevas, obteniéndose una malla más apretada y, por lo tanto, con poros cada vez más pequeños. Además se verifica un

aumento exponencial en el diámetro medio de los poros con el incremento de la concentración de GDL. Estos resultados corroboran que el grado de compactación y el tamaño de los poros del gel dependen de la velocidad de gelación, la cual está relacionada en forma directa con la cantidad de GDL adicionada.

Figura 4

3.3. Interacción proteína-polisacárido

3.3.1. Compatibilidad termodinámica en mezclas de proteínas y polisacáridos

Las proteínas y los polisacáridos son los principales componentes de alimentos y de otros biomateriales, y son los responsables de conferir propiedades de hidratación (viscosidad, solubilidad), estructuración (agregación, gelación) y superficie (formación de espumas y emulsiones) (Nishinari *et al.*, 2000; Rinaudo, 2001; Goff, 2002). En general, los alimentos contienen ambas clases de biopolímeros, proteínas y polisacáridos, en forma de complejas mezclas multicomponentes, siendo difícil identificar el papel individual de los mismos en términos de sus propiedades funcionales.

Estas mezclas son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria debido a que juegan un rol esencial en la estructura, textura y estabilidad de muchos productos elaborados (Foegeding *et al.*, 2010; Corredig *et al.*, 2011; Dickinson, 2013). Estas características no solo dependen de las propiedades de los biopolímeros involucrados sino también de la naturaleza y la fuerza de las interacciones entre ellos (Dickinson, 1998; Doublier *et al.*, 2000; de Kruif and Tuinier, 2001; Rodríguez Patino and Pilosof, 2011). Los polisacáridos pueden ser neutros, cargados o con características hidrofóbicas, lo que lleva a diferentes formas de interacción con las proteínas (de Kruif *et al.*, 2004; de Jong and van de Velde, 2007).

De la mezcla de proteínas y polisacáridos en solución acuosa pueden resultar tres sistemas diferentes: a) separación de fases segregativa debido a una limitada compatibilidad termodinámica; b) separación de fases asociativa debido a la formación de un complejo por medio de interacciones débiles y no específicas; y c) soluciones homogéneas estables (Tolstoguzov, 1991; Grinberg and Tolstoguzov, 1997; Turgeon *et al.*, 2003). A concentraciones elevadas de proteína y polisacárido, la mezcla de los biopolímeros puede conducir a la separación en dos fases como resultado de la incompatibilidad termodinámica o coacervación. La primera ocurre cuando la interacción entre dos biopolímeros diferentes es energéticamente menos favorable que la interacción entre biopolímeros similares. Como resultado, cada una de las fases en que se separa el sistema se enriquece con uno de los biopolímeros. Por otra parte, la coacervación ocurre cuando las fuerzas atractivas entre dos biopolímeros diferentes son lo suficientemente fuertes para formar un complejo estable entre ellos. Debido a que este complejo tiene diferente densidad que el medio que lo rodea y por los efectos de la gravedad, forma una fase separada en la zona superior o inferior del sistema (Syrbe *et al.*, 1998).

Es por ello que en una mezcla de proteínas y polisacáridos, la limitada compatibilidad termodinámica puede ser explotada para la construcción de nano o micropartículas mediante la selección del polisacárido, la T y las concentraciones relativas de ambos biopolímeros (Baeza *et al.*, 2003; Corredig *et al.*, 2011).

3.3.2. Sistemas modelo NaCAS-polisacáridos

El conocimiento de los mecanismos de interacción en los sistemas proteína-polisacárido simples (sistemas modelo) permite prever el comportamiento de sistemas más complejos y facilitar el desarrollo y la formulación de nuevos productos con las características deseadas.

En este capítulo se analiza la interacción del NaCAS con tres polisacáridos de amplio uso en la industria alimentaria: carboximetilcelulosa (CMC), goma guar (GG) y goma xantana (GX)

3.3.2.1. Sistemas NaCAS - CMC

La celulosa es un polisacárido compuesto exclusivamente de moléculas de glucosa, es rígido, insoluble, pero dispersable en agua y contiene desde cientos hasta miles de unidades de β -glucosa unidas mediante enlaces β -1,4-O-glucosídicos. Es una larga cadena polimérica de peso molecular variable, con fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$, con un valor mínimo de $n = 200$. La celulosa y sus derivados forman geles termo reversibles y actúan como agentes dispersantes, para conferir volumen al alimento y para retener la humedad (Capitani *et al.*, 2007).

Un derivado soluble de la celulosa es la CMC sódica, producida en grandes cantidades en grados comerciales crudos sin ningún refinamiento para ser empleada en detergentes, fluidos de perforación y en la industria papelera, y en grados de pureza más altos, como aditivo alimentario. La CMC es un polisacárido aniónico, con carácter hidrofílico, buenas propiedades para formar películas, alta viscosidad y comportamiento adhesivo, entre algunas otras características, que hacen que presente una amplia variedad de aplicaciones (Zecher and Gerrish, 1999). Este aditivo, reconocido por el Código Alimentario Argentino (Artículo 1391, Inc. 52.1), es utilizado como agente auxiliar en el batido de helados, cremas y natas, como auxiliar para formar geles en gelatinas, como espesante en aderezos y rellenos, como agente antiagregante en jugos de frutas, como coloide protector en emulsiones y mayonesas, como agente protector para cubrir la superficie de frutas y como estabilizador en productos listos para hornear.

Una ventaja importante del uso de este polisacárido es que no resulta afectado por las enzimas digestivas del organismo humano, no absorbiéndose en absoluto. Se utiliza como componente de dietas bajas en calorías, ya que no aporta nutrientes, y se comporta igual que la fibra natural, no teniendo efectos nocivos sobre el organismo, sin embargo, una cantidad muy grande puede disminuir en algún grado la asimilación de ciertos componentes de la dieta (Cancela *et al.*, 2005).

Las mezclas NaCAS-CMC evaluadas en el rango de concentraciones de 0,25-4,0 % P/P y 0,05-4,5 % P/P respectivamente, pH 6,80 y luego de ser incubadas por 24 hs. a 35 °C, en condiciones de T y humedad controladas (Spyropoulos *et al.*, 2010), forman soluciones homogéneas a bajas concentraciones y presentan incompatibilidad termodinámica a altas concentraciones (Figura 5). A este pH, el NaCAS presenta una carga superficial neta negativa y por lo tanto existirían predominantemente fuerzas repulsivas entre ambos biopolímeros.

Figura 5

Durante la agregación ácida del NaCAS en presencia de CMC, inducida por la adición de GDL, también se observan las dos etapas mencionadas anteriormente, pero con un incremento de t_{ag} y un descenso del pH_{ag} a medida que aumenta la proporción de CMC (Figura 6). Las partículas coloidales de NaCAS en suspensión poseen carga neta negativa, por lo que la adición de CMC incrementa dicha carga negativa y, como consecuencia, la estabilidad electrostática del NaCAS, obstaculizando su agregación. Por otra parte, el aumento de la viscosidad del medio ocasionado por la CMC también

influye en el aumento de t_{ag} por disminución de la difusión de las partículas de NaCAS. Como consecuencia, el grado de compactación de los agregados ácidos, estimado por la D_f , disminuye levemente a medida que la relación CMC:NaCAS crece. Esto estaría vinculado con un descenso de la hidrofobicidad superficial del NaCAS en presencia del polisacárido que implica una disminución de las interacciones hidrofóbicas durante la formación de los agregados.

Figura 6

En la Tabla 1 se muestran los resultados de t_{gel} , el pH_{gel} y $G'_{m\acute{a}x}$ obtenidos a partir de los ensayos reológicos oscilatorios realizados durante la formación de los geles ácidos de NaCAS (C_{NaCAS} : 3% P/P), en ausencia y presencia de CMC (C_{CMC} : 0 - 1,5% P/P), R 1 y T 35°C.

Tabla 1

A medida que se incrementa la concentración de CMC, aumenta el t_{gel} y disminuye el pH_{gel} . Por otra parte, $G'_{m\acute{a}x}$ se incrementa al adicionar pequeñas cantidades de CMC, pero disminuye a medida que aumenta la concentración del polisacárido. Por lo tanto, a altas relaciones CMC:NaCAS, los geles resultan menos elásticos.

Se ha reportado que la CMC se adsorbe a la superficie de las micelas de CN formando una monocapa que genera, al igual que la κ -CN a pH neutro, repulsión electrostática entre las micelas a bajo pH (Du *et al.*, 2007). Algo semejante ocurriría en el caso de las mezclas NaCAS:CMC, aumentando así la estabilidad durante la agregación y gelación ácidas inducida por GDL. El grado de compactación y la elasticidad de los agregados y geles de NaCAS son mayores cuando la proporción de CMC es baja pero sufre un fuerte descenso cuando la cantidad de polisacárido adicionado aumenta. Por otro lado, la incompatibilidad termodinámica afecta la elasticidad final de los geles. Según el diagrama de fases de NaCAS y CMC (Figura 5), cuando la C_{CMC} es 0,375% P/P, ambos biopolímeros permanecen en una única fase, pero al aumentar la proporción de CMC existe incompatibilidad termodinámica y ocurre la separación de fases. Esta incompatibilidad induciría la formación de geles menos elásticos.

La Figura 7 muestra las imágenes de los geles ácidos formados por mezclas de NaCAS y CMC obtenidas por OCM. Se observan diferentes grados de compactación de los geles formados en presencia de distintas proporciones de CMC. A bajas C_{CMC} , a las cuales la velocidad de gelación es menor (mayor t_{gel}), se forman geles más estructurados, más compactos y con poros más pequeños. Esto se debe a que, cuando el proceso es lento, la malla de gel puede reestructurarse por rotura de enlaces y formación de otros nuevos, generando una malla de gel más estructurada y, por lo tanto, con poros progresivamente más pequeños. Estos resultados coinciden con los valores de $G'_{m\acute{a}x}$ obtenidos para las diferentes mezclas, es decir, los geles con poros más pequeños son más elásticos. Otros autores también han reportado que la velocidad de gelación puede afectar la dureza y la elasticidad del gel formado (Cavallieri and da Cunha, 2008). Pero con el incremento de la C_{CMC} , se observa un leve aumento en el tamaño medio de los poros por las causas antes mencionadas.

Figura 7

3.3.2.2. Sistema NaCAS - GG

La GG, muy usada en la industria alimenticia como espesante y estabilizante debido a su elevada viscosidad en soluciones acuosas, es un galactomanano con una razón manosa:galactosa de 2:1 (Dickinson, 1998). Es un heteropolisacárido que consiste en una cadena lineal de residuos de (1,4)- β -D-manopiranosil asociado a grupos (1,6)- α -D-galactopiranosil (Sandolo *et al.*, 2007). Este polisacárido funciona como reserva

nutricional de las semillas de *Cyamopsis tetragonoloba*, una planta de la familia de las leguminosas. La fibra purificada de GG es un polvo blanco e insípido que forma un gel viscoso cuando se mezcla con agua. La viscosidad de la solución depende de la longitud de la cadena de galactomanano que contiene. 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. 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 y está incluido en el Código Alimentario Argentino (Art.1368, Inc. N° 73).

Para evaluar la compatibilidad termodinámica del sistema NaCAS-GG, mezclas en el rango de concentraciones de 0,5-4,0 %^{P/P} y 0,05-0,45 %^{P/P} respectivamente, a pH 6,80 se incuban por 24 hs. a 35 °C en condiciones de T y humedad controladas (Spyropoulos *et al.*, 2010). Luego se realiza una inspección visual. El diagrama de fases correspondiente revela una limitada compatibilidad termodinámica dependiendo de las concentraciones de ambos biopolímeros (Figura 8). A bajas concentraciones de ambos biopolímeros se observa una sola fase, mientras que a concentraciones más altas predomina la separación de fases segregativa, siendo la fase inferior rica en NaCAS y la fase superior rica en GG.

Figura 8

Otros autores también observaron separación de fases pero a concentraciones de NaCAS y GG más altas que las aquí reportadas (Antonov *et al.*, 1999; Neiryneck *et al.*, 2007). Estos autores trabajaron a un pH similar pero a temperaturas más bajas y realizaron los diagramas de fase solamente una hora después de realizadas las mezclas. Aunque una mezcla de dos biopolímeros sea termodinámicamente inestable, la separación de fases puede no observarse en el periodo experimental debido a la existencia de una barrera de energía cinética asociada con el movimiento restringido de las moléculas. En especial, si uno o ambos biopolímeros son altamente viscosos o forman geles, la velocidad y extensión de la separación de fases puede ser retrasada (Bryant and McClements, 2000). Por lo tanto, es posible que un sistema aparentemente monofásico al principio se transforme en bifásico luego de un tiempo.

Para evaluar el efecto de la adición de GG sobre la cinética del proceso de agregación de la mezcla NaCAS/GG y el estado final de los agregados formados, se analiza la variación de los parámetros t_{ag} , pH_{ag} y D_f a una C_{NaCAS} constante de 0,5 %^{P/P}, T 35°C, R 0,5, y concentraciones variables de GG (C_{GG} : 0-0,3 %^{P/P}). Los resultados se muestran en la Figura 9.

Figura 9

El tamaño medio inicial (β a $t = 0$) de las partículas de las diferentes mezclas NaCAS/GG es mayor a medida que aumenta la C_{GG} , lo que podría estar indicando la formación inicial de agregados o submicelas de NaCAS cada vez más grandes y que conducirían a la separación de fases segregativa (Figura 9A). Durante la agregación ácida, para el rango de C_{GG} evaluado, no se observan cambios significativos en la velocidad de descenso de pH, ni en el t_{ag} ($20,0 \pm 0,5$ min), ni en el pH_{ag} ($4,6 \pm 0,2$) a los cuales comienza dicho proceso, excepto en presencia de una C_{GG} de 0,30 %^{P/P}, donde el t_{ag} disminuye a $12,5 \pm 0,5$ min y el pH_{ag} aumenta a $5,1 \pm 0,2$. A esta C_{GG} comienza a observarse separación de fases entre ambos biopolímeros y, por lo tanto, hay un aumento de la concentración local proteica disminuyendo así la estabilidad en solución y acelerando el proceso de agregación ácida. El grado de compactación de los agregados

finales (D_f) no varía significativamente ante la adición de GG en el rango de concentraciones evaluado ($4,00 \pm 0,15$).

A concentraciones de NaCAS lo suficientemente altas para que la acidificación conduzca a la formación de un gel, se realizan ensayos reológicos para evaluar el efecto de los factores R, T, C_{GG} y C_{NaCAS} sobre las variables respuestas t_{gel} , pH_{gel} y $G'_{m\acute{a}x}$. Se aplica un diseño factorial fraccionado 2^{4-1} para evaluar la significancia de los efectos de las variables independientes. En la Tabla 2 se muestran los valores de las variables independientes no codificadas, codificadas (-1 y +1) y las respuestas obtenidas.

Tabla 2

Todos los factores independientes estudiados y las interacciones entre C_{NaCAS} , C_{GG} , R y T resultan significativos para t_{gel} ($p < 0,05$), obteniéndose la siguiente ecuación modelo no codificada para la variación de t_{gel} :

$$t_{gel} = 142,11 - 21,22 C_{NaCAS} - 189,68 C_{GG} - 30,36 R - 0,837 T + 44,96 C_{NaCAS} C_{GG} + 1,99 C_{NaCAS} R + 0,059 C_{NaCAS} T$$

El aumento de la C_{NaCAS} produce un descenso del t_{gel} debido al incremento de la probabilidad de colisiones efectivas durante la formación de los agregados iniciales de NaCAS. La presencia de la GG genera dos efectos opuestos. Por una parte, un incremento en la C_{GG} promueve un descenso del t_{gel} debido a la incompatibilidad entre ambos biopolímeros, la cual induce un incremento en la concentración efectiva de NaCAS. Por otra parte, la GG produce un aumento de la viscosidad del medio, especialmente a $C_{GG} > 0,30$ % P/P. La etapa inicial de formación de la red de gel depende de la velocidad de agregación de las partículas de NaCAS, la cual está limitada por la difusión de las mismas. Debido a que la viscosidad relativa aumenta ocho veces entre la mínima y la máxima C_{GG} ensayadas, se produce un importante descenso en la difusión de las partículas de NaCAS y, como resultado de esto, un incremento en t_{gel} . El primer efecto predomina a bajas concentraciones de uno de los biopolímeros y altas del otro, mientras que el segundo efecto predomina a altas concentraciones de ambos biopolímeros (Figura 10). Esto explicaría la interacción de los efectos de las concentraciones de ambos biopolímeros.

Figura 10

Al aumentar R, se incrementa la velocidad a la cual los grupos protonables del NaCAS se neutralizan y, por lo tanto, t_{gel} disminuye. Por otro lado, cuando T aumenta, también lo hace la velocidad del proceso de gelación y las interacciones de tipo hidrofóbicas son más intensas ($\Delta H > 0$). La ausencia de interacción entre T y C_{GG} en el modelo matemático puede deberse a que ambos factores tienen efectos opuestos sobre la viscosidad del medio.

La siguiente ecuación representa el modelo matemático en variables no codificadas para la respuesta pH_{gel} :

$$pH_{gel} = 4,69 + 0,08 C_{NaCAS} + 0,07 C_{GG} - 0,20 R - 0,12 T - 0,10 C_{NaCAS} C_{GG} + 0,09 C_{NaCAS} T$$

A las concentraciones ensayadas de ambos biopolímeros ocurre una separación de fases segregativa (Figura 8) y, como consecuencia del aumento de concentración local proteica, se produce la formación previa de agregados o submicelas de NaCAS y por lo tanto la desestabilización ocurre a pH más altos. Cuando T aumenta, la constante de fijación de protones disminuye ($\Delta H_{d,i} > 0$), por lo cual se necesita una mayor concentración de protones (menor pH) para que el NaCAS alcance la desestabilización electrostática. Cuando R se incrementa, aumenta la concentración de protones generada por la hidrólisis de la GDL y entonces el pH_{gel} es menor.

El modelo matemático con variables no codificadas para G'_{\max} se muestra en la siguiente ecuación:

$$G'_{\max} = 280,3 + 271,2C_{\text{NaCAS}} - 122,5C_{\text{GG}} + 125,9R - 267,9T - 122,6C_{\text{NaCAS}}C_{\text{GG}} + 126,3C_{\text{NaCAS}}R - 259,9C_{\text{NaCAS}}T$$

Cuanto mayor sea la C_{NaCAS} , mayor será el carácter elástico (G'_{\max}) de los geles formados debido a la mayor cantidad de partículas proteicas involucradas en la formación de la malla del gel y, por lo tanto, mayores interacciones involucradas en la reestructuración y compactación de la misma.

Como ya se había descrito, altas C_{GG} conducen a incompatibilidad termodinámica con el NaCAS. Por otro lado, Antonov y col. han sugerido la existencia de una pequeña cantidad de grupos funcionales cargados positivamente en las moléculas de GG y la formación de un complejo mediante una débil interacción iónica entre el NaCAS cargado negativamente ($\text{pH} > \text{pI}$) y los mencionados grupos cargados positivamente en la GG (Antonov *et al.*, 1999). La formación de estos complejos reducirían los sitios hidrofóbicos expuestos que participan en la formación de interacciones hidrofóbicas y que conducen a la compactación y al aumento de elasticidad del gel. Por lo tanto, a altas C_{GG} los geles tienen un menor componente elástico.

El incremento de G'_{\max} al aumentar R, que a la vez conduce a una disminución del pH_{gel} , indicaría la existencia de una estabilidad electrostática residual durante el proceso de gelación, es decir, algunos grupos aminoácidos conservarían su carga negativa. Si la gelación comienza a mayores pH_{gel} , la carga negativa remanente inhibiría las interacciones entre las partículas de NaCAS, conduciendo a la formación de agregados menos compactos y por tanto geles con menor carácter elástico. En cambio, en este caso, el pH_{gel} disminuye cuando R aumenta, favoreciéndose el carácter elástico de los geles.

Los cambios de T producen dos efectos opuestos. Por una parte, un incremento de T promueve la formación de interacciones hidrofóbicas ($\Delta H > 0$) que participan en la estructuración de la malla de gel. Por otra parte, un aumento de T conduce a la disminución del t_{gel} y, como resultado, se limitan los reordenamientos de las interacciones en la red de gel. Los geles formados en menor tiempo serían menos compactos y menos elásticos. El efecto predominante sería este último.

En la Figura 11 pueden observarse las imágenes de la microestructura de los geles mixtos NaCAS/GG obtenidos a diferentes T y/o R. Las zonas oscuras representan los poros o intersticios.

Figura 11

Se observa que la imagen B no muestra poros definidos como los que se observan en la imagen A. Al aumentar T, se incrementa la velocidad de descenso de pH y la difusión de las partículas llevando a una formación más rápida de la malla de gel, pudiéndose notar en la imagen B partículas sin agregar. A menor T, el proceso de gelación se realiza más lentamente y la malla de gel puede reestructurarse por ruptura de algunas interacciones y formación de otras nuevas, obteniéndose una malla más apretada y, por lo tanto, con poros más pequeños. En la imagen C puede verse el efecto combinado del descenso de R y T con respecto a la imagen B pero a mayor T que la imagen A, distinguiéndose poros definidos pero de tamaño más grandes que en A.

Cuando R permanece constante (imágenes A y B), aumenta el tamaño promedio de poro al incrementarse la T, desde $(3,92 \pm 0,02) \mu\text{m}$ a $(5,04 \pm 0,03) \mu\text{m}$. El efecto combinado de R y T ($0,75$ y 30°C) origina poros con un tamaño medio intermedio de $(4,51 \pm 0,02) \mu\text{m}$. Estos resultados muestran que el grado de

compactación y el diámetro medio de los poros dependen de la velocidad de gelación, la cual se incrementa con el aumento de T. Cuando el proceso de gelación es más lento, la red de gel puede reestructurarse produciendo una red más compacta con poros más pequeños. Cavallieri y da Cunha (2008) también reportaron que la velocidad de gelación afecta la dureza y la elasticidad de los geles de NaCAS (Cavallieri and da Cunha, 2008).

3.3.2.3. Sistemas NaCAS - GX

La GX, polisacárido aniónico extracelular producido por la bacteria *Xanthomonas campestris* B-1459, da origen a soluciones acuosas altamente viscosas, estables en un amplio rango de pH, concentración de sales y temperaturas, características favorables para su empleo como espesante. El heteropolímero pasa por transiciones conformacionales (ordenada-desordenada) que dependen de la fuerza iónica y/o temperatura (Li *et al.*, 2006). La molécula de GX consta de una cadena principal de D-glucopiranosilo con enlace β 1-4, como en la celulosa. A la cadena principal se anexan cadenas laterales de trisacárido compuestas por residuos de D-manopiranosilo y de ácido D-glucopiranosilurónico. Los residuos de manosilo con enlace a 1-2 tienen sustitutos 6-O-acetilo. Un promedio de aproximadamente la mitad de los grupos terminales del α -D-manosilo tienen sustitutos 4,6-O-(1-carboxietilideno) (Coviello *et al.*, 1986).

La GX se adiciona a los alimentos para controlar la reología del producto final ya que el polímero produce un gran efecto sobre propiedades como la textura, liberación de aroma y apariencia, que contribuyen a la aceptabilidad del producto para su consumo. Está incluida en el Código Alimentario Argentino en el Art. 1398, Inc. N° 171. En solución presenta carácter pseudoplástico generando una sensación menos gomosa en la boca que las gomas con comportamiento newtoniano. Es ampliamente utilizado en diferentes industrias: alimentaria, farmacéutica, cosmética, agrícola y petrolera, entre otras, por sus propiedades espesantes y estabilizantes, y por sus características reológicas.

Las interacciones entre NaCAS y GX han sido estudiadas en relación al uso de la GX en productos lácteos emulsificados (Hemar *et al.*, 2001; Moschakis *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2009) y gelificados (Braga and Cunha, 2004), así como en soluciones acuosas (Hemar *et al.*, 2001; Nash *et al.*, 2002; Kobori *et al.*, 2009). Pero, debido a que el control de las interacciones entre proteína y polisacárido es clave para el desarrollo de nuevos productos lácteos, es necesario profundizar el estudio de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las mezclas NaCAS/GX.

A fin de evaluar la existencia de incompatibilidad termodinámica ocasionada por las interacciones entre el NaCAS y la GX, se realizan mezclas de ambos biopolímeros en distintas concentraciones (C_{GX} : 0 - 0,45% P/P; C_{NaCAS} : 0 - 4% P/P), a pH 6,80 y se incuban 24 o 48 hs. a 25 o 35°C, en condiciones de T y humedad controladas. Luego de este período, se verifica la existencia o no de separación de fases y/o aparición de turbidez mediante una inspección visual. Todas las mezclas analizadas presentan separación total de fases, es decir, que se detecta incompatibilidad termodinámica en todo el rango de concentraciones y tiempo ensayado.

A bajas concentraciones de ambos biopolímeros se evalúa el proceso de agregación ácida del NaCAS inducida por GDL. Para ello, se aplica un diseño factorial completo 2^3 para evaluar la significancia de los efectos de los factores independientes T (15 y 35°C), R (0,35 y 1,0) y C_{GX} (0,010 y 0,075% P/P) sobre las variables dependientes t_{ag} , pH_{ag} y la D_f de los agregados formados, a una C_{NaCAS} constante de 0,5 % P/P. En este

estudio se comprueba que la C_{GX} sólo resulta significativa para D_f , como se observa en el siguiente modelo matemático con variables codificadas:

$$D_f = 3,95 + 0,07T - 0,08C_{GX} + 0,06TC_{GX}$$

La GX posee carga negativa al pH isoiónico del NaCAS, por lo tanto su adición a las soluciones de NaCAS conduce a un aumento de la estabilidad electrostática de las partículas proteicas antes y durante la agregación, induciendo así la formación de agregados menos compactos. Por otra parte, el aumento de la C_{GX} modifica sustancialmente la viscosidad del medio, disminuyendo la velocidad de agregación, lo que permitiría una mayor reestructuración de los agregados. Estos dos efectos opuestos dan como resultado una leve disminución de la D_f con la C_{GX} en el rango ensayado. Los valores más grandes de D_f se observan para los menores valores de C_{GX} y los mayores valores de T (Figura 12).

Figura 12

A altas C_{NaCAS} , el estudio de las propiedades reológicas de los geles ácidos de NaCAS en presencia de GX se realiza a partir de un diseño factorial fraccionado 2^{4-1} que permite evaluar la significancia de los efectos de las variables independientes T (15 y 35°C), R (0,35 y 1,0), C_{GX} (0,10 y 0,20% P/P) y C_{NaCAS} (3 y 5% P/P) sobre las variables respuestas t_{gel} , pH_{gel} y $G'_{máx}$. En la Tabla 3 se muestran los valores de las variables codificadas (+1 y -1) y no codificadas independientes y de respuestas obtenidos.

Tabla 3

Sólo el término lineal C_{GX} resultó estadísticamente significativo para las variables respuesta t_{gel} y pH_{gel} y, mediante ajuste factorial, se obtienen las siguientes ecuaciones que presentan los modelos en variables no codificadas:

$$t_{gel} = 25,56 - 111,20 C_{GX}$$

$$pH_{gel} = 5,10 + 5,25 C_{GX}$$

Las ecuaciones anteriores indican que un incremento de la C_{GX} conduce a una disminución del t_{gel} y a un aumento del pH_{gel} . En forma similar a lo descrito para la GG, la presencia de GX induciendo una separación de fases segregativa y el consiguiente aumento de la concentración local de NaCAS, conduce a que comience antes la gelación y a un pH mayor. De la misma forma, este efecto contribuye a la formación de una malla de gel más elástica, como puede observarse en la siguiente ecuación modelo en variables no codificadas:

$$G'_{máx} = 692,47 + 14244,4 C_{GX} - 21,977 R - 19,578 T - 8936,06 C_{GX} R$$

Como ya se había comentado, un aumento de T o R restringe los reordenamientos en la red de gel por formarse ésta más rápidamente.

La microestructura de los geles ácidos proteicos formados por mezclas de NaCAS 3% P/P y GX, a 25°C y R de 0,5, con C_{GX} variable (0 - 0,2 %P/P) se evalúa mediante el análisis digital de imágenes obtenidas por OCM. En la Figura 13 se compara la microestructura de cuatro geles obtenidos a diferentes C_{GX} . Se observa que la presencia de GX aumenta el grado de compactación de los geles y dicho efecto crece con la concentración del polisacárido, en coincidencia con lo descrito en los resultados para el módulo elástico. Además, el tamaño medio de los poros disminuye significativamente desde $(4,57 \pm 0,04) \mu m$ en ausencia de GX hasta $(3,98 \pm 0,04) \mu m$ en presencia de la máxima C_{GX} ensayada.

Figura 13

3.3.3. Conclusión

Tanto el proceso de agregación como el de gelación ácidos del NaCAS es afectado por la presencia de los polisacáridos estudiados. El efecto de los mismos depende de sus características químicas, carga y viscosidad que poseen sus soluciones acuosas, así como el grado de compatibilidad termodinámica de sus mezclas con el NaCAS.

3.3.4. Referencias bibliográficas

- Alvarez, E., *et al.* (2007). "Calcium-induced aggregation of bovine caseins: effect of phosphate and citrate". *Colloid & Polymer Science*, 285(5), 507-514.
- Antonov, Y. A., *et al.* (1999). "On the one-phase state of aqueous protein-uncharged polymer systems: Casein-guar gum system". *Journal of Applied Polymer Science*, 71(3), 471-482.
- Baeza, R., *et al.* (2003). "Gelation of [beta]-lactoglobulin in the presence of propylene glycol alginate: kinetics and gel properties". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31(1-4), 81-93.
- Braga, A. L. M. and Cunha, R. L. (2004). "The effects of xanthan conformation and sucrose concentration on the rheological properties of acidified sodium caseinate-xanthan gels". *Food Hydrocolloids*, 18(6), 977-986.
- Bryant, C. M. and McClements, D. J. (2000). "Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denatured whey protein solutions and gels". *Food Hydrocolloids*, 14(4), 383-390.
- Cancela, M. A., *et al.* (2005). "Effects of temperature and concentration on carboxymethylcellulose with sucrose rheology". *Journal of Food Engineering*, 71(4), 419-424.
- Capitani, C., *et al.* (2007). "Influence of complexing carboxymethylcellulose on the thermostability and gelation of [alpha]-lactalbumin and [beta]-lactoglobulin". *Food Hydrocolloids*, 21(8), 1344-1354.
- Cavallieri, A. L. F. and da Cunha, R. L. (2008). "The effects of acidification rate, pH and ageing time on the acidic cold set gelation of whey proteins". *Food Hydrocolloids*, 22(3), 439-448.
- Corredig, M., *et al.* (2011). "Polysaccharide-protein interactions in dairy matrices, control and design of structures". *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1833-1841.
- Costa, J. P. (2011). *Estudio reoóptico de geles ácidos de proteínas lácteas de origen bovino*. Degree Thesis. Rosario, Universidad Nacional de Rosario.
- Coviello, T., *et al.* (1986). "Solution properties of xanthan. 1. Dynamic and static light scattering from native and modified xanthans in dilute solutions". *Macromolecules*, 19(11), 2826-2831.
- Dahbi, L., *et al.* (2010). "Rheology and structural arrest of casein suspensions". *Journal of Colloid and Interface Science*, 342(2), 564-570.
- de Jong, S. and van de Velde, F. (2007). "Charge density of polysaccharide controls microstructure and large deformation properties of mixed gels". *Food Hydrocolloids*, 21(7), 1172-1187.
- de Kruif, C. G. (1997). "Skim Milk Acidification". *Journal of Colloid and Interface Science*, 185(1), 19-25.
- de Kruif, C. G. and Tuinier, R. (2001). "Polysaccharide protein interactions". *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), 555-563.

- de Kruijff, C. G., *et al.* (2004). "Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides". *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9(5), 340-349.
- Dickinson, E. (1998). "Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions". *Trends in Food Science & Technology*, 9(10), 347-354.
- Dickinson, E. (2013). "Stabilising emulsion-based colloidal structures with mixed food ingredients". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(4), 710-721.
- Doublier, J. L., *et al.* (2000). "Protein-polysaccharide interactions". *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5(3-4), 202-214.
- Du, B., *et al.* (2007). "The stabilization mechanism of acidified milk drinks induced by carboxymethylcellulose". *Lait*, 87(4-5), 287-301.
- Dziuba, J., *et al.* (1999). "Fractal analysis of caseinate structure". *International Dairy Journal*, 9(3-6), 287-292.
- Ennis, M. P. and Mulvihill, M. D. (2000). *Milk proteins*. Cork: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.
- Farrell, H., *et al.* (1996). "Particle sizes of casein submicelles and purified κ -casein". *Macromolecular Interactions in Food Technology*. N. Parris, L. Creamer and J. Pearce. Washington: American Chemical Society.
- Farrell, H. J., *et al.* (2003). "Higher order structures of caseins: a paradox". *Advanced dairy chemistry* (Cap. 4). P. F. P. M. Sweeney. New York: Academic Plenum Publishers.
- Farrell, H. M. J., *et al.* (2002). "The caseins of milk as calcium binding proteins". *Calcium binding proteins* (91-140). Vogel. Totowa, NJ: Humana Press.
- Foegeding, A. E., *et al.* (2003). "Sensory and mechanical aspects of cheese texture". *International Dairy Journal*, 13(8), 585-591.
- Foegeding, A. E., *et al.* (2010). "Using dairy ingredients to alter texture of foods: Implications based on oral processing considerations". *International Dairy Journal*, 20(9), 562-570.
- Fox PF, M. D. (1983). "Physico-chemical aspects of dehydrated protein-rich milk products". International Dairy Federations Symposium, Hillerod, Denmark.
- Gaucheron, F. L. G., Y.; Boyaval, E.; Piot, M. (1997). "Binding of cations to casein molecules. Importance of physicochemical conditions". *Milchwissenschaft*, 52 322-327.
- Goff, H. D. (2002). "Formation and stabilisation of structure in ice-cream and related products". *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(5-6), 432-437.
- Grinberg, V. Y. and Tolstoguzov, V. B. (1997). "Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions". *Food Hydrocolloids*, 11(2), 145-158.
- HadjSadok, A., *et al.* (2008). "Characterisation of sodium caseinate as a function of ionic strength, pH and temperature using static and dynamic light scattering". *Food Hydrocolloids*, 22(8), 1460-1466.
- Hemar, Y., *et al.* (2001). "Viscosity, microstructure and phase behavior of aqueous mixtures of commercial milk protein products and xanthan gum". *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), 565-574.
- Hemar, Y., *et al.* (2001). "Viscosity, microstructure and phase behaviour of aqueous mixtures of commercial milk protein products and xanthan gum.". *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), 565-574.
- Hidalgo, M. E., *et al.* (2011). "Comparative study of bovine and ovine caseinate aggregation processes: Calcium-induced aggregation and acid aggregation". *Protein Aggregation* (199-222). D. A. Stein. Hauppauge, NY: Nova Publishers.

- Hiller, B. and Lorenzen, P. C. (2008). "Surface Hydrophobicity of Physicochemically and Enzymatically Treated Milk Proteins in Relation to Techno-functional Properties". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(2), 461-468.
- Holt, C. and Sawyer, L. (1993). "Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of primary and secondary structures of the α_{s1} -, β - and κ -caseins". *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 89(15), 2683-2692.
- Horne, D. S. (1987). "Determination of the fractal dimension using turbidimetric techniques. Application to aggregating protein systems". *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 83(0), 259-270.
- Horne, D. S. (1989). "Application of fractal concepts to the study of casein aggregation phenomena.". *Journal of Dairy Research*, 56 535-541.
- Ingrassia, R., et al. (2013). "Application of a digital image procedure to evaluate microstructure of caseinate and soy protein acid gels". *LWT - Food Science and Technology*, 53(1), 120-127.
- Karami, M., et al. (2009). "Changes in the rheological properties of Iranian UF-Feta cheese during ripening". *Food Chemistry*, 112(3), 539-544.
- Kobori, T., et al. (2009). "pH-dependent interaction between sodium caseinate and xanthan gum.". *Carbohydrate Polymers.*, 75(4), 719-723.
- Li, J., et al. (2006). "Gelation of whey protein and xanthan mixture: Effect of heating rate on rheological properties". *Food Hydrocolloids*, 20(5), 678-686.
- Lucey, J. A., et al. (1998). "A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono- $[\delta]$ -lactone". *Food Research International*, 31(2), 147-155.
- Lucey, J. A., et al. (1997). "Properties of acid casein gels made by acidification with glucono- $[\delta]$ -lactone. 2. Syneresis, permeability and microstructural properties". *International Dairy Journal*, 7(6-7), 389-397.
- Moschakis, T., et al. (2005). "Microstructural evolution of viscoelastic emulsions stabilised by sodium caseinate and xanthan gum.". *Journal of Colloid and Interface Science.*, 284(2), 714-728.
- Nash, W., et al. (2002). "Dynamic light scattering investigation of sodium caseinate and xanthan mixtures.". *International Journal of Biological Macromolecules.*, 30(5), 269-271.
- Neiryneck, N., et al. (2007). "Influence of pH and biopolymer ratio on sodium caseinate—guar gum interactions in aqueous solutions and in O/W emulsions". *Food Hydrocolloids*, 21(5-6), 862-869.
- Nishinari, K., et al. (2000). "Hydrocolloid gels of polysaccharides and proteins". *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5(3-4), 195-201.
- Pitkowski, A., et al. (2008). "Structure and dynamical mechanical properties of suspensions of sodium caseinate". *Journal of Colloid and Interface Science*, 326(1), 96-102.
- Pugnaloni, L. A., et al. (2005). "Microstructure of acid-induced caseinate gels containing sucrose: Quantification from confocal microscopy and image analysis". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 42(3-4), 211-217.
- Rinaudo, M. (2001). "Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states". *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), 433-440.
- Risso, P., et al. (2007). "Effect of size, proteic composition, and heat treatment on the colloidal stability of proteolyzed bovine casein micelles". *Colloid & Polymer Science*, 285(7), 809-817.

- Rodríguez Patino, J. M. and Pilosof, A. M. R. (2011). "Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces". *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1925-1937.
- Sandolo, C., *et al.* (2007). "Dynamo-mechanical and rheological characterization of guar gum hydrogels". *European Polymer Journal*, 43(8), 3355-3367.
- Shih, W.-H., *et al.* (1990). "Scaling behavior of the elastic properties of colloidal gels". *Physical Review A*, 42(8), 4772.
- Spyropoulos, F., *et al.* (2010). "Effect of sucrose on the phase and flow behaviour of polysaccharide/protein aqueous two-phase systems". *Food Hydrocolloids*, 24(2-3), 217-226.
- Stanley, D. W., *et al.* (1996). "Texture-structure relationships in foamed dairy emulsions". *Food Research International*, 29(1), 1-13.
- Swaigood, H. E. (1982). "Chemistry of milk proteins". *Developments in dairy chemistry* (1-60). P. F. Fox. London.
- Syrbe, A., *et al.* (1998). "Polymer science concepts in dairy systems. An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction". *International Dairy Journal*, 8 179-193.
- Tolstoguzov, V. B. (1991). "Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction". *Food Hydrocolloids*, 4(6), 429-468.
- Turgeon, S. L., *et al.* (2003). "Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects". *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 8(4-5), 401-414.
- Verheul, M. and Roefs, S. P. (1998). "Structure of whey protein gels, studied by permeability, scanning electron microscopy and rheology". *Food Hydrocolloids*, 12 17-24.
- Walstra, P. and de Roos, A. (1993). "Proteins at air-water and oil-water interfaces: Static and dynamic aspects". *Food Reviews International*, 9 503-525.
- Walstra, P., *et al.* (1984). *Dairy chemistry and physics*. New York, USA: John Wiley & Sons.
- West, D. W. (1986). "Structure and function of the phosphorylated residues of casein". *Journal of Dairy Research*, 53(02), 333-352.
- Worning, P., *et al.* (1998). "A Novel Approach to Turbidimetry of Dense Systems: An Investigation of the Enzymatic Gelation of Casein Micelles". *Journal of Colloid and Interface Science*, 203(2), 265-277.
- Zecher, D. and Gerrish, T. (1999). "Cellulose derivatives". *Thickening and gelling agents for food* (60-85). A. Imeson. Gaithersburg: Aspen Publisher.
- Zhao, Q., *et al.* (2009). "Effect of xanthan gum on the physical properties and textural characteristics of whipped cream.". *Food Chemistry*, 116(3), 624-628.

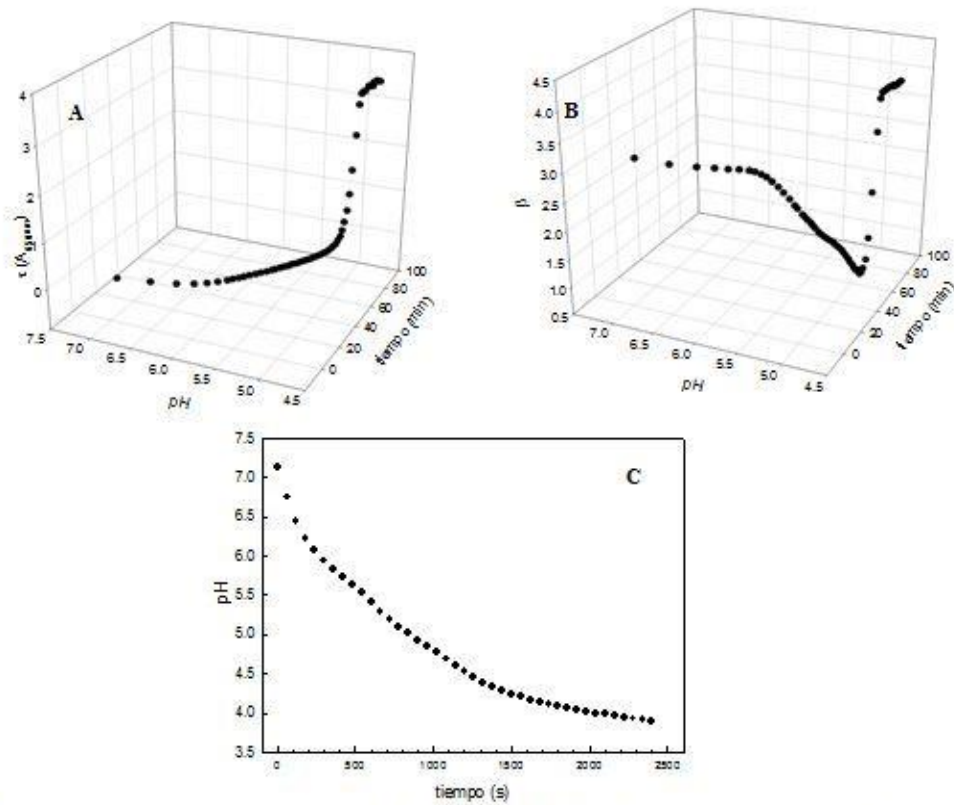


Figura 1. Variaciones de la τ (como A_{650nm}) (A), del parámetro β (B) en función del tiempo y del pH, y variación del pH en función del tiempo (C), luego de adición de la GDL. Concentración de NaCAS 0,5% P/p, R 0,5 y T 35°C.

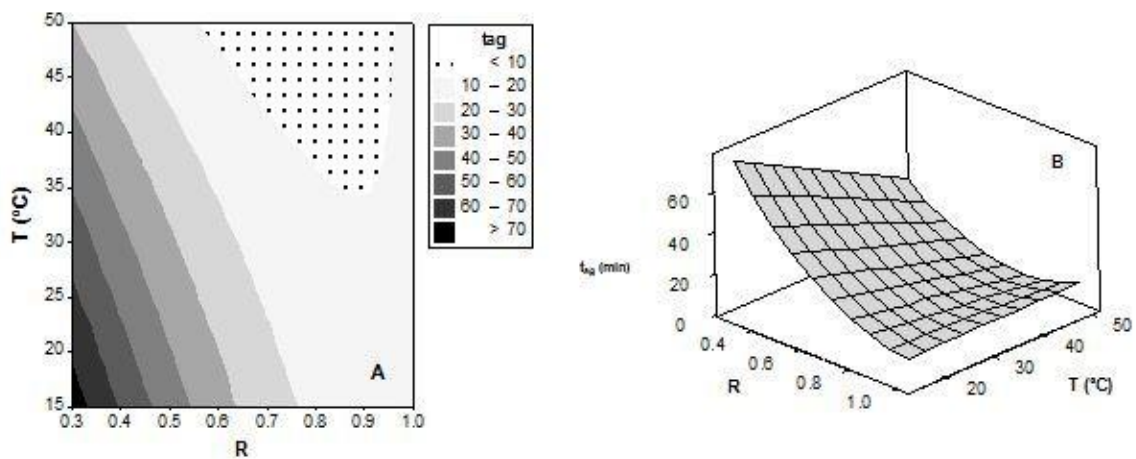


Figura 2. Gráficos de contorno (A) y de superficie de respuesta (B) de t_{3g} (en min) vs. R y T. Concentración de NaCAS 0,5% P/p.

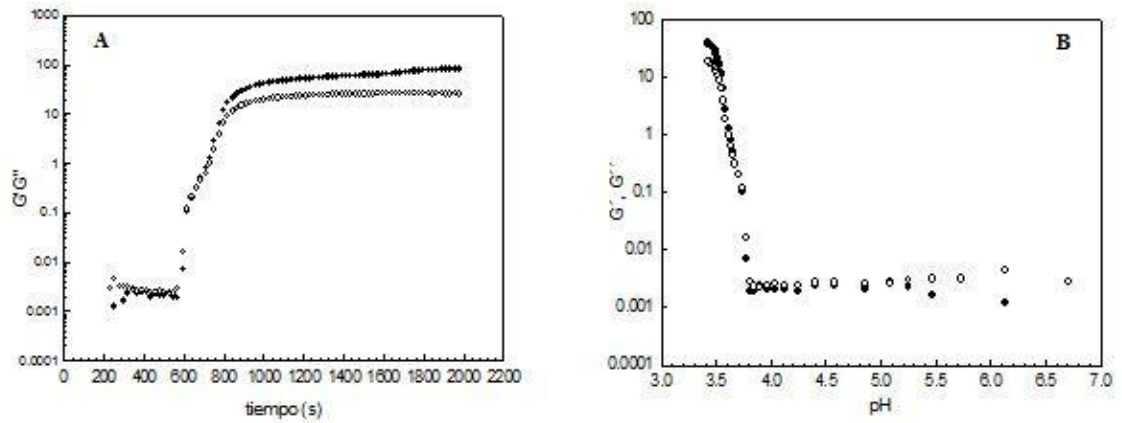


Figura 3. Variación de G' y G'' en función del tiempo (A) y del pH (B) una vez adicionada la GDL. (●) G' , (○) G'' . Concentración NaCAS 3% P/p , R 1 y T 35°C.

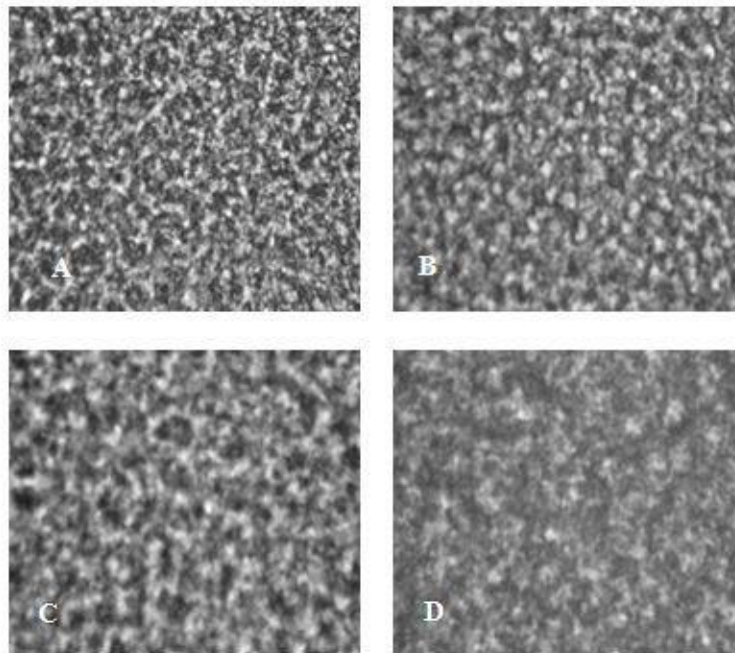


Figura 4. Imágenes de los geles de NaCAS obtenidas por OCM (9.1x) para distintos R: (A) 0,35; (B) 0,5; (C) 0,7 y (D) 1,0. T 35°C; C_{NaCAS} 3% P/p .

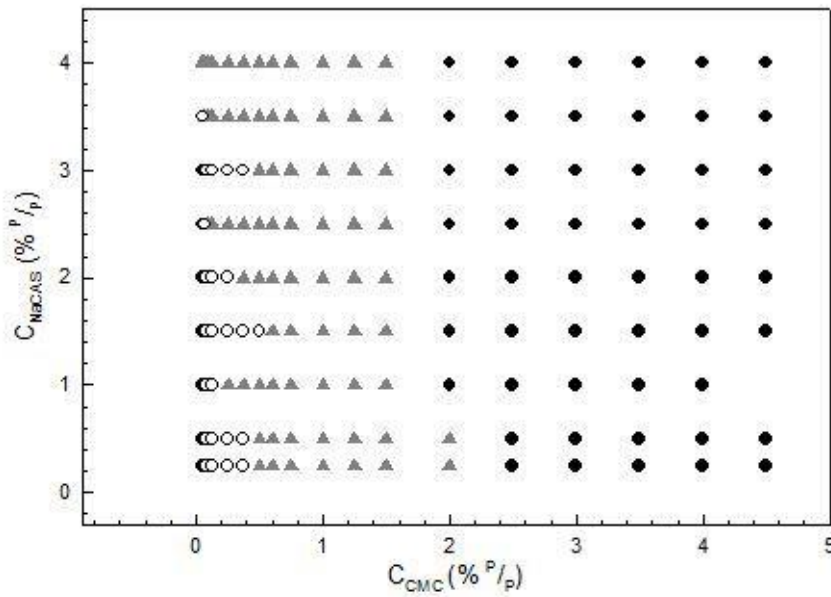


Figura 5. Curva de Incompatibilidad Termodinámica NaCAS/CMC. T 35°C; 24hs. de incubación: (○) una fase homogénea; (△) turbio con alguna separación o dos fases; (●) dos fases tipo gel.

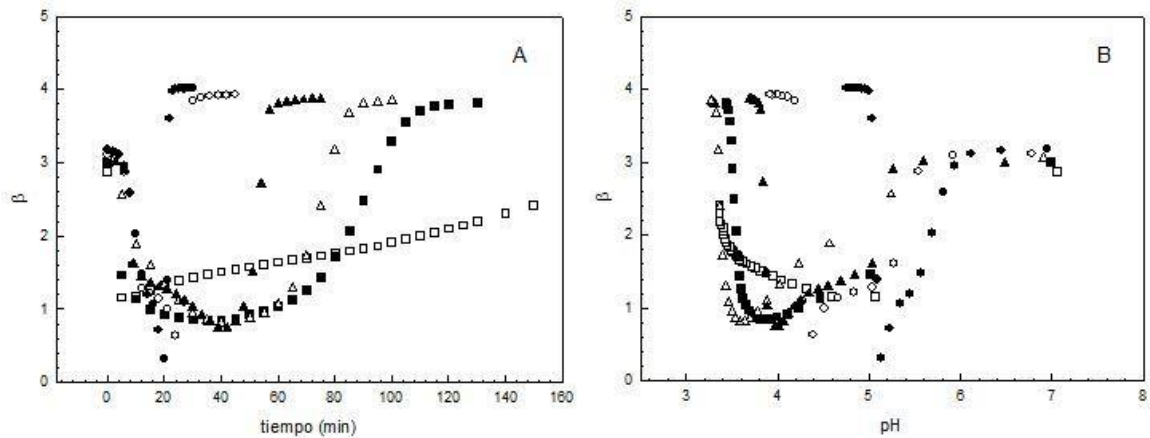


Figura 6. Variaciones del parámetro β con el tiempo (A) y con el pH (B) luego de adicionada GDL: (●) NaCAS R 0,7 y mezclas NaCAS:CMC: (○) 8:1 R 1; (▲) 4:1 R 1; (△) 2:1 R 3; (■) 1:1 R 6; (□) 1:1,5 R 10. C_{NaCAS} 0,5% P/P a T 35°C

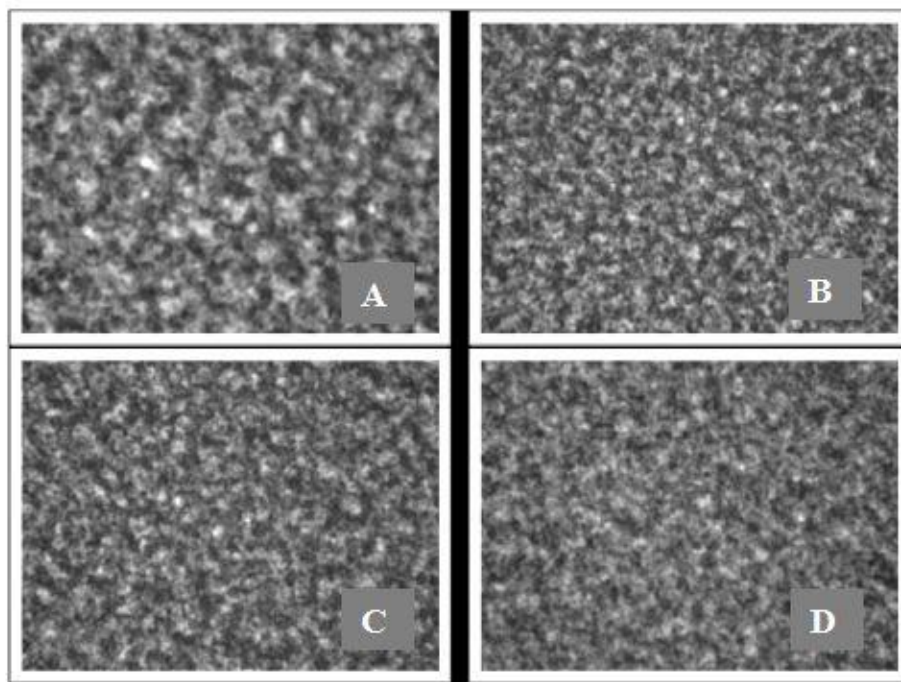


Figura 7. Imágenes de los geles obtenidos usando un microscopio óptico invertido con un objetivo 100x y una cámara digital acoplada con zoom 7.1x. $C_{\text{NaCAS}} 3\% \text{ P/P}$, $T 35^\circ\text{C}$ y $R 1$, para diferentes relaciones NaCAS:CMC: (A) sin CMC, (B) 8:1, (C) 6:1 y (D) 4:1.

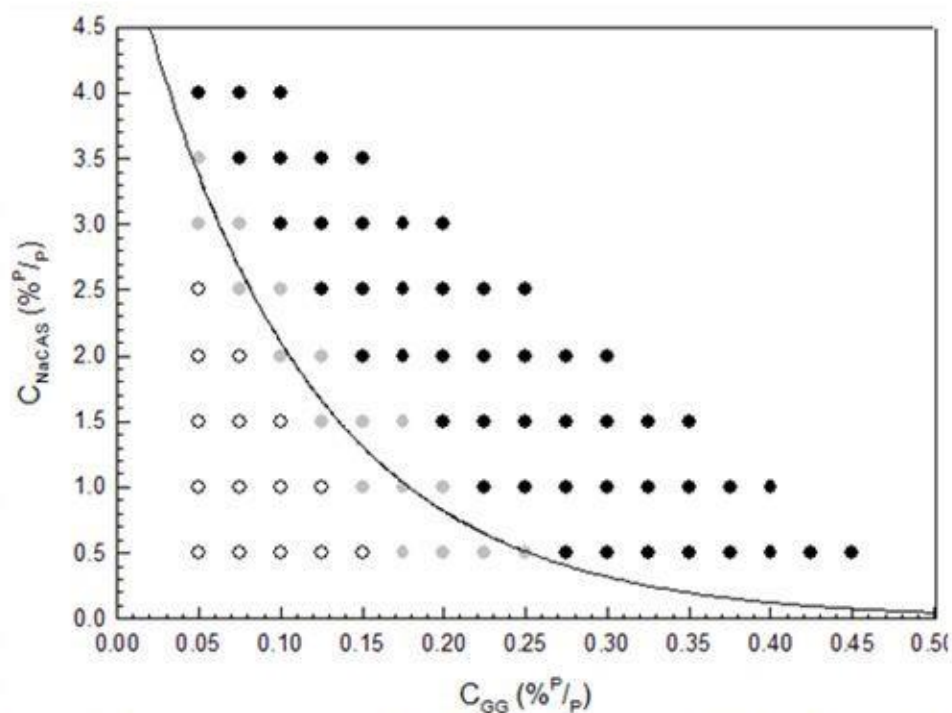


Figura 8. Curva de Incompatibilidad Termodinámica NaCAS/GG. T 35°C; 24hs. de incubación: (○) una sola fase; (◐) turbidez y (●) dos fases.

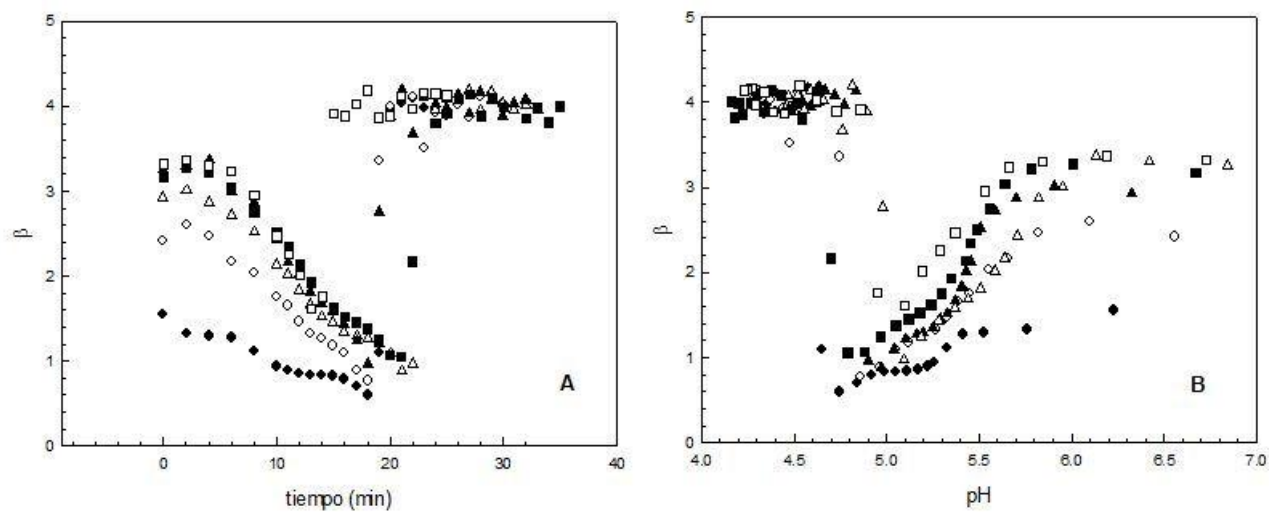


Figura 9. Estudio de la agregación ácida del NaCAS en presencia de GG: (A) β vs. tiempo y (B) β vs. pH; (●) NaCAS y mezclas de NaCAS:GG con concentración de GG (% P/P): (○) 0,05; (▲) 0,10; (Δ) 0,15; (■) 0,20; (□) 0,30. C_{NaCAS} 0,5% P/P; R 0,5; T 35°C.

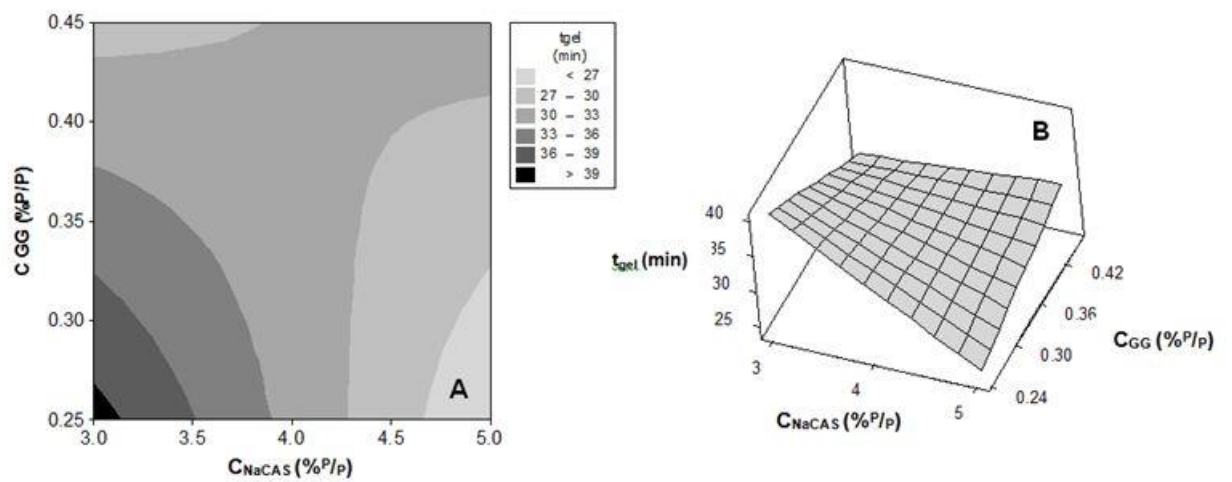


Figura 10. Gráficos de contorno (A) y de superficie (B) de t_{gel} vs. C_{NaCAS} (%P/P) y C_{GG} (%P/P), T 19°C, R 0,5.

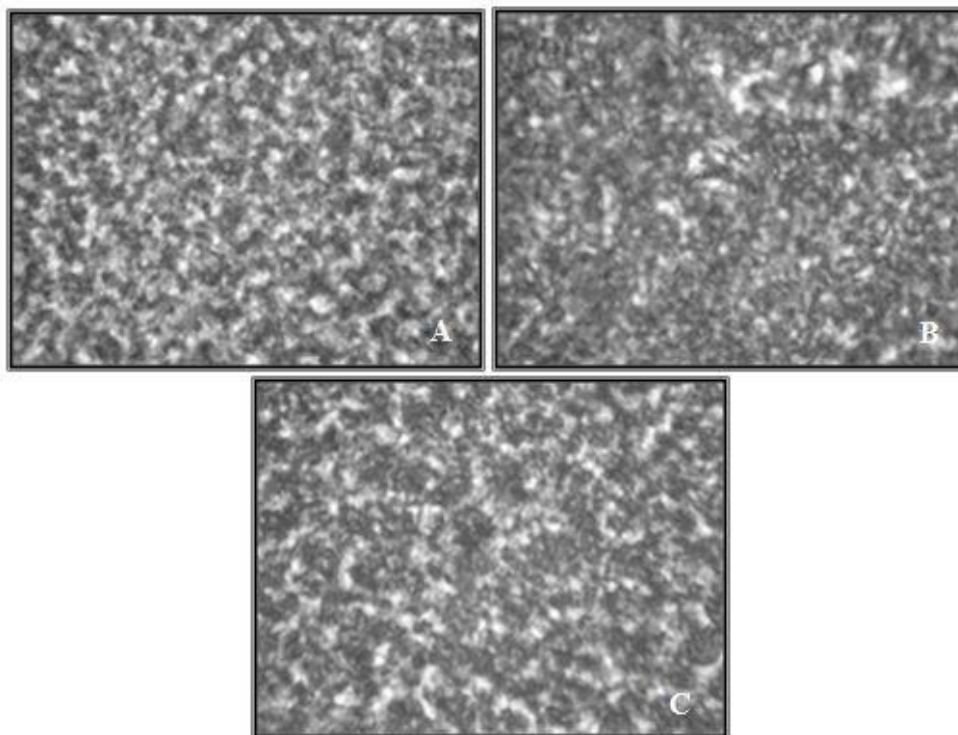


Figura 11. Microestructura de geles ácidos formados por C_{NaCAS} 3%^{P/P}, C_{GG} 0,05%^{P/P} y R 1 a 19°C (A) o R 1 a 50°C (B) o R 0,75 a 30°C (C); objetivo de inmersión de 100x, cámara digital con zoom de 7.1x y adaptador de 52 mm.

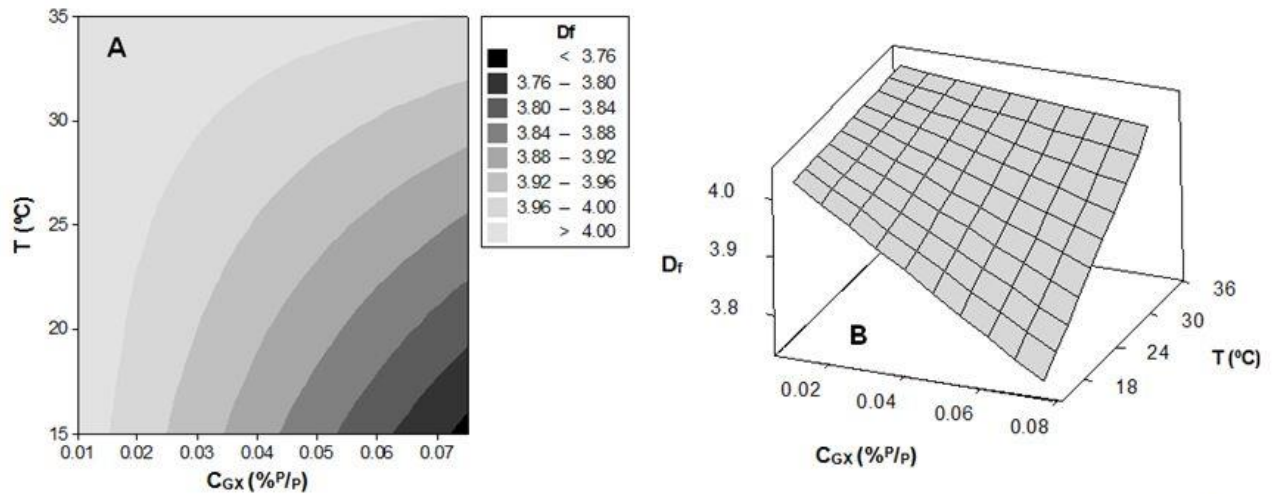


Figura 12. Gráficos de contorno (A) y de superficie de respuesta (B) para D_f vs. C_{GX} y T . C_{NaCAS} 0,5 %P/P.

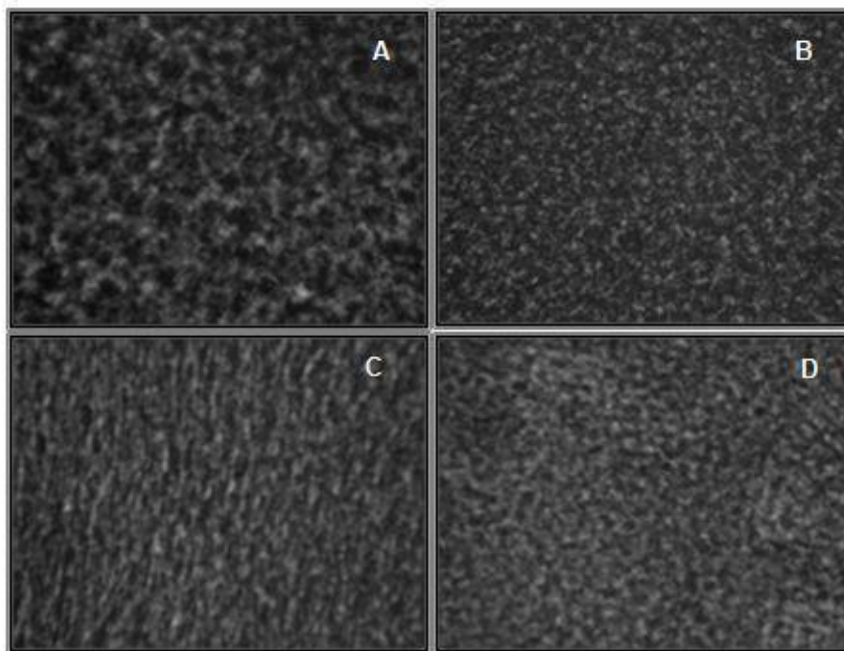


Figura 13. Microestructura de geles ácidos formados por C_{NaCAS} 3%P/P, R 0,5 y T 25°C: (A) sin GX (B) C_{GX} 0,10% P/P (C) C_{GX} 0,15% P/P y (D) C_{GX} 0,20% P/P; objetivo de inmersión de 100x, cámara digital con zoom de 7.1x y un adaptador de 52mm.

Tabla 1. Resultados de t_{gel} , pH_{gel} y G'_{max} para los sistemas formados por NaCAS 3%_{P/P} y C_{CMC} variable, T 35°C y R 1

Sistema	t_{gel} (min) \pm 0,01	$pH_{gel} \pm 0,01$	G'_{max} (Pa) \pm 0,1
NaCAS 3%	7,54	4,72	71,0
NaCAS 3%-CMC 0,375% (8:1)	17,73	4,49	74,4
NaCAS 3%-CMC 0,50% (6:1)	21,50	3,90	51,4
NaCAS 3%-CMC 0,75% (4:1)	24,99	3,77	26,3
NaCAS 3%-CMC 1,5% (2:1)	81,36	3,79	4,8

Tabla 2. Diseño experimental para estudiar los parámetros reológicos de los geles ácidos de NaCAS en presencia de GG

Factores				Respuestas		
C_{NaCAS} (% _{P/P})	C_{GG} (% _{P/P})	R	T (°C)	t_{gel} (min) \pm 0,02	$pH_{gel} \pm 0,02$	G'_{max} (Pa) \pm 0,01
3 (-1)	0,45 (+1)	1 (+1)	19 (-1)	16,80	4,75	14,67
3 (-1)	0,25 (-1)	0,5 (-1)	19 (-1)	40,00	4,88	17,34
5 (+1)	0,45 (+1)	0,5 (-1)	19 (-1)	31,28	4,93	581,95
5 (+1)	0,25 (-1)	1 (+1)	19 (-1)	14,06	4,68	1576,50
5 (+1)	0,45 (+1)	1 (+1)	50 (+1)	4,25	4,54	30,74
3 (-1)	0,25 (-1)	1 (+1)	50 (+1)	7,19	4,00	0,53
3 (-1)	0,45 (+1)	0,5 (-1)	50 (+1)	8,51	4,78	1,50
5 (+1)	0,25 (-1)	0,5 (-1)	50 (+1)	7,42	4,92	16,80

Tabla 3. Diseño experimental para estudiar los parámetros reológicos de los geles ácidos de NaCAS en presencia de GX

Factores				Respuestas		
C_{NaCAS} (%P/p)	C_{GX} (%P/p)	R	T (°C)	t_{gel} (min) \pm 0,02	pH_{gel} \pm 0,02	G'_{max} (Pa) \pm 0,01
3 (-1)	0,2 (+1)	1,00 (+1)	15 (-1)	3,04	6,11	1070,00
3 (-1)	0,1 (-1)	0,35 (-1)	15 (-1)	26,92	5,77	1346,00
5 (+1)	0,2 (+1)	0,35 (-1)	15 (-1)	3,39	6,39	2733,00
5 (+1)	0,1 (-1)	1,00 (+1)	15 (-1)	10,90	5,59	1236,00
5 (+1)	0,2 (+1)	1,00 (+1)	35 (+1)	3,62	5,92	1400,00
3 (-1)	0,1 (-1)	1,00 (+1)	35 (+1)	5,33	5,65	218,65
3 (-1)	0,2 (+1)	0,35 (-1)	35 (+1)	3,23	6,18	2496,25
5 (+1)	0,1 (-1)	0,35 (-1)	35 (+1)	14,61	5,49	484,30

