

AUTORES
AUTHORS

✉ **Gisella SPAHN**¹
Liliana Gabriela SANTIAGO^{1*}
Rosa BAEZA²
Ana Maria PILOSO²

¹Instituto de Tecnología de Alimentos,
Facultad de Ingeniería Química, (UNL),
Ciudad Universitaria, (3000), Santa Fe, Argentina,

²Departamento de Industrias,
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, (UBA),

Ciudad Universitaria (1428),

Buenos Aires, Argentina

*e-mail: lsanti@fiqus.unl.edu.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la temperatura de calentamiento (T), la concentración de sólidos (S) y el pH sobre las características viscoelásticas y mecánicas de geles formados por proteína de suero lácteo (SL) y -carragenina cosecados por spray, para lo cual se utilizó un diseño experimental. Los geles que se obtuvieron en todas las condiciones son geles opacos lo cual indica que son geles agregados. La variación del pH en el rango entre 6 y 7 no produjo un efecto significativo en la dinámica de gelificación, mientras que se observó un efecto pequeño en las propiedades de textura de los geles.

La velocidad de formación de la estructura primaria aumenta con S, independientemente de la T de calentamiento, lo cual indica que esta etapa de la gelificación estaría controlada por la agregación, promovida por la presencia del polisacárido. Sin embargo el posterior desarrollo del gel hasta formar una estructura estable estaría determinado principalmente por la temperatura que, a través del aumento en la velocidad de difusión de las partículas agregadas y del grado de desnaturalización de la proteína, promueve la formación más rápida del gel.

La modificación de estas variables nos permiten obtener un amplio rango de propiedades texturales en los geles obtenidos con el cosecado de SL/ -C. Los geles con mayor carácter sólido se consiguen a mayor T, mayor S y mayor pH.

ABSTRACT

The objective of the present work was to study the effect of the heating temperature (T), solid concentration (S) and pH on the viscoelastic and mechanical characteristics of the gels prepared with co-spray dried sample of whey protein concentrate (SL) and -carrageenan, using an experimental design. The gels obtained in all conditions were opaque and so aggregated gels. The effect of pH was no significant on gelation dynamics while it was significant on textural properties.

The rate of the primary structure formation increases with S, independently of T, indicating that gelation process could be controlled by aggregation and promoted by the presence of the polysaccharide. Never the less the further gel development will be determined by T, producing an increase in the aggregated particles diffusion rate and in the denaturation degree of the proteins and so promoting a rapid gel formation.

A wide range of textural properties of the gels prepared with the co-spray dried sample (SL and -C) could be obtained modifying these factors. Gels with the highest solid character could be obtained at high T, S and pH.

PALABRAS CLAVE
KEY WORDS

suero lácteo, -carragenina,
gelificación, viscoelasticidad, textura.
whey protein, -carrageenan,
gelation, viscoelasticity, texture.

1. INTRODUCCIÓN

El uso de mezclas de proteínas y polisacáridos ofrece la ventaja de que la interacción sinérgica entre los diferentes biopolímeros permite controlar y mejorar las propiedades texturales de los geles formados en base a estos sistemas. El fenómeno que ocurre en estas soluciones mixtas, se conoce como incompatibilidad termodinámica y es comúnmente observado en soluciones de polisacáridos y proteínas a pH por encima del pH isoelectrico de la proteína y en ciertas condiciones de concentración, que dependen del tipo de biopolímero presente en la mezcla (BAEZA y col, 2003).

Las γ -lactoglobulina, uno de los mayores componentes de la proteína de suero lácteo, es el agente gelificante primario y domina el comportamiento térmico de las proteínas totales de suero. La γ -lactoglobulina forma 2 tipos de geles: blancos y particulados entre pH 4,00 y 6,00 y geles transparentes de estructura fina, por encima y por debajo de esa región de pH. STANDING y HERMANSON (1990) utilizando medidas viscoelásticas encontraron que es posible diferenciar entre geles particulados blancos (u opacos) y geles de estructura fina ("fine-stranded") transparentes. Las medidas con grandes deformaciones muestran que los geles de estructura fina que se forman a bajo pH son quebradizos, mientras que los geles de estructura fina que se forman a alto pH son elásticos (STANDING Y HERMANSSON, 1991).

La microestructura de geles de proteína de suero lácteo (SL) a diferentes pH es similar a la microestructura de los geles de γ -lactoglobulina (γ -lg) a pH comparables, aunque la región de geles particulados está más expandida para la proteína del suero (LANGTON y HERMANSSON, 1992).

BAEZA y PILOSOFF (2001) estudiaron las propiedades de geles de γ -lactoglobulina en presencia de gomas no gelificantes (PGA, xántica y -carragenina) bajo condiciones de compatibilidad termodinámica limitada y encontraron que estos polisacáridos modifican la cinética de agregación, el tamaño de los agregados de γ -lg y el grado de asociación de las partículas en la estructura.

Aunque los mecanismos de gelificación tanto de γ -lg sola como de la γ -lg con diferentes tipo de polisacáridos han sido objeto de numerosos estudios (FOEDING y col, 1995; BAEZA y PILOSOFF, 2001; BAEZA y col 2003) la comparación de los mecanismos de gelificación de mezclas de suero comercial con polisacáridos continúa teniendo interés para la industria de aditivos alimentarios, ya que diferencias en el comportamiento de estos dos tipo de sistemas proteicos (γ -lg+polisacáridos y SL+polisacáridos) puede inducir a errores en la formulación de los aditivos comerciales. El secado spray de las soluciones mixtas de estos biopolímeros, constituye un proceso fundamental para la obtención de ingredientes estables que puedan ser luego agregados a formulaciones para lograr la funcionalidad requerida. Por lo tanto resulta indispensable el estudio de mezclas cuyo proceso de obtención se asemeje lo más posible al que podría desarrollarse industrialmente.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la temperatura de calentamiento, la concentración de sólidos y el pH sobre las características viscoelásticas y mecánicas de geles formados por proteína de suero lácteo y -carragenina cosecados por spray, y determinar de esta forma las condiciones óptimas de preparación de estos sistemas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima: Se utilizó concentrado de proteína de suero lácteo (SL) provisto por Milkaut (Frank - Santa Fe - Argentina), con 82.38 % proteína (b.s), la -carragenina fue provista por SKW Biosystems- Bs.As. Argentina

METODOLOGÍA

2.1 Preparación del cosecado

Se preparó una mezcla de suero lácteo (SL) y -carragenina (-C) en relación 8/1 en agua destilada a pH 6,5. La mezcla fue secada en secadero Spray Niro Atomizer de escala Planta Piloto. Se obtuvo polvo cosecado con 67.34 % proteína (base tal cual); 8,08 % de humedad y pH 6,5.

2.2 Diseño estadístico

El estudio de las diferentes variables en el rango de interés se realizó mediante un diseño de red de Doehlert para tres factores. Las variables estudiadas fueron el pH, la concentración de sólidos (S) y la temperatura de calentamiento (T). Las variables reales y codificadas y sus niveles se muestran en la Tabla 1.

Se utilizó un modelo polinómico cuadrático para describir las siguientes respuestas: velocidad de gelificación, determinada como la inversa del tiempo de gelificación ($1/t_{gel}$), temperatura de gelificación (TG), velocidad de desarrollo del gel después del punto gel (k), módulo elástico máximo luego del calentamiento (G'_{max}), tangente del ángulo de pérdida ($Tan. \delta$) y dureza (D).

El modelo consta de 10 términos: uno lineal, tres lineales para cada variable y tres cuadráticos y tres términos de interacción entre las variables:

$$1. Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_4 X_1^2 + b_5 X_2^2 + b_6 X_3^2 + b_7 X_1 X_2 + b_8 X_1 X_3 + b_9 X_2 X_3,$$

Donde b_i son los coeficientes de regresión estimados por el modelo. El diseño se analizó utilizando el software Statgrafics Plus 3.1, utilizando las variables significativas ($p < 0.05$ o $p < 0.1$ según el caso).

Estudio de la dinámica de gelificación

Medidas con pequeñas deformaciones

Las medidas oscilatorias dinámicas fueron realizadas en un reómetro de stress controlado Phar Physica (MCR 300), con un sistema de platos paralelos (luz de 1 mm). La temperatura de calentamiento fue controlada con un sistema Peltier (Viscotherm VT", Phar Physica). La frecuencia utilizada fue de 1 Hz y la deformación se mantuvo a 0.01%. Las muestras fueron calentadas desde 20 °C hasta la temperatura final, a una velocidad de 25 °C/min, luego la temperatura se mantuvo constante durante 30 min. y finalmente los geles fueron enfriados a 5 °C, manteniendo esa temperatura durante 5 min.

La temperatura a la cual el módulo de almacenamiento y el de pérdida (G' y G'') se cruzan fue tomada como el punto gel para determinar tiempo y temperatura de gelificación (tgel y TG).

Caracterización del Gel

2.3 Parámetros reológicos

Se determinó el módulo de almacenamiento (G'), el módulo de pérdida (G'') y el ángulo de defasaje ($\tan \delta$) para estudiar las características de la estructura en las diferentes condiciones. Luego del enfriamiento a 5 °C, se evaluó la dependencia de la G' con la frecuencia a 20 °C con una deformación constante de 1% y un rango de frecuencia de (0.01-10 Hz).

2.4 Parámetros texturales

Los geles se formaron calentando las dispersiones del cosecado en tubos de vidrio de (19 mm de diámetro) a temperatura constante en el rango de estudio (75-90 °C) durante 30 min. y luego se almacenaron a 5 °C durante toda la noche.

El análisis del perfil de textura de los geles fue evaluado mediante un test de compresión longitudinal (TPA test), con un equipo TA-XT2i Texture Analyzer. Los geles se comprimieron al 30 % de su altura original a una velocidad de compresión de 0,5 mm/s utilizando una probeta cilíndrica (P/36 R 36 mm de diámetro). Se informó el promedio de dos replicados.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Dinámica de gelificación

Experiencias previas de caracterización del cosecado (datos no publicados) permitieron evaluar la habilidad de las mezclas cosecadas de proteínas de SL y -C de promover la gelificación en comparación con las muestras de SL solo. Se encontró que las mezclas cosecadas (SL+ -C) a 8 y 10 % formaban geles que no se autosoportaban, mientras que a 12 % los geles eran firmes. En cambio el SL no gelificaba a $ST < 9\%$. La presencia de -C promueve la gelificación a menores concentraciones y tiempos, lo cual está relacionado con la existencia de incompatibilidad termodinámica entre la proteína y el polisacárido. Por las razones antes expuestas se seleccionó 12% como la concentración mas baja para realizar estos estudios.

La dinámica de gelificación se evaluó mediante los

siguientes parámetros: $1/t_{gel}$, k y TG.

La secuencia de eventos que ocurre durante la gelificación de proteínas inducida por calor puede ser separada entre aquellos que ocurren en fase fluida y los que ocurren en fase sólida o gelificada. La línea límite entre las reacciones en fase fluida y las reacciones en fase sólida es el punto gel (t_{gel}), momento en el cual el líquido, en el cual se encuentran en desarrollo los agregados, se transforma en un sólido con estructura tridimensional. La estructura primaria del gel como así también su posterior desarrollo ocurre como resultante de reacciones de desnaturalización/agregación. Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, en la Tabla 2 se observa que la variable más importante que afecta la velocidad de formación de la estructura primaria del gel ($1/t_{gel}$) es S, indicada por el alto valor relativo del coeficiente lineal. El valor positivo de los coeficientes lineales y cuadráticos indica que la variación de la velocidad de formación de la estructura primaria del gel aumenta con S en forma no lineal y que existe un valor mínimo. Si bien el aumento de $1/t_{gel}$ con T podría considerarse en cierta forma un efecto esperado en estos sistemas, resulta de interés el valor obtenido para el término de interacción T-S, que indica que un aumento simultáneo en estas variables reduce significativamente la velocidad de gelificación.

La Figura 1 muestra la superficie de respuesta generada para $1/t_{gel}$ a pH constante de 6,5. Se encontró que independientemente de la T, la velocidad de formación de la estructura primaria ($1/t_{gel}$) aumenta con el aumento de S. En esta etapa la concentración es determinante para lograr una velocidad de agregación adecuada. Por otro lado estos resultados coinciden con el hecho que la mayor concentración promueve mayor velocidad de agregación. Todos los geles gelifican en la rampa de calentamiento, por lo que sería lógico suponer que $1/t_{gel}$ no depende de la temperatura de calentamiento final.

La TG se vio afectada principalmente por S, lo que se deduce del alto valor del coeficiente lineal (Tabla 2). Como el coeficiente del término cuadrático de T es significativo ($p < 0.05$) y el coeficiente lineal de T es significativo ($p < 0.1$), ambos términos son retenidos en el modelo, siendo el pH y las interacciones entre todas las variables no significativas. Esto indica que la TG depende fundamentalmente de S. El signo negativo del coeficiente lineal de S indica que a medida que aumenta S la TG disminuye, mientras el signo negativo de los coeficientes de los términos cuadráticos de S y T indica la existencia de un máximo en la temperatura de gelificación.

Dado que el tgel y TG están relacionados (punto gel), también para TG la variable más importante es S por lo que a mayor S disminuye TG, como puede observarse en el gráfico de líneas de contorno a pH 6,5 (Figura 2). Es importante destacar que la TG varió en un amplio rango (50-74 °C) dependiendo de

Tabla 1 Valores reales y codificados (entre paréntesis) de las variables estudiadas.

Variables	Valores reales y (codificados)
T (°C)	75 (-1); 78.75 (-0.5); 82.5 (0); 86.25 (0.5); 90 (1)
S (p/p%)	12 (-0.866); 13.33 (-0.5774); 14.66 (-0.2887); 16 (0); 17.33 (0.2887); 18.66 (0.5774); 20 (0.866)
pH	6 (-0.8165); 6.5 (0); 7 (0.8165)

las condiciones experimentales. A alta S el efecto de T tiene muy poca importancia sobre TG, dado que la alta concentración promueve la formación de los agregados. A baja S, el efecto de la T de calentamiento es más importante. Como se observa en la Fig. 2, al aumentar T la TG disminuye, lo que podría ser debido a un aumento en la velocidad de difusión con una mayor velocidad de calentamiento, posibilitando la formación de agregados de tamaño suficiente para la formación de la matriz gelificada.

La velocidad de desarrollo del gel (k) representa el desarrollo del gel una vez formada la estructura primaria. Como la velocidad de calentamiento durante el proceso de gelificación es muy alta (desde 20 °C hasta la T final 75-90 °C a 25°C/min) la gelificación puede considerarse que ocurre a temperatura constante. La evolución de G' en el tiempo después del punto gel se modeló con la ecuación 2

$$2. G' = G' (1 - e^{-k.t})$$

Donde G' es el valor de G' en el "plateau" luego de un largo tiempo y k se refiere a la velocidad con que se desarrolla la estructura del gel (BAEZA y col, 2003). El ajuste de los datos a la ecuación 2 dio altos valores de coeficientes de regresión (R² > 0.98).

La Tabla 2 muestra que las variables más importantes que afectan k, son T (p<0.05) y S (p<0.1). El pH y las interacciones entre las distintas variables no son significativos. El valor positivo del coeficiente del término lineal de T indica que k aumenta con un aumento en esta variable. Los coeficientes negativos de los términos cuadráticos para S y T indican la existencia de un máximo de k cuando aumenta T y S.

Estos resultados concuerdan con lo observado por FOEGEDING y col. (1995) quienes reportaron que la temperatura y el tiempo de calentamiento tienen un efecto antes y después de la temperatura crítica de gelificación. El tratamiento térmico tiene un efecto sobre la distribución de las proteínas agregadas/desagregadas, por lo cual también se verá afectada la cinética de agregación y de formación de la estructura del gel que modificará la microestructura y las propiedades de los geles.

Para la velocidad de desarrollo del gel (k) se presenta el gráfico de contorno (Figura 3) de k en función de S y T a pH 6.5 constante, ya que nuevamente este factor tuvo la menor incidencia. Se puede observar que al aumentar T aumenta la velocidad de gelificación tanto a baja como a alta concentración.

A menor T (75°C) y mayor S la velocidad tiende a ser muy baja < 0.005. Al aumentar T aumenta k tanto a baja como a alta S. El hecho de que T sea el factor más importante está relacionado con su efecto sobre la difusión de la proteína en la matriz sólida como ha sido reportado por BAEZA y col, 2003. Después del punto gel cuando se entra en la fase sólida de la gelificación, la agregación estaría limitada por la difusión de las partículas dado por la alta viscosidad de la fase continua de la matriz del gel, por lo que al aumentar T aumentaría la fuerza impulsora, y por lo tanto la velocidad de difusión y la de gelificación. Los mayores valores de k se obtienen entre 81 y 88°C y para S entre 13 y 17.4 %.

3.2 Caracterización de los geles

Parámetros reológicos

La viscoelasticidad relativa (Tan δ) no varió

TABLA 2 Coeficientes estimados por la regresión lineal múltiple^a.

Coefficiente	1/tgel	k	TGel	G' max	Dureza
Constante	0.0967	0.061	73.03	50005	44.6
T	(0.0069)	0.0189	-3.175*	10438	22.9
S	0.0179	-0.0076*	-8.018	16933	7.08
pH	(0.0039)	(0.0068)	(-1.67)	3825	4.81*
Cuadráticos					
T ²	(0.0141)	-0.0318	-7.66	4970	24.88
S ²	0.0220	-0.0413	-9.36	23893	41.13
PH ²	(0.0006)	(0.00164)	(-0.82)	(-824.3)	56.75
Interacción					
T . S	(-0.136)	(-0.00946)	(6.93)	17069.9	-92.44
T . pH	(0.0152)	(-0.0214)	(-8.02)	(-2220.5)	-161.36
S . pH	(-0.0015)	(-0.0123)	(0.14)	7924.9	56.48
R ²	0.92	0.90	0.90	0.84	0.86

A significativas (p<0.05), () no significativas.

* significativa p<0.1.

significativamente respecto de los factores estudiados (T, S y pH). Los valores de $Tan \delta$ para los geles oscilaron entre 0,188 y 0,198, indicando que los mismos tienen una alta viscoelasticidad relativa.

Todos los factores, excepto el término cuadrático de pH y la interacción entre T y pH, fueron significativos para G'_{max} (Tabla 2). Los factores más importantes son S y T y en menor medida el pH. Los signos de todos los coeficientes son positivos por lo que cuando aumenta S, T y pH aumenta el carácter sólido del gel. Por otro lado los signos de los coeficientes cuadráticos de S y T son positivos, indicando la existencia de un mínimo de G'_{max} . El término de interacción entre S y T es muy importante, seguido por el de interacción entre S y pH. Ambos términos tienen signo positivo, lo que sugiere una interacción del tipo sinérgica entre estas variables ya que contribuyen a aumentar el carácter sólido (aumenta G'_{max}) del gel.

La Figura 4 muestra la superficie de respuesta de G'_{max} en función de S y T, a pH constante de 6,5.

El carácter sólido de los geles aumenta sinérgicamente con el aumento de la temperatura y concentración de sólidos, como ha sido reportado por BAEZA y col (2003), quienes sugirieron que la formación de partículas a mayores temperaturas involucra reacciones de intercambio entre los grupos tiol expuestos.

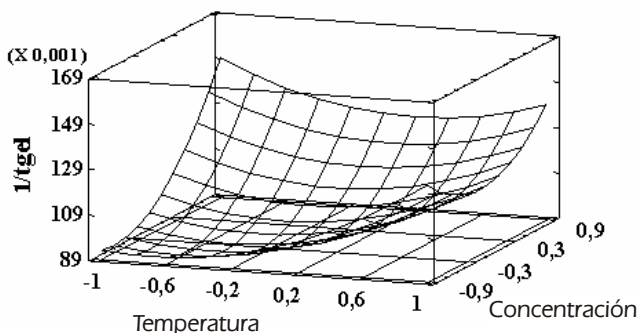


Figura 1 Superficie de respuesta de la velocidad de formación de la estructura primaria (1/tgd) en función de la concentración y la T para pH 6.5.

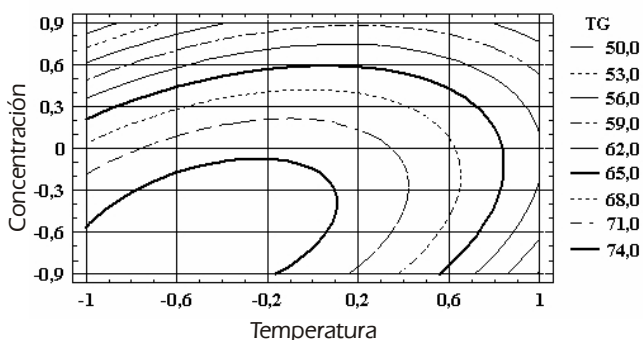


Figura 2 Grafico de contorno de la TG en función de la concentración y la T para pH 6.5.

Por otro lado, a medida que aumenta el pH, los geles alcanzaron un mayor carácter sólido (datos no mostrados). El aumento de G'_{max} sería debido a que a pH 7,00 predominan los enlaces covalentes mientras que a pH 6,00 predominan los agregados físicos que son más débiles.

3.3 Parámetros texturales

Dureza

Los factores más importantes que afectan la dureza de los geles son T y S. Los signos de los coeficientes lineales de T y S positivos indican que cuando estas variables aumentan, aumenta la dureza del gel, coincidentemente con el aumento del carácter sólido del gel (G'_{max}). Todos los términos cuadráticos son significativos lo que indica la existencia de no linealidad.

Los valores grandes y negativos de los términos de interacción entre T y pH y entre T y S sugieren efectos antagónicos entre estas variables, indicando que cuando estas variables aumentan decrece la dureza de los geles, mientras que existiría un efecto sinérgico entre S y pH (signo + del término de interacción). Esto indicaría que a mayor pH y concentración de sólidos mayor dureza de los geles.

Se observó que la mayor dureza de los geles se

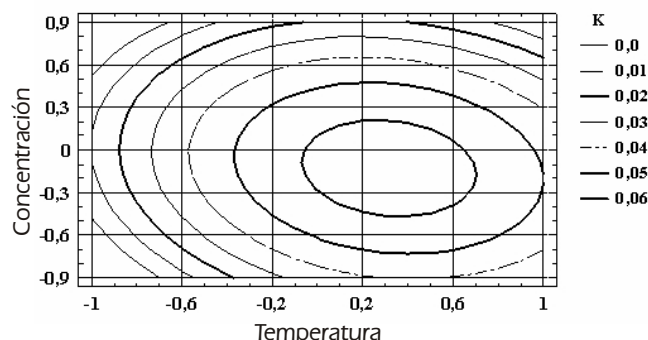


Figura 3 Grafico de contorno de la velocidad de desarrollo del gel (k) en función de la concentración y la T para pH 6.5.

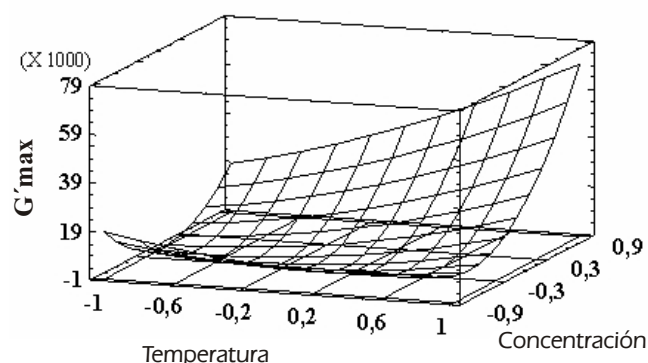


Figura 4 Superficie de respuesta de G'_{max} en función de la concentración y la T para pH 6.5.

obtiene tanto a alta S y baja T como a baja S y alta T, mientras que los geles de menor dureza se obtienen a baja S y baja T o alta S y alta T. Los altos valores de dureza obtenidos para $T > 80$ °C y baja S, podrían ser debido al alto nivel de desnaturalización de las proteínas del suero lácteo ($T = 78,8$ °C) involucradas en la estructura del gel como fue reportado por BAEZA y col. (2003), para geles de -I y de -I+ PGA calentados por encima de la temperatura de desnaturalización de la (-I) ($T > 76$ °C), lo cual contribuía a la formación de enlaces covalentes en la estructura del gel.

4. CONCLUSIONES

Los geles que se obtuvieron en todas las condiciones son geles opacos lo cual indica la formación de geles agregados.

El pH en el rango estudiado (6 a 7) no afecta la dinámica de gelificación mientras que tiene un efecto pequeño en las propiedades de textura de los geles.

La velocidad de formación de la estructura primaria aumenta con S, independientemente de la T, lo cual indica que esta etapa de la gelificación está controlada por la agregación, que es promovida por el polisacárido. Sin embargo el posterior desarrollo del gel hasta formar la estructura final está influido principalmente por la temperatura, que a través del aumento en la difusión de las partículas y en la desnaturalización de la proteína promueve que el gel se forme más rápidamente.

La modificación de estas variables permiten obtener un amplio rango de propiedades texturales de los geles obtenidos con el cosecado de SL-C. Los geles con mayor carácter sólido se consiguen a mayor T, mayor S y mayor pH.

5. REFERENCIAS

BAEZA, R., GUGLIOTTA, L. AND PILOSOFF, A. M. Gelation of β -lactoglobulin in the presence of propylene glycol alginate: Kinetics and gel properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31(2003) 81-93.

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

FOEGEDING E.A., BOWLAND, E.L. AND HARDIN, C. . Factors that determine the fracture properties and microstructure of globular protein gels. *Food Hydrocolloids*. 9(1995) 4 237-249.

STANDING, M AND HERMANSON, A. Viscoelastic behaviour of β -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids* 4 (1990) 2 121-135.

STANDING, M AND HERMANSON, A. Large deformation properties of β -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids* 5 (1991) 4 339-352.

LANGTON, M. AND HERMANSSON A-M. Fine stranded and particulate gels of β -lactoglobulin and whey protein at varying pH. *Food Hydrocolloids* 5 (1992) 6 523-539.

6. AGRADECIMIENTOS

Se agradece los fondos del PROGRAMA CAI+D 2000-2004 UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL, Agencia Nacional de Promoción científica y Tecnológica, Universidad de Buenos Aires y CONICET. Se agradece también al Programa iberoamericano CYTED por su apoyo a través del proyecto XI.17 y A.1.2.