

~ 0 ~



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

**CICATA IPN unidad legaria**

Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada



**Efecto de la adición de transglutaminasa y carragenina en geles lácteos  
inducidos por renina**

**Tesis:**

Para obtener el grado de *Maestría en Tecnología Avanzada*

**Presenta:**

**I.Q. David Álvaro Caro Calderón**

**Directores de Tesis**

*Dra. Ruth Pedroza Islas*

*Dr. Miguel Ángel Aguilar Méndez*

México D.F. a 1<sup>o</sup> de Junio del 2011

~ 1 ~

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a todos aquellos que hicieron posible esta inolvidable experiencia.

# Índice

<b>Introducción</b>	<b>5</b>
<b>Resumen</b>	<b>8</b>
<b>Abstract</b>	<b>10</b>
<b>Justificación</b>	<b>12</b>
<b>Antecedentes</b>	<b>13</b>
<b>1. La leche</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Composición de proteína en la leche</b>	<b>14</b>
<b>1.1.1 Micelas de caseína</b>	<b>15</b>
<b>2. Propiedades de emulsión de las proteínas lácteas</b>	<b>18</b>
<b>3. Métodos clásicos de coagulación</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Acidificación láctica o coagulación acida</b>	<b>20</b>
<b>3.2 Coagulación enzimática</b>	<b>21</b>
<b>3.3 Coagulación inducida por calor</b>	<b>24</b>
<b>4. Influencia del calcio y fosfato en geles lácteos</b>	<b>25</b>
<b>5. Reacciones de entrecruzamiento</b>	<b>29</b>
<b>5.1 Enzimas de entrecruzamiento</b>	<b>31</b>
<b>5.1.1 Transglutaminasa (mTGasa)</b>	<b>31</b>
<b>5.1.1.1 Modificación de proteínas lácteas como sustrato para mTGasa</b>	<b>33</b>
<b>5.1.1.1.1 Modificación mediante calentamiento previo</b>	<b>34</b>
<b>5.1.1.1.2 Modificación mediante el uso de un agente reductor</b>	<b>35</b>
<b>5.1.1.2 Interacción de caseínas en presencia de mTGasa</b>	<b>36</b>
<b>5.1.1.3 Interacción de proteínas solubles lácteas en presencia de mTGasa</b>	<b>37</b>
<b>5.1.1.4 Propiedades de emulsión de las proteínas lácteas entrecruzadas</b>	<b>40</b>
<b>5.1.1.5 Interferencia enzimática entre renina y mTGasa en caseína</b>	<b>40</b>
<b>5.1.1.6 Otras aplicaciones con Transglutaminasa en lácteos</b>	<b>42</b>
<b>6. Gelación de proteínas con hidrocoloides.</b>	<b>43</b>
<b>6.1 Pectina</b>	<b>44</b>
<b>6.1.1 Interacción de caseínas con pectina</b>	<b>45</b>
<b>6.1.2 Interacción de proteína de suero con pectina</b>	<b>45</b>
<b>6.2 Carragenina</b>	<b>46</b>
<b>6.2.1 Kappa carragenina</b>	<b>47</b>
<b>6.2.2 Iota carragenina</b>	<b>48</b>

6.2.3	Lambda carragenina	48
6.2.4	Carragenina y su interacción con caseínas	48
6.2.4.1	La doble red	51
6.2.4.2	Incremento en el diámetro de las micelas de caseína	51
6.2.4.3	Interferencia entre carragenina y renina en caseína	52
6.2.5	Carragenina y su interacción con proteínas solubles lácteas	52
6.3	Grenetina	53
6.3.1	Interacción de grenetina en presencia de transglutaminasa	54
6.3.2	Interacción entre grenetina y proteínas séricas en presencia de mTGasa	54
7.	Objetivos	56
7.1	Objetivo general	56
7.2	Objetivos específicos	56
8.	Materiales y métodos	57
8.1	Materiales	57
8.2	Equipo	57
8.3	Desarrollo experimental	58
8.4	Métodos	61
8.4.1	Porcentaje de proteína en el suero	61
8.4.2	Porcentaje de grasa en el suero	61
8.4.3	Sinéresis	61
8.4.4	Análisis de perfil de textura	62
8.4.5	Gradiente de fuerza	63
8.4.6	Pegajosidad	64
8.4.7	Micro estructura de geles lácteos	65
8.5	Herramientas estadísticas para la evaluación de los métodos	66
8.5.1	Evaluación de variables mediante un diseño de exp. Plackett y Burman	66
8.5.2	Diseño central compuesto y metodología de superficie de respuesta	67
9.	Resultados y discusión	68
9.1	Evaluación mediante un diseño de experimentos Plackett & Burman	68
9.2	Superficies de respuesta mediante un diseño central compuesto $2^3$	70
9.2.1	Porcentaje de proteína en suero	70
9.2.2	Porcentaje de grasa en suero	72
9.2.3	Sinéresis	73
9.2.4	TPA Firmeza	75

9.2.5	TPA Cohesividad	76
9.2.6	TPA Elasticidad	77
9.2.7	TPA Adhesividad	78
9.2.8	TPA Resiliencia	79
9.2.9	TPA Gomosidad	80
9.2.10	Gradiente de Fuerza	81
9.2.11	Pegajosidad	82
9.2.12	Micro estructura	83
<b>Conclusiones</b>		<b>85</b>
<b>Bibliografía</b>		<b>87</b>
<b>Anexo I</b>		<b>91</b>
<b>Anexo II</b>		<b>92</b>
<b>Aceptación por consumidores con muestras aleatorias</b>		<b>96</b>

## Introducción

Una de las reacciones más extensas en las proteínas de la leche es la floculación inducida, ya que a partir de esta reacción se elaboran muy diversos tipos de productos lácteos como el yogurt, el queso, las bebidas lácteas fermentadas y postres lácteos, entre otros. La floculación se refiere al proceso por el cual, finas partículas se agrupan en un floculo para posteriormente pasar a un estado insoluble y coagular (Huppertz y de Kruiff, 2007).

En el caso de las proteínas, la coagulación es el paso siguiente a la floculación, etapa en la que se forma una red tridimensional mediante la interacción de flóculos previamente establecidos. Al transcurrir el tiempo y dependiendo de la concentración de ciertos iones como el calcio, la temperatura y otros factores, es posible incrementar dicha interacción entre partículas de proteínas lácteas, favoreciendo de esta forma la separación de agua y constituyentes solubles por sinéresis, o dicho de otra forma, por la contracción de la red tridimensional de proteína láctea insoluble formada (Solorza y Bell, 1998).

Tanto el método de renina, como el de acidificación láctica son ampliamente utilizados para promover la floculación inducida. Sin embargo, una de sus desventajas es la dificultad de incorporar las proteínas no floculadas de la leche que generalmente corresponden a las proteínas globulares del suero, se pierden sólidos y se genera un líquido de desperdicio rico en una fracción proteínica de alto valor nutritivo ( $\alpha$ -lactalbúminas y  $\beta$ -lactoglobulinas principalmente), constituido como un efluente altamente contaminante.

Existen diversas estrategias propuestas para modificar el comportamiento de las proteínas de la leche, entre los que destacan la utilización de reacciones de entrecruzamiento, así como la interacción con polisacáridos. Las reacciones de entrecruzamiento para la formación de agregados de proteína han sido consideradas como uno de los mecanismos importantes para la modificación de propiedades de textura, viscosidad, solubilidad, emulsión y de gelación. El entrecruzamiento ofrece la oportunidad de crear estructuras de gel en soluciones proteínicas, dispersiones, sistemas coloidales, emulsiones de gotas o burbujas de gas recubiertas de proteína y crear nuevos tipos de alimentos, o cambiar las propiedades de los ya existentes (Gerrard, 2002). Dichos

entrecruzamientos formados a través de enlaces covalentes entre cadenas polipeptídicas, ya sea hacia el interior de las proteínas (entrecruzamiento intramolecular) o entre proteínas (entrecruzamiento intermolecular), dependen de su naturaleza, ya que existen distintos tipos de reacciones de entrecruzamiento con base en el enlace que se establece, como lo son: por puentes disulfuro, los derivados de tirosina, por reacción de Maillard, por acil-transferencia, entre otros (Kuraishi, 1997; Han y Spradlin, 2000; Gerrard, 2002; Siebium y col., 2006; Van Wijk y col., 2006; Corredig 2009; Monogioudi y col., 2009; Jaros y col. 2009).

El uso de enzimas de entrecruzamiento ha sido propuesto para los sistemas lácteos, donde la reacción con acil-transferasa (transglutaminasa) ha sido estudiada. Corredig (2009), de Jong (2003) y Jaros (2009) señalan que este tipo de entrecruzamiento no es óptimo, debido a la presencia de un inhibidor de transglutaminasa en la leche. Un calentamiento previo de la leche (modificación física), así como la presencia de un agente reductor como la glutatona o ditiotreitól (modificación química) favorecen el entrecruzamiento debido al incremento de la accesibilidad hacia el sustrato (Gerrard, 2002; Brown, 2009). Similar al calentamiento previo moderado (Lorenzen y Schlimme, 1998), el agente reductor induce reacciones de intercambio disulfuro-sulfhidrilo, reduciendo el tamaño de los agregados de proteína ligados por puentes disulfuro y desnaturalizando los agregados de  $\kappa$ -caseína presentes en la superficie micelar (Corredig, 2009; Badui, 1999). Esto a su vez genera mayor cantidad de grupos funcionales expuestos, entre ellos, glutaminas y lisinas listas para ser entrecruzadas (Bönisch y col., 2008; Miwa y col., 2004).

A diferencia de las caseínas, las proteínas suero tienen una estructura globular lo que las hace menos susceptibles al entrecruzamiento con transglutaminasa (Garred, 2002). Pero, al ser previamente desnaturalizadas ( $\beta$ -lactoglobulina) o remover el calcio de su estructura ( $\alpha$ -lactalbumina), exponen algunos sitios catalizables por el enzima (Færgemand y Qvist, 1999; Bordignon-Luiz y col., 2008; Corredig y col., 2009; Brown y col., 2009; Jaros y col., 2009; Coussons y col., 1995). De esta forma, la floculación puede también ocurrir en este tipo de proteínas (Badui, 1999; Lorenzen y Schlimme, 1998; Miwa y col., 2004; Bönisch y col., 2008). Recientemente, también se ha confirmado la floculación e incorporación de las proteínas de suero en el coágulo de caseína al utilizar la proteasa aislada del bacillus licheniformis como sustituto de renina (Han y Spradlin, 2001). Esta enzima tiene la capacidad de hidrolizar las proteínas de suero, exponer sus

sitios hidrofóbicos y fomentar su floculación (Marangoni y col. 2000; Han y Spradlin, 2000; Ipsen y Otte 2007).

Otra de las estrategias de modificación en las propiedades de las proteínas lácteas (caseínas y proteínas del suero) es haciéndolas interactuar con polisacáridos. Tanto las proteínas como los polisacáridos contribuyen a las propiedades de textura y estructura de los productos alimenticios. Además, las interacciones entre proteínas y polisacáridos juegan un papel muy importante en las propiedades mecánicas, de estabilidad y de sabor. Estas interacciones influyen también en las propiedades de las proteínas como su solubilidad, actividad superficial, estabilidad conformacional y en la capacidad de formación de geles y espumas (Ye, 2008). Las interacciones proteína-polisacárido pueden subdividirse en dos grupos: formación de complejos e incompatibilidad termodinámica. Dado que las interacciones ocurren en solución, ambos grupos están influenciadas por el pH, la fuerza iónica, la densidad de carga y la concentración de biopolímeros presentes en el sistema (Ye, 2008; de Kruif y Tuinier, 2001). Los polisacáridos cargados negativamente tienen la capacidad de formar complejos con las proteínas cargadas positivamente (Voragen y col., 2009; Ye, 2008). Sin embargo, también es posible ensamblar complejos utilizando algunos hidrocoloides por encima del punto isoeléctrico de las proteínas y regulando la fuerza iónica (Stainsby, 1980; Rocha y col., 2009; Olsen, 1989).

Las interacciones más estudiadas entre proteínas lácteas y polisacáridos se enfocan en carrageninas (Olsen, 1989). Estos polisacáridos aniónicos sulfatados de alto peso molecular, son extraídos del alga roja y su interacción con proteínas es de origen electrostático (Badui, 1999; Langendorff y col., 1999; Weinbreck y col., 2004).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la adición de hidrocoloides durante la coagulación enzimática de un sistema lácteo con o sin entrecruzamiento de proteína y modificando el porcentaje de calcio presente. La metodología de superficie de respuesta fue empleada para evaluar el efecto de las variables independientes sobre las variables de respuesta seleccionadas.



## Resumen

En el presente trabajo, la transglutaminasa es estudiada durante la coagulación enzimática de un sistema lácteo en combinación con los hidrocoloides carragenina, pectina de alto metoxilo y gretetina, modificando el porcentaje de  $\text{CaCl}_2$ . La finalidad es generar una red más compleja durante el proceso de elaboración de geles de proteínas lácteas a base de renina, así como evaluar el porcentaje de proteína y grasa retenidos, el grado de sinéresis, y las propiedades texturales y de micro estructura del gel.

Un primer diseño de experimentos de tipo Plackett & Burman se llevo a cabo para conocer la interacción entre los distintos factores implementados en el sistema lácteo, para posteriormente filtrar las variables que arrojaron una respuesta satisfactoria. Durante esta primera evaluación se encontró que las variables  $\text{CaCl}_2$  y transglutaminasa favorecieron la resistencia a la penetración del gel, mientras que la carragenina disminuyo la pegajosidad del mismo. A demás, la interacción de estos tres factores reveló atenuación sinérgica de los parámetros buscados, por lo que se formulo un nuevo diseño con dichos factores.

Finalmente, un diseño central compuesto  $2^3$  demostró que la retención de seroproteínas y grasa en el gel puede ser afectada positivamente por la adición de carragenina y/o calcio en el sistema, mientras que la incubación con transglutaminasa mostro poca influencia en la retención de dichos parámetros. Por otra parte, la sinéresis incremento al aumentar cualquiera de los factores, sin embargo, en pequeñas dosis se redujo en comparación con el gel control.

La firmeza, cohesividad, gomosidad y resistencia a la penetración del gel fueron favorecidas por el incremento de carragenina y calcio, así como también sucedió sinérgicamente durante la interacción de todos los factores (en su nivel más alto). Por el contrario, se disminuyeron todos los parámetros abruptamente durante la interacción carragenina-tiempo de incubación (nivel alto) cuando el calcio se encuentra en el nivel bajo.

Por otra parte, la adición de carragenina (>0.037%) o tiempo de incubación (<60min) incrementaron la elasticidad del gel, y su recuperación (resiliencia) después de la deformación sucedió mas rápido con la adición de calcio o carragenina.

Mientras que la adhesividad y pegajosidad disminuyeron por el incremento de calcio, la interacción tiempo de incubación-calcio o la adición de carragenina cuando el calcio es mínimo. En contraste, se observo un incremento con carragenina y calcio cuando el nivel de ambos es alto, y durante la interacción de todos los factores (todos en nivel alto).

Por ultimo, la interacción entre la microestructura homogénea (con carragenina) y la porosa (con transglutaminasa) dieron como resultado una textura con mayor similitud al gel control.

## Abstract

In this paper, transglutaminase enzyme is studied in combination with the hydrocolloids carrageenan, high methoxyl pectin and gelatin during the enzymatic coagulation of a dairy system, changing the percentage of  $\text{CaCl}_2$ . The purpose is to create a more complex network during the manufacture of dairy gels induced by rennin, and to assess the percentage of protein and fat retained, degree of syneresis, and textural and micro structural properties of the gel. An initial Plackett & Burman experimental design was carried out to understand the interaction between factors modifying the dairy system, later; some factors were leaked out in order to use them in a new central composite design. During the initial design, we found that  $\text{CaCl}_2$  and transglutaminase increased the force gradient of dairy gels, while carrageenan decreased the stickiness of them. In addition, the interaction of all the factors showed synergistic attenuation on increasing force gradient as on reducing stickiness.

Finally, a  $2^3$  central composite design showed that retention of serum proteins and fat in dairy gel could be positively affected by addition of carrageenan and / or calcium into the system, whereas incubation of transglutaminase showed no influence on the retention of them. Moreover, syneresis increased while increasing any factor; however, syneresis could be reduced in contrast with control by using small doses of any ingredient.

Firmness, cohesiveness, gumminess and force gradient in dairy gel were favored by increasing carrageenan and calcium, as well as synergistically happened during the interaction of all the factors (in the highest level). By contrast, parameters were decreased sharply during the interaction carrageenan-incubation time (both in high level) when calcium level was low. Moreover, the addition of carrageenan ( $> 0.037\%$ ) or incubation time ( $<60\text{min}$ ) increased the elasticity of the gel, and a faster recovery of the sample after deformation (resilience) occurred by adding calcium or carrageenan.

While adhesiveness and stickiness decreased by increasing calcium, interacting time of incubation with calcium or adding carrageenan to the system while calcium is in the lowest level. In contrast,

we observed an increase in both parameters when carrageenan and calcium were in the highest level, and also during the interaction of all the factors (all high).

Finally, the interaction between homogeneous (with carrageenan) and porous (transglutaminase) microstructure resulted in a similar texture to the control.

## Justificación

Actualmente la población exige productos lácteos que satisfagan un bajo costo con un mayor beneficio, sin perder sus propiedades nutricionales, funcionales y texturales.

El proceso durante la elaboración de geles lácteos a base de renina, es decir, el queso fresco, puede ser modificado de tal forma que cumpla con estos requerimientos del consumidor mediante la formación de geles capaces de incorporar mayor cantidad de proteínas y grasa sin modificar o mejorando la textura del gel, mediante entrecruzamiento de proteínas y el uso de hidrocoloides, reduciendo las pérdidas de compuestos solubles.

A demás, el suero de leche que es un efluente altamente contaminante, contiene proteínas séricas y lactosa, lo que lo convierte en un líquido de alto valor nutricional. Dichas proteínas séricas presentan mayor biodisponibilidad durante su consumo por el hecho de requerir un menor grado de hidrólisis durante su ingesta, ya que su tamaño de partícula es molecular en comparación con las proteínas insolubles macromoleculares que conforman el gel (de hasta 500nm). Es por esto que como parte de la investigación se busca su retención en el gel inducido por renina.

# Antecedentes

## 1. La leche

Tiempo atrás, el hombre ha usado la leche de cabras, ovejas y vacas como alimento, ya que contiene casi todos los nutrientes necesarios para mantener la vida, por lo que es considerada un alimento bien balanceado (Belitz y *col.*, 2009; Fox, 2009). Al día de hoy, el término leche es sinónimo de leche de vaca (Belitz y *col.*, 2009).

La leche es un líquido opaco de color blanco o blanco-amarillento. Su densidad específica en la especie de bovino varía de 1.029 a 1.039 @ 15°C. Su punto de congelación es de -0.53 a -0.55°C. El pH de la leche fresca es de 6.5-6.75. Su índice de refracción es 1.3410-1.3480, y su conductividad específica a 25°C es  $4-5.5 \times 10^{-3} \text{ ohm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Belitz y *col.*, 2009).

Es un fluido secretado por la hembra de la especie de los mamíferos para cubrir el requerimiento nutricional del neonato (Belitz y *col.*, 2009; Fox, 2009). El requerimiento principal es por energía (provisto por lípidos y lactosa, y cuando está en exceso, por proteínas), aminoácidos esenciales y grupos amino para la biosíntesis de aminoácidos no esenciales (provisto por proteínas), ácidos grasos esenciales, vitaminas, elementos inorgánicos y agua. También cumple un número de funciones fisiológicas, las cuales se llevan a cabo principalmente por proteínas y péptidos, incluyendo inmunoglobulinas, enzimas, inhibidores de enzimas, factores de crecimiento, hormonas y agentes antibacteriales. Contiene además micro constituyentes como oligosacáridos, inmunoglobulinas, proteínas enlazadoras de iones metálicos y enzimas que juegan roles de protección durante el desarrollo del neonato (Fox, 2009).

El fluido complejo que constituye la leche contiene muchos cientos de especies moleculares. Sin embargo, su composición predominante es agua, en una proporción que oscila entre 63% y 87% (Belitz y *col.*, 2009). En solución se mantienen conformando al suero de leche: carbohidratos (principalmente lactosa), sales inorgánicas y orgánicas, y numerosos compuestos a nivel de trazas. También contiene partículas coloidales dispersas de tres diferentes tamaños: proteínas de suero disueltas a nivel molecular, caseínas dispersas como largos agregados coloidales de 50-500nm

(micelas) y lípidos emulsificados como largos glóbulos (1-20 $\mu$ m) (Fox, 2009). Cuando la especie es de bovino, el conjunto de proteínas de suero y caseínas ocupan el 3.2% del total de la leche, el 4.6% corresponde a los carbohidratos, 3.9% a los lípidos o grasa, y el 0.7% a las cenizas (Belitz y *col.*, 2009). A demás, las trazas están constituidas por componentes minoritarios, como por ejemplo: minerales, vitaminas, hormonas, enzimas y compuestos misceláneos (Fox, 2009).

A pesar de los porcentajes aproximados, dentro de cada especie, la composición de leche y el perfil de constituyentes varía en dependencia de los requerimientos nutricionales y fisiológicos del neonato, la etapa de lactancia, su alimentación y la salud del animal, así como también por muchos otros factores (Fox, 2009).

## 1.1 Composición de la proteína en la leche

Dentro de esta composición se incluyen la totalidad de sustancias nitrogenadas presentes en la leche. Dado que el 95% de sustancias que componen esta fracción son proteínas, la denominación “proteínas” para toda la fracción constituye solo un pequeño abuso del lenguaje, pero la denominación más adecuada para la misma sería la de materias nitrogenadas (Mestres y *col.*, 2004).

El contenido medio de nitrógeno en las proteínas es de 15.67%. Sin embargo, la concentración de proteína en la leche es de 36 g/L, de la cual 29.5 g/L son caseínas y 6.3 g/L son proteínas solubles del suero, lo que permite la separación de unas y otras. Dentro de las últimas mencionadas, 1.2 g/L pertenecen a la  $\alpha$ -lactalbúmina, 3.2g/L a la  $\beta$ -lactoglobulina, 0.4 g/L a la albúmina de suero, 0.8 g/L a la inmunoglobulina y 1g/L a las proteasa-peptonas (Veisseyre, 1988).

La composición de aminoácidos de dichas proteínas se muestra en la tabla 1 (Swaigood, 1992; Mestres y *col.*, 2004):

Tabla 1. Composición y propiedades de las proteínas lácteas.

Nomenclatura	Amino acido	$\alpha_{s1}$ -caseína	$\alpha_{s2}$ -caseína	$\kappa$ -caseína	$\beta$ -caseína	$\beta$ -lactoglobulina	$\alpha$ -lactalbumina
Asp	Acido Aspártico	7	4	3	4	11	9
Asn	Asparagina	8	14	8	5	5	12
Thr	Treonina	5	15	14	9	8	7
Ser	Serina	8	6	12	11	7	7
Glu	Acido Glutámico	25	24	12	19	16	8
Gln	Glutamina	14	16	14	20	9	5
Pro	Prolina	17	10	20	35	8	2
Gly	Glicina	9	2	2	5	3	6
Ala	Alanina	9	8	15	5	14	3
Cys	Cisteína	0	2	2	0	5	8
Val	Valina	11	14	11	19	10	6
Met	Metionina	5	4	2	6	4	1
Ile	Isoleucina	11	11	13	10	10	8
Leu	Leucina	17	13	8	22	22	13
Tyr	Tirosina	10	12	9	4	4	4
Phe	Fenilalanina	8	6	4	9	4	4
Lys	Lisina	14	24	9	11	15	12
His	Histidina	5	3	3	5	2	3
Arg	Arginina	6	6	5	4	3	1
Carbohidratos presentes		No	No	Galactosa 1%, Galactosamina 1.2%, Acido N-acetilneuraminico 2.4%	No	No	No
Sensibilidad al calcio		++	+++	-	+	-	-
Sensibilidad a la quimosina		+	-	+++	+	-	-

### 1.1.1 Micelas de caseína

Las micelas de caseína, un grupo heterogéneo de proteínas que se caracterizan por precipitar a pH 4.6, son asociaciones coloidales altamente hidratadas con un radio promedio de 100nm, su tamaño tiene una relación en volumen equivalente a 1 glóbulo de grasa por cada 50 micelas de caseína. Cuando el agua es removida de su estructura, la materia seca micelar consiste de 94% proteína y 6% de material inorgánico, mejor conocido como fosfato de calcio micelar. Cada unidad micelar está compuesta por pequeñas submicelas que poseen forma esférica con diámetro medio aproximado entre 15 y 20nm (Corredig, 2009). Además, cada una estas submicelas contiene de 20 a 25 moléculas de caseína. En estas submicelas las moléculas se mantienen unidas mediante enlaces hidrofóbicos (Figura 1). Probablemente la mayoría de las partes hidrofóbicas de las moléculas están encerradas en el centro de las submicelas, mientras muchos de los grupos cargados están en la capa externa mas hidrofílica (Mestres y col., 2004; Walstra, 1999).



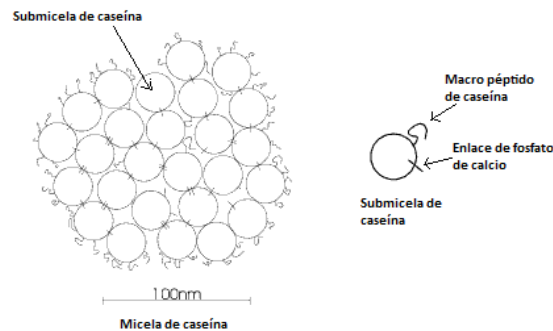


Fig. 1. Modelo de la micela y submicela de caseína propuesto por Schmidt, Payens, Slattery y Walstra (1999).

Las submicelas pueden ser de 4 tipos de proteínas diferentes:  $\alpha_{s1}$ -Caseína,  $\alpha_{s2}$ -Caseína,  $\beta$ -Caseína y  $\kappa$ -Caseína en una relación 4:1:4:1. Una de las características distintivas de las caseínas respecto a las proteínas del suero es que varían en la distribución de carga eléctrica y en la tendencia de agregarse en presencia de iones calcio. En condiciones normales, las submicelas se mantienen incorporadas a la micela principal y su integridad se debe a segmentos de cadenas altamente cargados con residuos de fosfoserina de las caseínas  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  y  $\beta$  que se unen a la cadena -COOH terminal de la  $\kappa$ -caseína mediante puentes generados por calcio molecular y nano agrupaciones amorfas de fosfato de calcio (Mestres y *col.*, 2004).

La superficie micelar consiste predominantemente de  $\kappa$ -caseína, a pesar de que a baja temperatura, cantidades significativas de  $\beta$ -caseína se encuentran en la superficie de la micela, así como también proteínas de suero al desnaturalizarse (Goff y *col.*, 2005). La  $\kappa$ -caseína posee un conjunto de cadenas de tres carbohidratos que constituyen la parte más hidrofílica (glicomacropéptido). Cada cadena es de aproximadamente 5nm, se extienden a partir de la superficie cubriendo una tercera parte de capa externa de la micela. El conjunto de todas ellas se conoce como capa belluda, o mejor dicho, cepillo polielectrolítico por el hecho de comportarse como cadenas flexibles afines al solvente (Corredig, 2009). En la figura 2, es posible apreciar que el cepillo poli electrolítico es el encargado de estabilizar el sistema micelar por repulsión

electrostática y estérica, ya que presenta una fuerte carga negativa que confiere repelencia intermicelar al pH de la leche (6.6-6.7) (Langendorff, 1999).

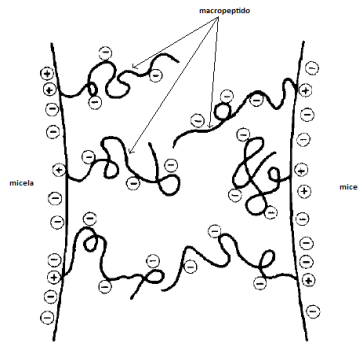


Fig. 2. Repulsión electrostática entre micelas de caseína.

## 2. Propiedades de emulsión de las proteínas lácteas

Para cubrir el requerimiento de energía, la leche posee lípidos y lactosa. Los lípidos son insolubles en agua debido a la tensión superficial que existe entre ambas capas. Sin embargo, los lípidos pueden ser dispersados en agua con una fuerte agitación (homogenización) pero, cuando la agitación cesa, las gotas del lípido comienzan a coalescer rápidamente generando su propio volumen (separación de fase). Para que esto no suceda es necesario reducir el área y tensión superficial al mínimo con ayuda de un agente surfactante, ya sea un emulsificante o detergente. Existen emulsificantes naturales tales como las proteínas, fosfolípidos y mono- y di- glicéridos (Fox, 2009).

En la leche, los lípidos se encuentran dispersos en el suero de leche como glóbulos con diámetro promedio de 3-4 $\mu$ m. Para darnos una idea de cómo sucede, es necesario remitirnos al retículo endoplasmico rugoso de las células epiteliales del mamífero, donde los ácidos grasos y mono glicéridos de los lípidos en la sangre son sintetizados a triglicéridos en forma de glóbulos y posteriormente liberados en el citoplasma celular. Los glóbulos mantienen su estabilidad por la presencia de una compleja membrana conformada por proteínas y fosfolípidos que protege a la leche de la rancidez hidrolítica y de la formación de grasa no globular (Mather, 2000).

Las proteínas nativas desdobladas, como las caseínas, tienen la característica de que su secuencia de aminoácidos, es decir sus residuos hidrofílicos e hidrofóbicos no están distribuidos uniformemente, haciéndolas estructuras distintivamente anfífilas. Esta característica aunada a su estructura flexible abierta les brinda una excelente actividad superficial que facilita la formación de espuma y brinda propiedades emulsificantes por el hecho de adoptar una conformación en la interfase donde los segmentos polares sobresalen hacia la fase acuosa, los segmentos no polares sobresalen en la fase grasa y las neutrales se mantienen en la interfase (Corredig, 2009; Fox, 2009).

Las proteínas globulares del suero tienen una orientación definida en la interfase, donde las regiones apolares predominan en la fase grasa y las regiones polares predominan en la fase acuosa. Un ejemplo es la  $\beta$ -Lactoglobulina, ya que esta proteína es resistente a la proteólisis y su función biológica es enlazar moléculas hidrofóbicas como el retinol (vitamina A) en la concavidad

hidrofóbica de su estructura y transportarlo a través del estomago al intestino delgado (Corredig, 2009; Akerstrom y *col.*, 2000).

Tanto caseínas como proteínas de suero tienen excelentes propiedades emulsificantes (Corredig, 2009), de las cuales cerca del 1% del total de proteínas en leche están presentes en la membrana de los glóbulos de grasa (Fox, 2009).

### **3. Métodos clásicos de coagulación**

Un gel puede ser formado cuando partículas dispersas se agregan lo suficiente como para formar una red continua por todo el líquido en el que están dispersas (Solorza y Bell, 1998). La manufactura de queso puede ser considerado como un proceso de formación de gel, en el que la caseína y grasa de la leche se concentran unas diez veces mediante deshidratación (Lucey y Fox, 1993).

Una característica importante de la caseína es que esta forma micelas en condiciones normales de la leche, y este estado es el empleado para la fabricación de geles lácteos (Han y Spradlin, 2001). Las propiedades de gelación de las micelas de caseína se relacionan con el grado de estabilidad coloidal y la asociación natural de los coloides. Para inducir la gelación, la estabilidad coloidal de las micelas debe ser reducida, permitiendo así su agregación y floculación (Corredig, 2009). Este proceso es eventualmente seguido por una separación de fase, en donde se presenta el coagulo de proteínas en estado semisólido y el líquido de suero que contiene las proteínas séricas (Han y Spradlin, 2001).

La estabilidad coloidal de las micelas de caseína puede ser efectivamente reducida de dos formas o la combinación de ambas. La primera es removiendo el cepillo poli electrolítico por coagulación enzimática y la segunda es mediante el colapso del cepillo por coagulación acida. A demás, cuando el sistema es sometido a una fuente de calor, una combinación de las dos técnicas anteriores, así como el puenteo por enlaces disulfuro favorecen la coagulación (Corredig, 2009; Gerrard, 2002).

#### **3.1 Acidificación láctica o coagulación ácida**

Para el caso de la gelación acida, la cadena C-terminal de la  $\kappa$ -caseína predominante en el cepillo polielectrolítico, es principalmente soluble y conserva una considerable carga negativa a pH neutro. La carga negativa presente se debe principalmente a residuos de ácido glutámico y a los grupos ácido N-acetilneuraminicos de la fracción de  $\kappa$ -caseína glicosilada. Cuando el pH disminuye en el sistema por la transformación de lactosa a ácido láctico o por la hidrólisis con glucon- $\delta$ -lactona, los grupos carboxilo de los residuos de ácido glutámico se protonan gradualmente y su carga neta es reducida (Eck, 1990). La carga neta residual es insuficiente para mantener la

solvatación del cepillo polielectrolítico provocando su colapso y subsecuentemente la precipitación de micelas de caseína por la modificación en su dispersabilidad (Corredig, 2009).

Al llevar a cabo una coagulación ácida, se deben considerar los siguientes factores durante el proceso:

- **pH**

A un pH de 5.2 y 20°C comienza la desestabilización de caseína y por consiguiente la floculación. Al seguir disminuyendo el pH hasta 4.6, los residuos ácidos de N-acetilneuraminico se protonan por completo (Corredig, 2009), será entonces alcanzado el punto isoelectrico de la caseína, contribuyendo a una desmineralización total de ellas cuando el calcio micelar se mantiene en estado disuelto (Veisseyre, 1988).

- **Temperatura**

A pesar de que a pH 4.6 se encuentra el punto isoelectrico de la proteína, a temperaturas por debajo de 5°C no existe floculación de las micelas porque al disminuir la temperatura disminuye la entalpia del sistema y no se promueven las interacciones hidrofóbicas entre sus componentes (Kelvin y col, 2009). Por lo que ventajosamente, es posible acidificar la preparación láctica a esta temperatura para posteriormente calentarla rápidamente por encima de 20°C para desestabilizar de inmediato las micelas y formar el gel (Veisseyre, 1988).

- **Acidificación**

La acidificación láctica se lleva a cabo con la incubación de bacterias ácido lácticas en leche previamente pasteurizada, que conducen a la formación de un gel liso, homogéneo, firme, friable, poroso y poco contráctil, con la capacidad de retener agua por la elevada hidratación de las pequeñas partículas dispersas de caseína desmineralizada. Además, la friabilidad se opone al trabajo mecánico intenso (Veisseyre, 1988).

## **3.2 Coagulación Enzimática**

Para este tipo de coagulación que es el enfoque de este trabajo, la mezcla láctica debe tener una temperatura entre 35 y 45°C y coagular en un pH neutro o ligeramente alcalino añadiéndole renina (Eck, 1990). La renina es una enzima proveniente del jugo gástrico de los terneros de 2 a 3

semanas de edad que hayan recibido una alimentación exclusivamente láctea (Veisseyre, 1988). Su función es iniciar la digestión de la leche para proveer a los mamíferos jóvenes de los nutrientes contenidos en ella.

En la producción de geles lácteos, la renina, llamada también quimosina, es una enzima de la familia de las proteasas mejor conocidas como aspartil endopeptidasas (Han y Spradlin, 2001). A nivel molecular, hidroliza el enlace Phe105-Met106 de la  $\kappa$ -caseína. Como resultado, la cadena polipeptídica C-terminal que consta de los residuos 106 al 169, mejor conocido como caseino-macropeptido soluble es liberada en el suero de la leche. El otro residuo N-terminal de la  $\kappa$ -caseína, llamado para- $\kappa$ -caseína, se mantiene adjunto a la micela. Cuando cantidad suficiente de  $\kappa$ -caseína ha sido hidrolizada (>90%), la  $\kappa$ -caseína residual es incapaz de estabilizar las micelas y por lo tanto comienza la floculación (Corredig, 2009; Lucey y Fox, 1993). Posteriormente, los floculos de caseína se agregan formando fibras de 1 a 4 unidades micelares de espesor y aproximadamente 10 unidades micelares de largo alternadas con nodos más gruesos del mismo material y con aberturas por arriba de 10 $\mu$ m de diámetro. Los glóbulos de grasa son atrapados en estas aberturas, y aunque la cantidad de grasa presente sea mínima, el volumen ocupado por las aberturas en la red no disminuye (Solorza y Bell, 1998), constituyendo finalmente una red tridimensional cuya estructura se elabora progresivamente. Además de la materia grasa, esta red retiene en su interior el lacto suero y su rigidez dependerá de la cantidad de fosfato de calcio coloidal presente (Eck, 1990), ya que al parecer los puentes de calcio y fosfato cálcico coloidal se encuentran reforzados con relación a los presentes en el complejo nativo de caseína (Veisseyre, 1988). Finalmente el gel lácteo formado, al ser cortado, induce la sinéresis y la expulsión de suero junto con las proteínas solubles que son insensibles a la acción coagulante de la renina.

Los factores relevantes durante el procesamiento son los mencionados a continuación:

- **Dosis de renina**

La velocidad de coagulación es proporcional a la dosis de renina utilizada, si el volumen de leche está comprendido entre 2,000 y 15,000 veces el del cuajo comercial, el tiempo de coagulación será entre 30 y 40 min (Eck, 1990).

- **Temperatura**

La velocidad máxima de coagulación está entre los 40 y 42°C. Por debajo de 10°C el gel no se forma. Entre 10 y 20 °C la gelificación es muy lenta y a medida que la temperatura aumenta hasta 40 °C, esta se acelera progresivamente. El proceso disminuye ostensiblemente a partir de 50°C, mientras que arriba de 60°C no tiene efecto la renina debido a su inactivación térmica (Eck, 1990). Existen dos fases de acción de la enzima. La primera fase consiste en la formación del casein-macropéptido (CMP) y para-κ-caseína, en esta etapa el proceso no es sensible a la temperatura. La segunda etapa o fase de coagulación es aquella donde es extremadamente sensible a la temperatura bajo la acción de iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Veisseyre, 1988). Una leche que ha sufrido la acción primaria del cuajo a bajas temperaturas (menor a 10°C), coagula instantáneamente cuando se calienta a una temperatura mayor a 20°C (Eck, 1990).

- **pH**

El enzima renina se inactiva en un medio alcalino, mientras que en un rango de pH inferior a 7 la gelificación se acelera gradualmente debido al acercamiento al pH óptimo de la enzima (5.5) y por la reducción de cargas eléctricas en las micelas de caseína, lo que altera su estabilidad. A pH de 6.3 tanto la fase enzimática como la reducción de cargas se desarrollan al mismo tiempo. Cuando el pH es inferior a 6.3 la coagulación se acelera y finaliza antes que la fase enzimática haya concluido (Eck, 1990).

- **Contenido de iones  $\text{Ca}^{2+}$**

Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  son necesarios para la existencia de micelas de caseína, favorecen el endurecimiento de la cuajada, contribuyen al proceso de desuerado y facilitan la retención de grasa en la cuajada. Las micelas de caseína son muy sensibles a los iones  $\text{Ca}^{2+}$  cuando han sido sometidas a la acción coagulante de la renina, ya que los residuos fosfoserina expuestos durante la hidrólisis fijan iones calcio, estableciendo puentes de calcio entre las moléculas de para-κ-caseína (Eck, 1990). Es por esto que las leches pobres en iones  $\text{Ca}^{2+}$  reaccionan lentamente frente al cuajo. Por otra parte, si la leche es previamente tratada con un reactivo que secuestre al calcio como el EDTA, no coagulará.

- **Fosfato cálcico coloidal**



El fosfato cálcico sensibiliza la para- $\kappa$ -caseína y esta a su vez a los iones  $\text{Ca}^{2+}$ . En presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  el tiempo de coagulación disminuye, e incrementa la fuerza del gel a medida que el contenido de fosfato cálcico coloidal aumenta (Eck, 1990). Además el fosfato de calcio coloidal tiene un efecto buffer durante la acidificación del queso y la leche (Lucey y Fox, 1993).

### **3.3 Coagulación inducida por calor**

En el caso de que la gelación se lleve a cabo por la exposición del fluido lácteo al calor por determinado tiempo, el proceso se verá favorecido al incrementar el pH hasta un máximo de 6.7, seguido por un mínimo tiempo de coagulación por calor a pH de 6.9. Es posible que este fenómeno esté relacionado al hecho de que la disociación de  $\kappa$ -caseína inducida por calor ocurre extensivamente solo a valores de pH en la región alcalina del perfil pH-tiempo de coagulación por calor. Se cree también que la influencia del pH en el tiempo de coagulación por calor de la leche concentrada y no concentrada pueda ser por la actividad presente del calcio, la acidificación por calor inducido y la desnaturalización de proteína de suero por su subsecuente asociación con caseínas micelares y no micelares (Corredig, 2009).

## 4. Influencia del calcio y fósforo en geles lácteos

La leche contiene de manera natural calcio y fósforo orgánico, su concentración en 100g de leche es de aproximadamente 117 y 203 mg respectivamente, de los cuales, aproximadamente el 68% y el 47% no están en dilución a pH 6.6 y se encuentran como fósforo de calcio coloidal (Lucey y Fox, 1993). Joshi y col. (2003 y 2004) afirman que el estado insoluble del calcio, como fósforo de calcio (Fig. 3), es necesario para mantener enlazadas a las caseínas, y parecería incierto pero su presencia tiene mayor relevancia en la manufactura y propiedades funcionales que en la fortificación de la leche.

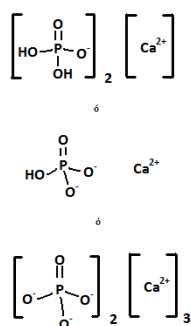


Fig. 3. Distintas especies de fósforo de calcio en su conformación insoluble.

Durante la coagulación de un gel lácteo, las propiedades funcionales que denotan los parámetros reológicos durante la transición de un fluido a un gel, como los son el módulo de fuerza  $G'$  y el módulo de viscosidad  $G''$  incrementan con el tiempo, alcanzando valores constantes después de algunas horas en función de la concentración de renina, el pH, la adición de calcio y el carácter de las interacciones entre caseínas (Solorza y Bell, 1998). Para entender cómo es que el calcio modifica dichos parámetros reológicos, es necesario entender primero que durante la coagulación de la leche con renina, existen tres etapas en el proceso que pueden dividirse en etapa primaria (hidrólisis enzimática), secundaria (agregación) y posiblemente terciaria (sinéresis y re-arreglo estructural) (Lucey y Fox, 1993; Eck, 1990; Veisseyre, 1988).

Durante la etapa primaria, la  $\kappa$ -caseína es hidrolizada en presencia de renina (quimosina 3.4.23.4, o sustituto de quimosina). Como resultado de esta hidrólisis (reacción independiente de calcio) se reduce tanto el potencial zeta como la carga superficial en las micelas de caseína. La para- $\kappa$ -

caseína es uno de los productos de la hidrólisis fuertemente hidrofóbico que se mantiene adjunto a la micela (Lucey y Fox, 1993).

En consecuencia, y posteriormente a la hidrolisis (etapa secundaria), se reduce la repulsión estérica y predominan las fuerzas hidrofóbicas entre moléculas de para- $\kappa$ -caseína. Esta interacción que fomenta la agregación de las micelas, se ve favorecida por la presencia de calcio o fosfato de calcio coloidal ya que ayudan a incrementar la reducción del potencial zeta de para- $\kappa$ -caseína a residuos de fosfoserina cargados negativamente, o a grupos ácidos carboxílicos de  $\alpha$  y  $\beta$  caseína (Lucey y Fox, 1993).

Durante la etapa terciaria, en la que se forma una red tridimensional, los glóbulos de grasa que llenan los espacios entre la red proteínica hacen que la interacción proteína-proteína dentro de la matriz sea reducida. Sin embargo, el conjunto de fibras conformado por micelas de caseína es estabilizado por las débiles interacciones hidrofóbicas no covalentes que son gobernadas por la entropía del sistema. Al incrementar tanto la temperatura como la concentración de calcio es posible favorecer e incrementar las interacciones hidrofóbicas mediante el abastecimiento de enlaces dentro y fuera de las micelas de caseína. Esto ayuda a disminuir la entropía del sistema, incrementar el grado de sinéresis en el gel y definir la reestructuración final de la red (Lucey y Fox, 1993; Joshi y *col.*, 2004; Joshi y *col.*, 2003).

Por una parte, el fosfato orgánico se encuentra ligado de forma covalente a las cadenas peptídicas en las caseínas como residuos de fosfoserina. Y por otra parte, el calcio funciona como puente iónico para enlazar los residuos fosfoserina cargados negativamente en las submicelas de caseína. (Lucey y Fox, 1993; Joshi y *col.*, 2004). La adición de  $\text{Ca}^{2+}$  por encima de 10mM incrementa el grado de firmeza, reduce el tiempo de coagulación y mejora la retención de grasa. A demás, se incrementa la interacción entre residuos de caseínas causando micro agregación y micro sinéresis dentro de la matriz proteínica. Sin embargo, la adición elevada de calcio (>100mM) reduce el grado de firmeza por la excesiva formación de enlaces calcio que interfiere con la formación adecuada del gel (Lucey y Fox, 1993; Joshi y *col.*, 2004; Solorza y Bell, 1998).

Por el contrario, cuando se reduce el contenido de calcio, la matriz de para-κ-caseína se mantiene hidratada, se hincha e incrementa el contenido total de humedad en el coagulo. Esto se refleja en un coagulo más suave, homogéneo, con menor firmeza y mayor número de cavidades entre las fibras proteínicas de la red formada. Además, la proteína asociada al bajo nivel relativo de caseína intacta disminuye. Esta reducción de calcio hace que las proteínas mantengan un menor grado de agregación en la matriz y requieran menor energía para romperse durante el calentamiento (Guinee y col., 2002; Joshi y col., 2003; Joshi y col., 2004). Sin embargo, si la concentración de calcio en la leche es demasiado baja, (<0.14mM) se desfavorece por completo la coagulación, inhibiéndola (Solorza y Bell, 1998).

El pH también juega un rol importante en las propiedades funcionales del gel. En la figura 4 y 5, cuando la leche para queso es acidificada, el calcio insoluble se vuelve soluble (Lucey y Fox, 1993; Guinee y col., 2002), el calcio se disocia de la micela de caseína dejando al fosfato en las terminales de caseína. Esta disminución de enlaces calcio en las caseínas afecta negativamente los sitios de enlace hidrofóbicos de las submicelas, dando como resultado un debilitamiento de la fuerza de enlace entre ellas. Por lo tanto, la dura y fuerte estructura tridimensional de la cuajada adquiere una suave y estirable textura de queso (Joshi y col., 2004).

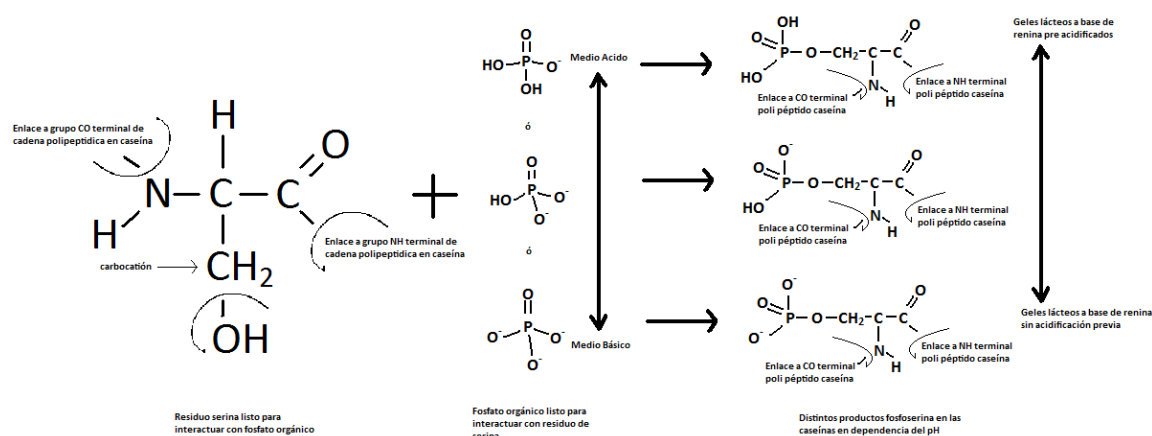


Fig. 4. Mecanismo de reacción propuesto por el autor de la tesis para la conversión de residuos serina de las caseínas a fosfoserina, en función del pH.

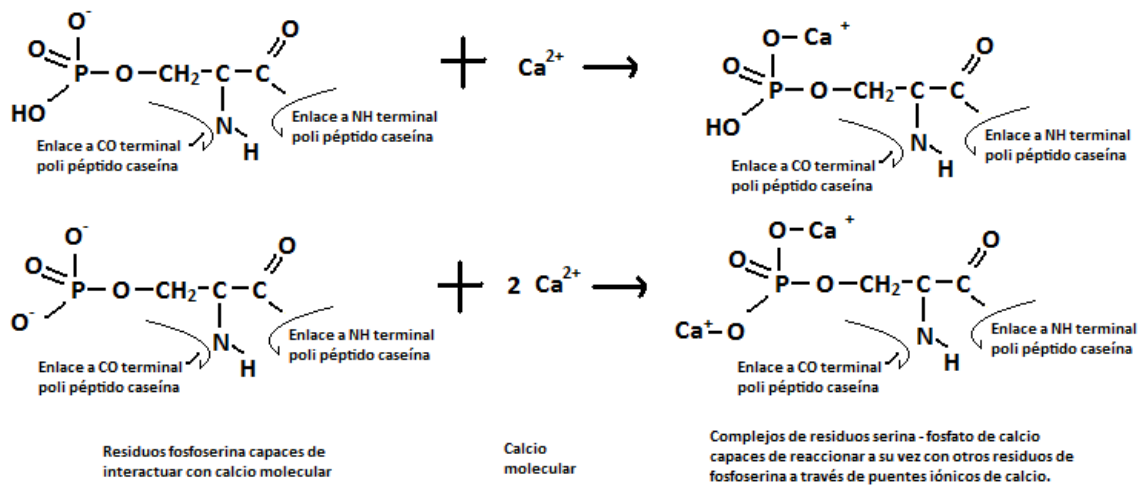


Fig. 5. Interacción entre residuos fosfoserina de las caseínas mediante puentes iónicos de calcio molecular, mecanismo propuesto por el autor de la tesis.

En general, las cuajadas con pH bajo tienden a ser desmoronables y de textura fracturable. Mientras que cuajadas con pH alto tienden a ser más elásticas, gomosas y firmes. Estas últimas mantienen el tamaño submicelar similar al contenido en la leche (15nm de diámetro) debido a que mantienen el fosfato de calcio coloidal en forma insoluble y sufren una menor desmineralización. Pero los quesos que se fabrican a partir de leche preacidificada sufren una desmineralización por la solvatación del fosfato de calcio coloidal que puede apreciarse en la disminución del diámetro de sus submicelas y una menor organización de la red formada, durante el proceso las submicelas originales pierden por completo su identidad (Lucey y Fox, 1993).

## 5. Reacciones de entrecruzamiento

Las proteínas entrecruzadas son aquellas que se forman a través de enlaces covalentes entre cadenas polipeptídicas, ya sea dentro de una misma proteína (entrecruzamiento intramolecular) o entre dos o más proteínas (entrecruzamiento intermolecular). Los entrecruzamientos y agregados de proteínas han sido utilizados en el área alimentaria como uno de los mecanismos más importantes para obtener estructuras con propiedades mecánicas deseables, incluyendo textura, viscosidad, solubilidad, emulsificación y propiedades de gelificación. Muchas texturas alimenticias tradicionales son derivadas de los geles de proteína, incluyendo el yogur, el queso, el tofu y el surimi. El entrecruzamiento ofrece la oportunidad de crear estructuras de gel en soluciones proteínicas, dispersiones, sistemas coloidales, emulsiones de gotas recubiertas de proteína o burbujas de gas recubiertas de proteína y crear nuevos tipos de alimentos o cambiar las propiedades de los tradicionales (Gerrard 2002).

Existen diferentes tipos de reacciones de entrecruzamiento, algunas de ellas pueden encontrarse en la figura 6 y se mencionan a continuación:

- **Entrecruzamiento mediante enlaces disulfuro.** Son interacciones formadas por el acoplamiento de dos residuos de cisteína en un sistema proteínico, en donde un oxidante adecuado acepta el átomo de hidrógeno de un grupo tiol del residuo de cisteína, produciendo un entrecruzamiento de disulfuro. Un ejemplo de esto ocurre al dar un tratamiento térmico a la leche, ya que se promueve la interacción controlada de la  $\beta$ -Lg desnaturalizada con  $\kappa$ -caseína a través de la formación de enlaces disulfuro, incrementando la estabilidad de la leche y previniendo la precipitación de la  $\beta$ -Lg (Gerrard 2002).
- **Entrecruzamientos derivados de la tirosina.** Éstos son formados indirectamente por el tratamiento de proteínas con peróxido de hidrógeno o peroxidasa. La polifenol oxidasa, así como la tirosinasa pueden también permitir entrecruzamiento de las proteínas, así como reacciones de cisteína, tirosina o lisina con intermediarios reactivos de la benzoquinona generados de la oxidación de substratos fenólicos (Gerrard 2002).

- **Entrecruzamientos derivados de la reacción de Maillard.** La reacción de Maillard es una compleja cascada de reacciones químicas iniciada por la simple reacción de condensación entre un aldehído de un azúcar reductor y el grupo amino de una lisina, los carbohidratos oxidados con dos o más aldehídos pueden de igual manera reaccionar con lisina (Gerrard, 2002; Van Wijk y col., 2006). Por ejemplo, los aldehídos glutaraldehído y formaldehído entrecruzan proteínas de una forma rápida y a bajo costo mediante la reacción de Maillard, pero regularmente no son para uso alimenticio (Van Wijk y col., 2006). Sin embargo, los aldehídos obtenidos por oxidación enzimática pueden usarse como intermediarios en una subsecuente reacción enzimática revisar: en cascada de aldol con utilización en el área alimenticia (Siebum y col., 2006).
- **Entrecruzamiento formado por catálisis con transglutaminasa.** La transglutaminasa cataliza la reacción de acil-transferencia entre el grupo  $\gamma$ -carboxamida de un péptido y aminas primarias incluyendo el grupo  $\epsilon$ -amino de residuos de lisina. En ausencia de aminas primarias, el agua puede actuar como un acil aceptor, conllevando a la desamidación de los residuos de glutamina bajo la formación de ácido glutámico y amonía. La formación de este tipo de entrecruzamiento no reduce la calidad nutricional del alimento mientras los residuos de lisina permanezcan disponibles para la digestión (Gerrard 2002).

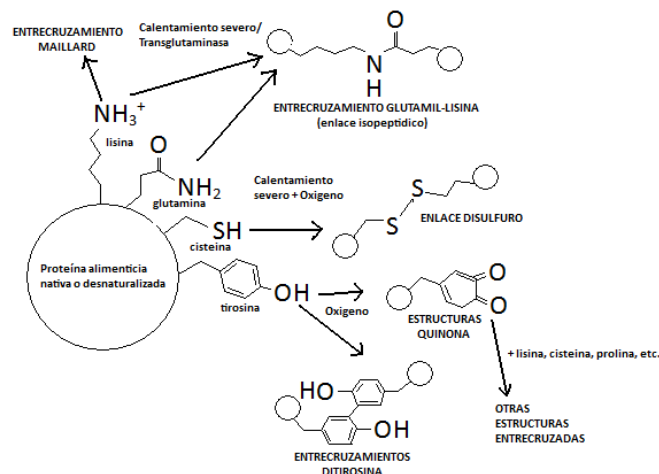


Fig. 6. Reacciones de entrecruzamiento que pueden suceder durante el procesamiento del alimento (Feeney & Whitaker, 1998; Friedman, 1999; Singh, 1991; Gerrard, 2002).

## 5.1 Enzimas de entrecruzamiento

### 5.1.1 Transglutaminasa

En el cuerpo humano, la transglutaminasa dependiente de calcio y mejor conocida como Factor XIII, está involucrada en la coagulación de la sangre y entrecruzamiento de fibrina. La producción de transglutaminasa para alimentos se volvió comercialmente relevante en 1989, después del descubrimiento de la producción de transglutaminasa (EC 2.3.2.13) extracelular de la especie *Streptoverticillium mobaraense* independiente de calcio, llamada transglutaminasa microbiana (mTGasa). Esta transglutaminasa no requiere la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  para su expresión de actividad. Su actividad esta incrementada en 10 veces de forma lineal entre los 5 y los 50°C, con un rápido decrecimiento a temperaturas por arriba de 60°C hasta el punto de inactivación de la enzima a 70°C. El pH óptimo para la transglutaminasa está en el rango de 5 a 8 (Corredig, 2009; Brown y col., 2009).

Su peso molecular es de 40KDa y su masa molar es de 37,869.2 ±8.8Da. Es una enzima monomérica con 331 aminoácidos y 8 β-pliegues rodeados de 11 α-hélices. La enzima adopta una profunda hendidura en un borde con forma de disco, donde un residuo de cisteína (cys<sup>64</sup>, sitio activo) está localizado (figura 7). Su punto isoeléctrico es de 8.9 y es estable a la presión hidrostática sin que su centro activo se desnaturalice. Una variedad de metales pesados como lo son el  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$ , reaccionan con el grupo tiol libre del residuo de cisteína del sitio catalítico de la transglutaminasa, inhibiendo la reacción (Jaros y col., 2009).



~ 32 ~

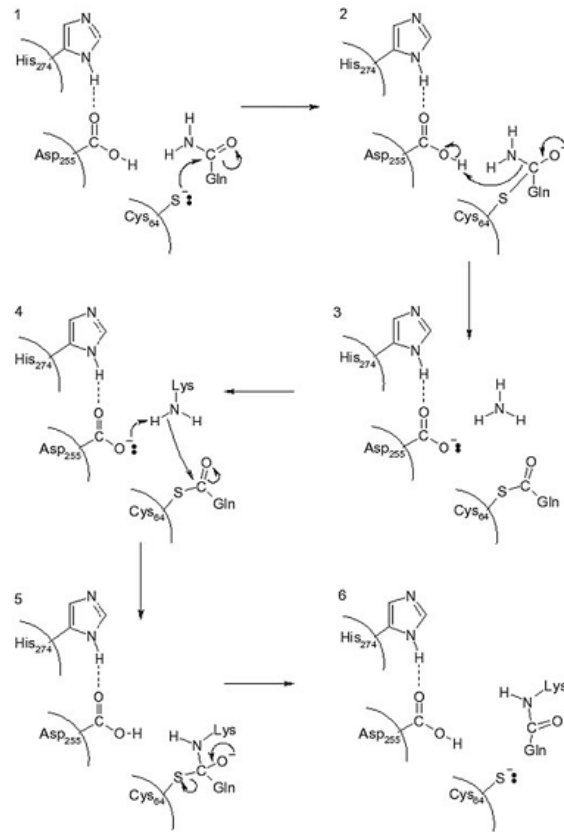


Fig. 7. Mecanismo catalítico de reacción propuesto por Kashiwagi y col. (2002) para transglutaminasa microbiana.

En la figura 8, las reacciones catalizadas por transglutaminasa microbiana son capaces de introducir entrecruzamientos covalentes en sistemas proteínicos por la catalización de reacciones de acil-transferencia entre el grupo  $\gamma$ -carboxiamida del péptido (como acil-donador) y aminas primarias (acil-aceptor) incluyendo los grupos  $\epsilon$ -amina de los residuos lisina. Entonces cuando el grupo  $\epsilon$ -amino del enlace proteínico de lisina reacciona como acil-aceptor, se forman entrecruzamientos intra e inter moleculares, y en la ausencia de aminas libres, el agua es el acil-receptor y los grupos  $\gamma$ -carboxiamida son desamidados a residuos de ácido glutámico (Corredig, 2009; Jaros y col., 2009; Monogioudi y col., 2009).

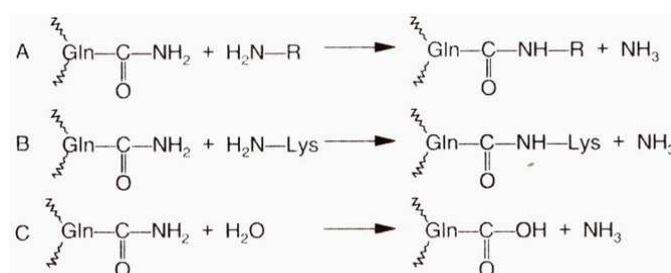


Fig. 8. Reacciones catalizadas por transglutaminasa.

A) Reacción de acil-transferencia, B) Reacción de entrecruzamiento, C) Deamidación.

La enzima ayuda a mejorar eficientemente la firmeza, elasticidad, capacidad de retención de agua y estabilidad térmica de los sistemas proteínicos cuando los residuos de glutamina se encuentran en una región flexible y disponible de la proteína (Gerrard, 2002).

Para el caso específico de la leche cruda obtenida de bovino, cabra, oveja y humano (De Jong y *col.*, 2003), existe un inhibidor de transglutaminasa sensible a la temperatura, con un peso molecular de 200 a 250Da. Al parecer el residuo de cisteína del sitio activo de la enzima está involucrado en el mecanismo de inhibición (De Jong y *col.*, 2003; Jaros y *col.*, 2009). Sin embargo, la desnaturalización de las proteínas por calentamiento previo incrementan su reactividad, así como las modificaciones químicas por el rompimiento de enlaces disulfuro, o por la adsorción en una interface aceite en agua (Gerrard, 2002).

Una vez que las proteínas lácteas han sido previamente desnaturalizadas y entrecruzadas, es posible que no pierdan su valor nutricional, ya que los isopéptidos formados por la catálisis con transglutaminasa son hidrolizados en el riñón, intestino y torrente sanguíneo, para absorberse finalmente como lisina y glutamato (Jaros y *col.*, 2009). Pese a la desnaturalización de las proteínas lácteas, el orden de entrecruzamiento es el siguiente: caseinato de sodio > polvo de leche descremada ultra filtrada > polvo de leche descremada > proteína aislada de suero (Jaros y *col.*, 2009; Bönisch y *col.*, 2008).

#### 5.1.1.1 Modificación de proteínas lácteas como sustrato para transglutaminasa.

La desnaturalización es un proceso en el que se pierde la estructura nativa de las proteínas. En este fenómeno, la proteína sufre la ruptura de las uniones disulfuro que estabilizan su estructura terciaria y difícilmente regresan a su estado natural. En la figura 9 es posible ver que cuando se

lleva a cabo una desnaturalización, la proteína se desdobra o distiende, expone sus grupos hidrófobos internos al exterior y adquiere una conformación al azar que depende de la intensidad del tratamiento que se le aplique, así como de las fuerzas que estabilizan su estructura y la sensibilidad que presenta el polipéptido a los agentes físicos (como el incremento en la temperatura) y químicos (presencia de agentes reductores) (Badui, 1999).

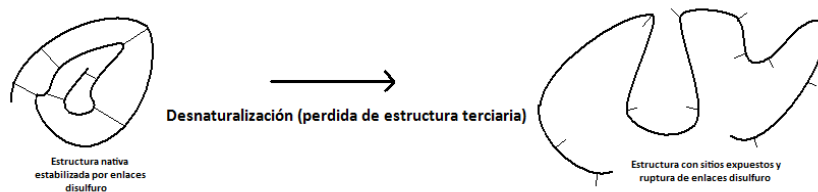


Fig. 9. Desnaturalización de proteína.

El entrecruzamiento inducido por transglutaminasa en proteínas lácteas no es óptimo, esto debido a la presencia potencial de un inhibidor de transglutaminasa en leche. Una solución para esto es la desnaturalización de la estructura nativa de las proteínas mediante calentamiento previo de la leche cruda o la adición de un agente reductor como la glutatona. Cualquiera de los dos métodos ayuda a mejorar el entrecruzamiento por el incremento en la accesibilidad del sustrato. El agente reductor induce reacciones de intercambio sulfhidrido-disulfuro que reduce el tamaño de los agregados de proteína ligados por puentes disulfuro y desnaturaliza los agregados de  $\kappa$ -caseína presentes en la superficie micelar, similar a como sucede durante el precalentamiento de la leche (Corredig, 2009).

#### 5.1.1.1.1 Modificación mediante calentamiento previo

La leche incubada con transglutaminasa para uso final en queso, cambia sus propiedades dependiendo del tratamiento térmico previo que esta reciba. Un tratamiento térmico elevado ( $90^{\circ}\text{C}$ ) inhibe la capacidad de gelación de proteínas con renina, mientras que un precalentamiento menor ( $75^{\circ}\text{C}$ ) favorece un alto grado de entrecruzamiento e incremento en el tiempo de gelación. En caso de incubarse 10min antes de la adición de renina, el tiempo de gelación incrementa a 30min. Si se añade después de la renina, el tiempo de gelación es de 16 min. En el caso de añadirse junto con la renina, el tiempo de coagulación será de 18min. En el caso de que el pH

disminuya de 6.8 a 6.1, disminuirá el tiempo de gelación de 18 a 3min, y en el caso de incrementar el calcio de 0 a 0.05% disminuye el tiempo de gelación de 20 a 4min (Lorenzen y Schlimme, 1998).

#### **5.1.1.1.2 Modificación mediante el uso de un agente reductor**

La reducción de enlaces disulfuro en proteínas globulares antes del tratamiento con mTGasa incrementa el acceso a aminas primarias. Esta reducción de enlaces disulfuro puede llevarse a cabo con ditioneitol (DTT), ya que es uno de los agentes reductores ampliamente usado para romper enlaces disulfuro y funciona eficientemente en muy bajas concentraciones (Brown y *col.*, 2009).

La susceptibilidad de las proteínas en leche cruda hacia la transglutaminasa incrementa en presencia del DTT o algún otro agente reductor, porque además de prevenir la inhibición de transglutaminasa en leche cruda, cumple una función similar al tratamiento térmico (Bönisch y *col.*, 2008). Miwa y *col.* (2004) proponen el uso de glutatona como agente reductor para incrementar la reactividad del sustrato hacia la enzima transglutaminasa por la reducción de enlaces disulfuro en las proteínas séricas, logrando de esta forma disminuir la cantidad de transglutaminasa a utilizar, incrementar el rendimiento y disminuir el tiempo de incubación sin tener cambios en cuanto a sabor y textura se refiere. Para esto, en leche cruda conteniendo entre 8 y 10% de sólidos no grasos, se adiciona glutatona reducida a una concentración entre 0.05 y 0.1mM. Si la concentración del agente reductor es menor, no se tendrá la reactividad suficiente, y si por el contrario se añade mas, se tendrá un efecto adverso en el sabor.

Una vez adicionado el agente reductor, se reducirá la fuerza del gel lácteo inducido por renina al incrementar tanto el tiempo de incubación como las unidades de actividad enzimática de transglutaminasa. Además de incrementar el rendimiento del gel por la retención de humedad y la incorporación de proteínas solubles, el tiempo de coagulación también incrementa porque la transglutaminasa al formar enlaces covalentes, previene la liberación del caseino-macropéptido presente en la  $\kappa$ -caseína durante su hidrólisis con renina (Bönisch y *col.*, 2008). Si el entrecruzamiento en presencia de transglutaminasa es excesivo, se inhibe por completo la fase primaria de coagulación con renina.

### 5.1.1.2 Interacción de caseínas en presencia de transglutaminasa

Las micelas nativas de caseína son asociaciones coloidales con estructura determinada por débiles interacciones entre proteínas e interacciones iónicas entre los residuos de serina fosforilados de las caseínas y las nano-aglomeraciones de fosfato de calcio. La habilidad de las micelas para mantener la integridad de su estructura bajo condiciones desfavorables es mejorada significativamente como resultado del entrecruzamiento inducido por transglutaminasa. Cuando toda la caseína micelar se ha entrecruzado, las micelas se vuelven completamente estables contra la ruptura y comienzan a comportarse como micro y nanopartículas de gel (Corredig, 2009).

La incubación con transglutaminasa no cambia el tamaño micelar de la caseína si esta se encuentra en leche no concentrada, en la figura 10 se indica que el entrecruzamiento es intramicelar y no intermicelar (Jaros y *col.*, 2009). Sin embargo, en la figura 11, cuando la leche concentrada es incubada con transglutaminasa, puede ocurrir gelación, suponiendo entonces que cuando la distancia entre micelas de caseína es suficientemente pequeña, puede llevarse a cabo entrecruzamiento intermicelar (Corredig, 2009).

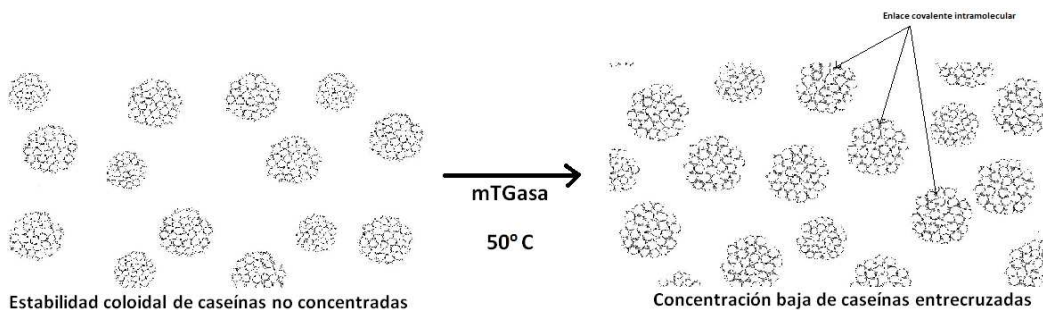


Fig. 10. Entrecruzamiento intramicelar en leche no concentrada.

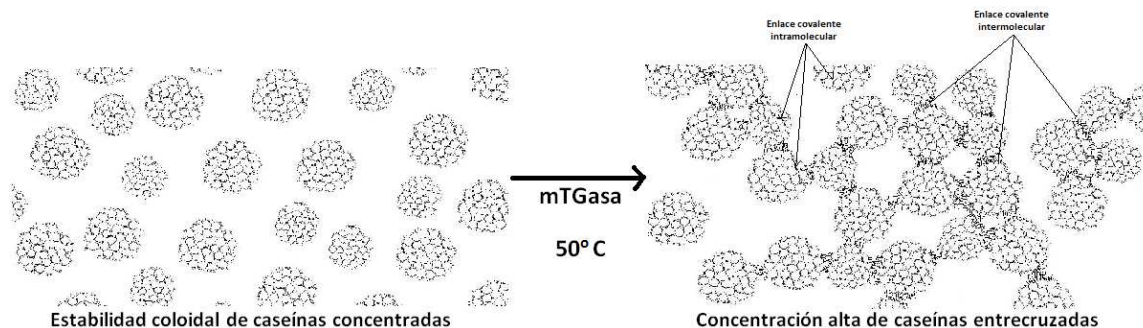


Fig. 11. Entrecruzamiento intra e intermicelar en leche concentrada.

Para el caso de las caseínas, el entrecruzamiento sucede más rápido en caseinato de sodio, el cual tiene un orden de magnitud menor que las micelas de caseína nativa y una accesibilidad mayor por su mayor área superficial. A una temperatura entre 30 y 40°C, y 5.5-6.5 de pH, el orden de entrecruzamiento en caseínas es  $\kappa$ -caseína >  $\beta$ -caseína >  $\alpha_s$ -caseína (Corredig, 2009; Jaros y *col.*, 2009; Bönisch y *col.*, 2008).

El incremento en la fuerza del gel puede apreciarse utilizando > 5U de transglutaminasa por gramo de proteína, pero si se utilizan cantidades muy altas de transglutaminasa se reduce la firmeza. Finalmente la capacidad de retención de agua disminuye al adicionar  $\text{CaCl}_2$ , así como también disminuye la separación de suero y se incrementa la fuerza del gel durante el almacenaje, al igual que al incrementar la concentración de sólidos (Jaros y *col.*, 2009; Bönisch y *col.*, 2008).

### **5.1.1.3 Interacción de proteínas solubles lácteas en presencia de transglutaminasa**

Las reacciones catalizadas por transglutaminasa (EC 2.3.2.13) permiten la formación de polímeros de alto peso molecular debido a los enlaces formados entre las moléculas proteínicas (Bordignon-Luiz y *col.*, 2008). Cuando la leche es incubada con la enzima, las caseínas son rápidamente entrecruzadas, mientras que las proteínas del suero, al no ser un buen sustrato para la transglutaminasa, permanecen sin ser afectadas (Gerrard, 2002), esto debido a que los residuos de glutamina y lisina en las caseínas nativas desdobladas se encuentran accesibles, mientras que en las proteínas globulares, estos residuos se encuentran dirigidos hacia el interior de la estructura proteínica la cual es estabilizada mediante enlaces disulfuro o puentes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Corredig, 2009). Las proteínas que constituyen el suero de leche están constituidas principalmente por  $\alpha$ -lactoalbúmina, que tiene 5 residuos de glutamina y 12 de lisina, y  $\beta$ -lactoglobulina, que tiene 9 residuos de glutamina y 15 de lisina en su cadena proteínica (Bordignon-Luiz y *col.*, 2008).

La susceptibilidad de las proteínas globulares a la transglutaminasa preferentemente se lleva a cabo en presencia de agentes reductores como el DTT o glutatona. Estos agentes químicos provocan la ruptura de los enlaces disulfuro, modificando la estructura terciaria de las proteínas e incrementando el acceso de la enzima a los grupos amino. En este estado, los grupos sulfhidrilo de las proteínas se encuentran en estado reducido y libres para reaccionar (Bordignon-Luiz y *col.*, 2008; Brown y *col.*, 2009). Otros factores que pueden favorecer la actividad de la transglutaminasa

son pH's alcalinos (8.5-9), donde la  $\beta$ -lactoglobulina se encuentra parcialmente desdoblada; y tratamientos térmicos o incrementos en la presión del sistema (Jaros y *col.*, 2009; Corredig, 2009; Coussons y *col.*, 1995). Sin embargo, la  $\beta$ -Lactoglobulina como única proteína en el sistema que actúa como sustrato para la transglutaminasa, forma dímeros homólogos y polímeros, mientras que en la presencia de  $\beta$ -caseína, no es utilizada por la enzima debido a la incompatibilidad termodinámica de la mezcla de estas proteínas en el sitio activo de la enzima (Bordignon-Luiz y *col.*, 2008).

La  $\beta$ -lactoglobulina tiene dos grupos disulfuro situados en la unión entre los residuos cisteína 66–cisteína 160 y entre cisteína 106–cisteína 119, un grupo tiol libre (cisteína 121) y 9 glutaminas, de las cuales 4 no están expuestas, y por lo tanto no son catalizadas por transglutaminasa, 3 están expuestas y las 2 sobrantes no se sabe. Pero al utilizar 1mM de DTT a pH = 7.6 se rompe el enlace disulfuro que une cisteína 66–cisteína 160, exponiendo los residuos de aminoácidos 151 al 162 y dejando los residuos glutamina 155 y glutamina 159 disponibles para reaccionar (Tabla 2; Coussons y *col.*, 1995).

Sin embargo, en el caso de tener calcio presente en el sistema, la reacción de entrecruzamiento es mucho más lenta y se disminuye la formación de enlaces covalentes por la enzima en soluciones de  $\beta$ -lactoglobulina con DTT como agente reductor a pH 7.5. Después de la incubación por algunas horas, incrementa la viscosidad y se forma un gel opaco de color blanco con poca fuerza y con largos agregados microestructurados estabilizados de forma no covalente. Mientras que al incubar una solución similar sin calcio, se incrementa la viscosidad aparente después de algunos minutos, se forma un gel translúcido con microestructura muy fina e incrementa la fuerza de gel (Færgemand y Qvist, 1999).

Tabla 2. Especificidad del sustrato de transglutaminasa microbiana en ausencia o presencia de ditiotreitól.

	<b>sin DTT</b>	<b>con DTT</b>
<b>Caseína</b>	<i>Si</i>	<i>Si</i>
<b>β-Lactoglobulina</b>	<i>No</i>	<i>Si</i>
<b>α-Lactalbumina</b>	<i>Si</i>	<i>Si</i>
<b>Albumina de suero de bovino</b>	<i>No</i>	<i>Si</i>

*Si*: Se lleva a cabo entrecruzamiento

*No*: No se lleva a cabo entrecruzamiento

Por otra parte, para el caso de la α-lactoalbumina, la accesibilidad de la transglutaminasa microbiana a los residuos de lisina y glutamina puede ser de un máximo de cinco lisinas (residuos: 5, 13, 16, 108 y 114) y cinco glutaminas (residuos: 39, 43, 54, 65 y 117), que pueden ser modificadas por la enzima en su forma apo-α-lactoalbumina (se refiere a la estructura de la proteína que no posee calcio), mediante la extracción del Ca<sup>2+</sup> por la acción de agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético, incrementando así su susceptibilidad para con la enzima a 50°C (Corredig, 2009). Mientras que ninguna glutamina y cuatro lisinas (residuos: 13, 16, 108 y 114) están disponibles en su forma holo-α-lactalbumina (se refiere a la estructura de la proteína que tiene sus sitios de enlace al calcio llenos) dependiendo en la temperatura y pH (Bordignon-Luiz y col., 2008; Jaros y col., 2009).

En el caso de tener la combinación de proteínas en aislado de proteína de suero, la gelación puede llevarse a cabo utilizando el acidulante gluconodeltalactona, después de precalentar e incubar el fluido lácteo junto con la transglutaminasa. Posteriormente se induce la gelación con el acidulante (1.85%) a 50°C y se obtiene un gel con alto grado de firmeza G', alta resistencia contra fractura, mayor resistencia a grandes deformaciones e incremento de elasticidad, ya que la enzima confiere enlaces covalentes adicionales que previenen la exposición de residuos hidrofóbicos por bloqueo estérico, creando macromoléculas compactas (Jaros y col., 2009).



#### **5.1.1.4 Propiedades de emulsión de las proteínas lácteas entrecruzadas**

Las proteínas que se encuentran recubriendo la membrana de los glóbulos de grasa presentes en la leche son también susceptibles al entrecruzamiento inducido por transglutaminasa, incrementando la estabilidad de las micelas en emulsión por el entrecruzamiento de las proteínas en su superficie (Corredig, 2009). Pero si el entrecruzamiento se lleva a cabo antes de la homogenización, se afectan las propiedades de emulsificación de las proteínas de leche, esto se debe a que las micelas de caseína entrecruzadas no son capaces de abrirse sobre la interfase aceite-agua como las micelas de caseína nativa. Es por esto que las micelas entrecruzadas posteriormente a la homogenización y emulsificación incrementan considerablemente la estabilidad de los glóbulos de grasa y los hacen menos susceptibles a la coalescencia.

#### **5.1.1.5 Interferencia enzimática entre renina y transglutaminasa en caseínas**

La renina es un complejo enzimático proteolítico que contiene quimosina (E.C. 3.4.23.4) al 80% y pepsina al 20% aproximadamente. Su función es catalizar la hidrólisis específica de la  $\kappa$ -caseína, en específico la escisión del enlace Phe<sup>105</sup> y Met<sup>106</sup>. Durante la acción enzimática primaria, la parte hidrofílica de la  $\kappa$ -caseína (el caseinomacropéptido) que sobresale de la superficie de la micela de caseína, es hidrolizado (figura 12, etapa 2). Entonces, la fuerza de repulsión entre micelas de caseína decrece y sobresalen las interacciones hidrofóbicas. La hidrofobicidad de las micelas de para- $\kappa$ -caseína (componente hidrofóbico de la caseína remanente después de la hidrólisis) resultante permite la agregación (figura 12, etapa 3), y finalmente una red de gel tridimensional es formada por cadenas de micelas floculadas durante la etapa enzimática secundaria (Bönisch y *col.*, 2008).

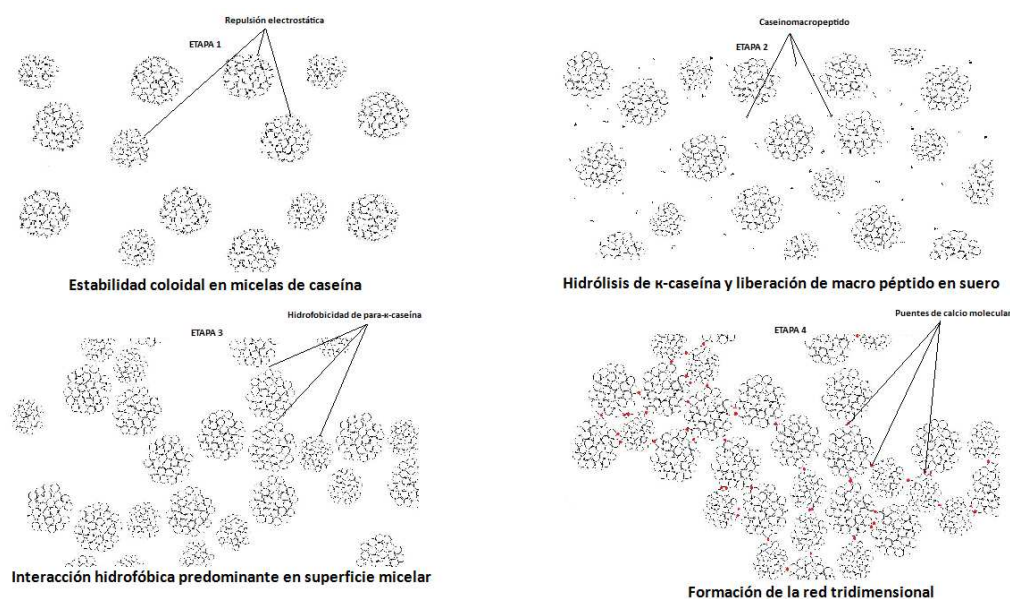


Fig. 12. Coagulación enzimática con renina o sustituto de renina.

La formación del gel de renina puede ser influenciado por varios factores como el pH, la concentración de calcio (figura 12, etapa 4), el tratamiento térmico de la leche y también el entrecruzamiento enzimático de las micelas de caseína utilizando transglutaminasa microbiana (TG; E.C. 2.3.2.13) (Bönisch y *col.*, 2008). Sin embargo, la coagulación enzimática de la leche es obstaculizada por el tratamiento con transglutaminasa.

Tanto el incremento en el tiempo de incubación de leche con transglutaminasa como el aumento en la temperatura de pasteurización del fluido lácteo generan un incremento gradual en el tiempo de coagulación visual, reduciendo el grado de firmeza en el gel. Y si el factor tiempo de incubación o precalentamiento son demasiado elevados no se llevara a cabo la floculación (Fig. 13, etapa 4; Jaros y *col.*, 2009). En el caso del tiempo de incubación, la hidrólisis enzimática de  $\kappa$ -caseína por quimosina es inhibida (figura 13, etapa 2) porque en la  $\kappa$ -caseína existen cuatro residuos de glutamina, incluyendo dos en la parte hidrofílica del caseino macropéptido que son entrecruzados durante un elevado tiempo de incubación (Corredig, 2009). Esto fue demostrado por Bönisch y *col.* (2008) como una menor liberación del caseino-macropéptido hidrofílico al suero al utilizar renina en leche previamente tratada con transglutaminasa.

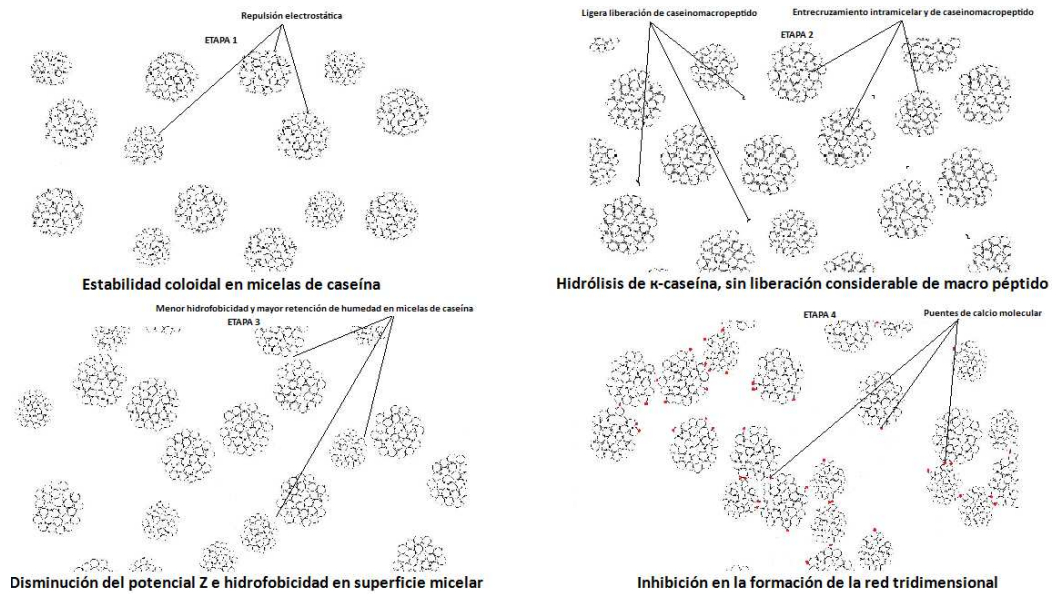


Fig. 13. Efecto enzimático de la renina en leche pre modificada moderadamente con mTgasa.

### 5.1.1.6 Otras aplicaciones con Transglutaminasa en lácteos

Los geles ácidos preparados con fosfocaseínas tratadas con transglutaminasa muestran ser menos susceptibles a sinéresis y cambios de microestructura inducidos por temperatura. En el caso del yogur preparado con leche previamente tratada con transglutaminasa, se logra tener una mayor firmeza del gel, disminuye el grado de sinéresis y se incrementa el tiempo de fermentación (Corredig, 2009; Lorenzen y Schlimme, 1998). Sin embargo, la textura cambia radicalmente por el entrecruzamiento al disminuir el pH.

La transglutaminasa también puede ser utilizada para formar películas y recubrimientos a base de proteínas. El caseinato de sodio por ser un buen sustrato puede usarse como intermediario en la unión de proteínas cárnicas (Lorenzen y Schlimme, 1998).

## 6. Gelación de proteínas con hidrocoloides.

Los polisacáridos cargados negativamente pueden formar complejos con las proteínas cargadas positivamente (regulando el pH), estos complejos tendrán la misma carga que el polisacárido. En el caso de que se incremente la fuerza iónica, el pH para la formación de complejos en solución cambiara a valores menores. Y cuando el complejo alcanza la neutralidad de sus cargas, ocurre una separación de fase por la escasez de repulsión electrostática (Voragen y *col.*, 2009; Ye, 2008). Al disminuir el pH por debajo del punto isoeléctrico de las proteínas ( $\text{pH}_{\beta\text{-Lg}} = 4.8$  y  $\text{pH}_{\text{caseína}} = 4.6$  para el caso de proteínas lácteas), la carga positiva y su interacción con un polisacárido aniónico genera una máxima interacción electrostática. Sin embargo, algunos complejos formados al parecer no tienen relevancia en la formación de geles lácteos, ya que inhiben la agregación y precipitación de proteínas al intentar desnaturalizarlas por tratamiento térmico. Un ejemplo de los polisacáridos que tienen esta cualidad son la carragenina y la pectina, que son adsorbidos en la superficie de las micelas de caseína, protegiéndolas de la interacción entre sí (Ye, 2008).

Otra característica de los polisacáridos es que tienen grupos carboxilo ionizables, como los son los alginatos, la goma arábiga, los pectatos y la carboximetilcelulosa. Tanto los alginatos como los pectatos forman redes enteramente por la unión de iones metálicos divalentes entre las uniones de las cadenas de los polisacáridos (Stainsby, 1980).

Los grupos éster de las pectinas pueden formar entrecruzamiento con moléculas pequeñas, sin éxito de crear geles con proteínas. Mientras que los alginatos no presentan dificultad para formar geles y lo hacen con más facilidad en conjunto con gretina. También, generan reacciones de entrecruzamiento que pueden proceder suavemente cuando soluciones acuosas de los esteres y proteínas son mezclados. Lamentablemente estas reacciones se llevan a cabo a valores de pH por encima de 8, siendo no adecuado para su uso en geles de proteínas lácteas (Stainsby, 1980).

En el caso de los geles lácteos a base de renina, el tiempo de coagulación puede reducirse e incrementar la firmeza de la cuajada con pectina de bajo metoxilo, mientras que la Xantana reduce la firmeza del gel formado (Olsen, 1989). Además, existe sinergia a pH neutro entre las proteínas de suero de leche y varios polisacáridos como la xantana, pectina y carragenina (Stainsby, 1980; Rocha y *col.*, 2009)

## 6.1 Pectina

La pectina es un polisacárido encontrado en la pared celular primaria de las plantas. Comercialmente, la pectina es principalmente producida de frutas cítricas o de la pulpa de la manzana debido a que se encuentra en gran cantidad y además es de alta calidad. Se localiza principalmente en el albedo y la lamela que son la capa blanca de la fruta cítrica.

La pectina es una molécula lineal con regiones  $\alpha$ -1,4 enlazadas a un ácido galacturónico parcialmente esterificado con metanol y regiones que contienen principalmente ramnosa, galactosa, xilosa, arabinosa y ácido galacturónico en una estructura ramificada. La pectina se divide en pectina de alta esterificación y de baja esterificación, definido como la relación de unidades de ácido galacturónico esterificado al total de unidades de ácido galacturónico en la molécula (*Danisco México, 2010*).

Las pectinas con alta esterificación de grupos metoxilo tienen un grado de esterificación por encima del 50%. Son capaces de formar geles en sistemas acuosos con más de 55% de sólidos solubles y en un rango de pH entre 2.8 y 3.5. Es también utilizada para estabilizar proteínas (*Danisco México, 2010*).

Por su parte las pectinas de baja esterificación de grupos metoxilo presentan un grado de esterificación menor al 50%. Se subdivide en pectina de baja esterificación convencional y baja esterificación amidada. Para formar una estructura de gel con la de baja esterificación convencional, no es necesario que el rango de pH este por debajo de 3.5 o que el contenido de sólidos solubles sea alto. Como su nombre lo dice, tiene una pequeña cantidad de grupos metil ester, por lo que sus grupos carboxilo son suficientes para formar entrecruzamiento con calcio molecular, y posteriormente formar la red tridimensional (*Danisco México, 2010*).

La pectina de baja esterificación amidada se forma por la sustitución química de sus grupos metil ester por grupos amida, a través de una reacción con amonio. Esta amidación da como resultado la remoción de un sitio de interacción hidrofóbica y el reemplazamiento con un sitio capaz de formar puentes de hidrogeno, convirtiendo así a la pectina en una molécula mas sensible al calcio (*Danisco México, 2010*).

### **6.1.1 Interacción de caseínas con pectina**

La pectina puede prevenir la agregación de las micelas de caseína en sistemas con pH por debajo de 5.3, en donde el tamaño de las micelas incrementa debido a la adsorción de pectina en la superficie (complejos de naturaleza electrostática), estabilizando a las partículas estéricamente en bebidas lácteas acidificadas. Una vez que la pectina se ha adsorbido, esta puede desorberse nuevamente al incrementar el pH, indicando que el proceso es reversible (Marozienne y de Kruif, 2000).

Por otra parte, en sistemas de pectina/micelas de caseína con pH 6.7, la pectina es incapaz de adsorberse en las micelas de caseína, y a concentraciones cercanas a 0.1% (bajo metoxilo) y 0.2% (alto metoxilo y bajo metoxilo amidada) del hidrocoloide, se produce una separación de fase atribuida a la floculación por agotamiento del volumen ocupado (Marozienne y de Kruif, 2000). Dicha floculación de las micelas de caseína por agotamiento puede apreciarse por un sistema bifásico, en la cual, una pequeña fase del volumen total es abarcada por las moléculas de pectina cuando esta se encuentra a bajas concentraciones. Al incrementar la concentración de pectina, el volumen ocupado y la presión osmótica de la pectina incrementa, induciendo una fuerte floculación de las micelas de caseína en la fase inferior del volumen ocupado (Marozienne y de Kruif, 2000). A pesar de que la adición de calcio puede favorecer su interacción con caseínas a valores más elevados de pH, no es suficiente como para hacer interactuar a las moléculas de pectina en la formación de la estructura tridimensional de gel de caseínas a base de renina.

### **6.1.2 Interacción de proteína de suero con pectina**

Tanto la pectina de bajo metoxilo, como la de alto metoxilo son capaces de formar complejos solubles con la  $\beta$ -Lactoglobulina por encima del punto isoeléctrico de la proteína (rango de pH entre 5.2 y 6.3). Para que esto suceda, es necesario un incremento de la fuerza iónica que apantalle las cargas negativas presentes entre las moléculas de  $\beta$ -Lactoglobulina y pectina. De esta forma, el tamaño de partícula de los complejos solubles comienza a incrementar, aumentando también la turbidez del sistema (Voragen y col., 2009).

En el caso de que la fuerza iónica en el sistema sea pequeña, el pH para la formación de complejos solubles estará en un rango por debajo de 6.3 y hasta antes de acercarse al punto isoeléctrico de la

proteína, por arriba del rango los polímeros serán solubles y por debajo los complejos serán insolubles. Al incrementar la concentración de iones, el rango de pH para la formación de complejos solubles comienza a disminuir junto con el límite inferior del rango, así que se requerirá un menor pH (por debajo del punto isoeléctrico de la proteína cuando la concentración iónica es demasiado elevada) para alcanzar la formación de complejos insolubles (Voragen y *col.*, 2009).

Es entonces probable que al utilizar pectina durante la elaboración de geles inducidos por renina en un rango de pH cercano a 6.7, no se tenga alguna interacción significativa entre la pectina y las proteínas séricas, aun con una mínima concentración de calcio.

## 6.2 Carragenina

Las interacciones más estudiadas entre proteínas lácteas y polisacáridos se enfocan en carragenina (Olsen, 1989). Este polisacárido aniónico sulfatado de alto peso molecular, es extraído del alga roja (rodofíceas) y su interacción con proteínas es de origen electrostático (*Danisco México*, 2010; Langendorff y *col.*, 1999; Weinbreck y *col.*, 2004). Su función biológica en las algas, es pertenecer o ser parte integral de la estructura rígida de sus paredes (Badui, 1999).

La carragenina que es ampliamente usada en la industria alimenticia, interactúa sinérgicamente con proteínas lácteas, principalmente con la superficie de las micelas de caseína ( $\kappa$ -caseína) (Payens, 1971; Goff y *col.*, 2005; Snoeren y *col.*, 1975). Estabiliza productos como emulsiones de grasa de leche, el suero en helados, leches chocolatadas, budines, flanes, jamón cocido, carne de pollo, pasta de dientes, papel fotográfico, productos farmacéuticos y geles aromatizantes en concentraciones muy bajas del polisacárido, debido a su capacidad para incrementar la viscosidad, mejorar la gelación y disminuir la sinéresis (*Danisco México*, 2010; Badui, 1999; Langendorff y *col.*, 1999). A pesar de que puede estabilizar  $\beta$ -caseína y para-caseína (Olsen, 1989), no es capaz de estabilizar caseinato de sodio (Goff y *col.*, 2005), y tiene la desventaja de destruir parcialmente la estructura del gel formado al utilizar una alta concentración de esta (Payens, 1971). En la figura 14 se puede ver que la estabilidad que brinda a las proteínas se debe a que tiene grupos sulfatados ionizados que están orientados hacia el exterior de la molécula, e interaccionan con los grupos cargados de la proteína, ya sea de manera directa o a través de iones divalentes como el calcio (Badui, 1999).

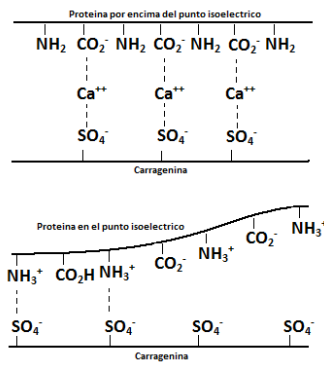


Fig. 14. Reactividad de la carragenina con las proteínas.

A pesar de que existen tres grupos de carragenina (kappa, iota y lambda), comercialmente se tiene una combinación de las tres configuraciones moleculares, generalmente con una de las configuraciones predominando (*Danisco México, 2010*).

### 6.2.1 Kappa carragenina

Esta contiene cerca de 23% de ester sulfato, o sea, un grupo sulfatado por unidad repetitiva del polisacárido (*Weinbreck y col., 2004; Snoeren y col., 1975*). Es soluble únicamente en leche o agua al calentarse a temperaturas por encima de 50°C, donde la κ-carragenina existe en solución como una espiral al azar, presentando una viscosidad baja. Cuando la temperatura es disminuida, el polímero pasa de una transición de espiral a hélice. La formación de la hélice y la agregación con hélices vecinas, facilitan la gelación (*Goff y col., 2005*). La rigidez de dicho gel formado dependerá no solamente de la concentración de iones potasio (*Danisco México, 2010*), sino que también, de la rapidez con la que las transiciones ocurran (*Badui, 1999*). El gel formado, además de ser quebradizo, está sujeto a una sinéresis significativa y no es estable a congelación y descongelación.

Se ha demostrado que este tipo de carragenina tiene la capacidad de estabilizar caseínas α y β contra su precipitación por iones calcio, tal como lo hace la caseína κ de manera natural (*Badui, 1999*). También es utilizada ampliamente para inhibir la separación de fase (*Goff y col., 2005*), y a un pH mayor al punto isoelectrico de la caseína, la red formada entre carragenina y kappa caseína se forma únicamente con un décimo de la concentración normalmente usada en agua (*Danisco México, 2010*).

Por otra parte, los cationes de potasio afectan positivamente la temperatura de gelación e incrementan la temperatura de fusión (*Danisco México, 2010*), mientras que aniones como los



yoduros afectan la gelación por interactuar con la hélice, inhibiendo la agregación entre hélices y subsecuentemente la formación del gel (Goff y col., 2005). Por desgracia una fuente de potasio, como lo es el cloruro de potasio presenta un sabor amargo, lo cual limita su uso práctico para obtener una fuerza de gel óptima. Sin embargo, en alimentos salados como cárnicos, es posible incorporar una mayor concentración de esta sal.

### **6.2.2 Iota carragenina**

Esta configuración que presenta dos grupos sulfatados por unidad repetitiva es únicamente soluble en agua o leche al someterse a pasteurización. Si posteriormente se enfría, pasa de su estado de espiral desordenada a una transición de hélice ordenada, similar a como lo hace la variante  $\kappa$ . Esta temperatura de transición depende del ambiente iónico, donde la formación de las hélices está asociada a la gelación (Weinbreck y col., 2004; Langendorff y col., 1999). La fuerza, elasticidad y coherencia del gel formado, a diferencia de la configuración  $\kappa$ , depende principalmente de la concentración de iones calcio, sin indicios de presentar sinéresis (Danisco México, 2010; Payens, 1971). Un gel iota sirve como un excelente enlazador de agua a bajas concentraciones, y es el único estable a congelación y descongelación. Es decir, mantiene su forma al congelarse y no presenta sinéresis al descongelarse (Danisco México, 2010).

### **6.2.3 Lambda carragenina**

Esta configuración tiene usos limitados por el hecho de presentar tres grupos sulfatados por unidad repetitiva. Es utilizada como espesante por su capacidad para incrementar la viscosidad de ciertos líquidos, sin propiedades para gelificar (Weinbreck y col., 2004; Danisco México, 2010). Es soluble tanto en agua fría como caliente, sin presentar reactividad significativa hacia las proteínas (Payens, 1971), a pesar de que algunos autores aseguran su interacción con micelas de caseína (Goff y col., 2005).

### **6.2.4 Carragenina y su interacción con caseínas**

A pH de 6.7, tanto la  $\kappa$ -caseína como la carragenina están cargadas negativamente, ya que están situadas en la parte alcalina del punto isoeléctrico. Sin embargo, aun así es posible que ambos

compuestos reaccionen formando un complejo electrostático estabilizado después de la pasteurización y durante el enfriamiento del sistema (Olsen, 1989; Snoeren y *col.*, 1975).

Las variantes iota y kappa carragenina presentan un comportamiento hidrofóbico a temperaturas por debajo de 50°C, por lo que el medio de dilución debe ser calentado previamente para evitar agregación local, abrir la estructura y mantener las moléculas en forma de espirales o listones (Snoeren y *col.*, 1975).

Cuando la temperatura está por encima de la transición espiral-hélice (47°C aprox.), existe incompatibilidad entre las micelas de caseína y la carragenina iota o kappa (figura 15 lado izquierdo). La incompatibilidad entre el polisacárido no adsorbente en su conformación de espiral y las micelas de caseína, ocasiona la floculación microscópica de las proteínas insolubles, excluyendo cualquier espiral de carragenina presente, mientras que estas últimas quedan rodeando a los microflóculos (figura 15 y 16 lado izquierdo; Stainsby, 1980; Goff y *col.*, 2005). Dicha floculación de micelas de caseína por carragenina solo ocurre por encima de la concentración crítica de carragenina, la cual depende de la cantidad de micelas de caseína (Langendorff y *col.*, 1999).

En la figura 15 del lado derecho, un vez que la temperatura es disminuida por debajo de la transición espiral-hélice, las espirales (largos y delgados polímeros de 20nm de diámetro) se enredan y ensamblan mediante puentes de calcio o potasio entre los grupos sulfato de ellas, para formar estructuras rígidas con mayor densidad de carga que reaccionan específicamente con  $\kappa$ -caseína en su nueva conformación de hélice (reacción en la que el calcio, potasio y la concentración de proteína parecen estar íntimamente ligados) (*Danisco México*, 2010; Langendorff y *col.*, 1999; Payens, 1971).

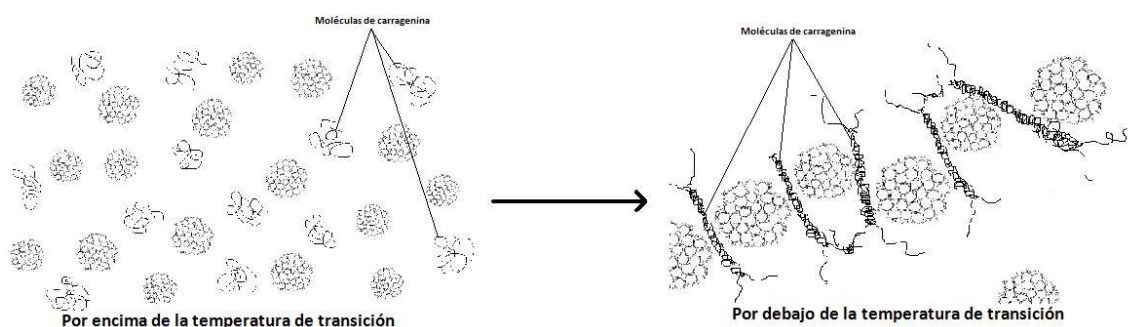


Fig. 15. Interacción caseína/carragenina cuando la concentración de carragenina no es crítica.

Por otra parte, cuando la concentración de carragenina es elevada, parte de la molécula de carragenina es adsorbida en la superficie micelar. La otra parte del polisacárido queda libre en solución, en forma de bucle. Los bucles vecinos que quedaron libres en la solución se asocian para generar una red de carragenina que se forma únicamente en los espacios entre micelas y no a través de todo el volumen del sistema (figura 16 lado derecho). Así, el sistema es estabilizado de la separación de fase y se previene la coalescencia (Stainsby, 1980; Goff y *col.*, 2005).

La interacción entre el polisacárido y la caseína se debe a que, en la  $\kappa$ -caseína los residuos de aminoácidos catiónicos y aniónicos están lo suficientemente separados entre sí, de forma que la molécula es capaz de orientar sus sitios catiónicos hacia los grupos sulfatados aniónicos de la carragenina Iota o Kappa (por debajo de la temperatura de transición), ya que es evidente que en la  $\kappa$ -caseína existe un extenso grupo de aminoácidos cargados positivamente en la región que está entre el residuo de aminoácido 20 y hasta el 115, y más específicamente entre el 97 y 112. Siendo que es una zona escasa en interacción con  $\alpha_{s1}$  y  $\beta$ -caseína, es posible que esta región positiva o parte de ella pueda ser la responsable de la interacción electrostática con carragenina. Esta región cargada positivamente incluso existe a valores de pH por encima del punto isoeléctrico de la proteína (Langendorff y *col.*, 1999; Goff y *col.*, 2005; Snoeren y *col.*, 1975; Stainsby, 1980).

A demás, la interacción entre las hélices de carragenina Iota y las micelas de caseína, y no entre las espirales de carragenina Iota y las micelas de caseína, puede explicarse por la distancia entre cargas de los grupos sulfatados de carragenina, que para la forma de espiral es de 0.5nm, mientras que para las hélices es de 0.2nm, siendo esta última la de mayor densidad de carga. Y el diámetro del parche positivo en la  $\kappa$ -caseína es de alrededor de 1nm. Esto indica a grosso modo que existe

espacio en el parche para dos grupos sulfatados cuando la carragenina iota está en la forma de espiral, pero hay cuatro espacios cuando se encuentra en forma de hélice. Entonces, la interacción atractiva electrostática tendrá el doble de fuerza cuando la carragenina iota se comporta como hélice (Langendorff y col., 1999).

#### 6.2.4.1 La doble red

Para el caso específico de carragenina iota, a concentraciones por debajo de 0.2%, solo una red se forma al enfriar a temperatura de transición (47°C), esto se debe a la interacción carragenina/micela de caseína (figura 15, derecha), y no se funde al incrementar la temperatura a 70°C. Mientras que para concentraciones por encima de 0.2% del polisacárido, se forman dos redes al enfriar. La primera tiene las mismas propiedades que la de baja concentración de carragenina y la segunda tiene un menor punto de fusión (49°C) y es formada por la interacción carragenina/carragenina (figura 16, derecha). A partir de esto se puede concluir que la segunda red formada a baja temperatura para alta concentración de carragenina iota en leche es térmicamente reversible, mientras que la formada a menor concentración de carragenina es mucho más estable térmicamente (Langendorff y col., 1999).

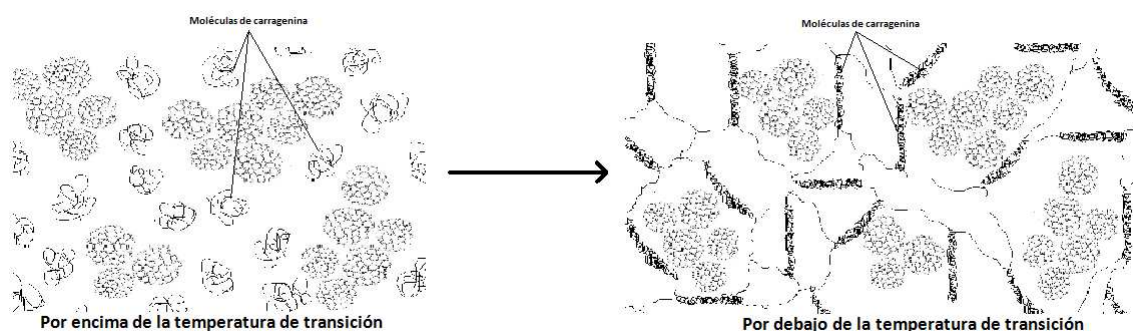


Fig. 16. Interacción caseína/carragenina cuando la concentración de carragenina es crítica.

#### 6.2.4.2 Incremento en el diámetro de las micelas de caseína

El incremento en el diámetro es un indicio de adsorción e interacción molecular. En donde el incremento en densidad de carga (conformación de hélice), es el factor de la interacción, ya que el diámetro de la micela de caseína parece no incrementar en la presencia de Kappa o Iota carragenina a temperaturas elevadas. Una vez enfriado el sistema, si la mezcla se calienta nuevamente a 60°C el tamaño incrementado de la micela se mantiene constante (adsorción

térmicamente irreversible) (Langendorff y col., 1999). Sin embargo, Lambda carragenina que tiene mayor grado de sulfatación y por lo tanto mayor densidad de carga, muestra interaccionar con las micelas de caseína sin importar la temperatura. Al disminuir la temperatura hasta el estado de transición espiral-hélice, el incremento en el diámetro de la micela es mayor con esta que con cualquier otra carragenina. Por último, debe considerarse el hecho de que tanto Kappa como Iota carragenina tienen la habilidad de formar geles como resultado de su agregación helicoidal, mientras  $\lambda$  no puede (Goff y col., 2005).

#### **6.2.4.3 Interferencia entre carragenina y renina en caseína**

La interacción entre carragenina y  $\kappa$ -caseína puede afectar la textura del gel lácteo formado a base de renina (Bullens, 1994). Esto se debe a que la acción proteolítica de la pepsina (compuesto de la renina) puede inhibirse por ciertos polisacáridos sulfatados y esto se ve reflejado en la coagulación retardada de la leche al adicionar  $\kappa$ ,  $i$  o  $\lambda$  carragenina. A pesar de esto, existen ya patentes con el uso de carragenina en queso con la finalidad de incrementar el rendimiento (Olsen, 1989).

#### **6.2.5 Carrageninas y su interacción con proteínas solubles lácteas**

Las interacciones de caseína con carragenina o pectina son muy usadas en el control de la textura y estabilidad de productos lácteos. Sin embargo, hay muy pocos estudios a cerca de la interacción de proteínas de suero y carrageninas.

Es de esperarse que interacciones entre proteínas y polisacáridos se lleven a cabo por debajo del punto isoeléctrico de la proteína, donde la proteína y el polisacárido tienen cargas opuestas. Sin embargo, la formación de complejos solubles puede suceder por encima del punto isoeléctrico de la proteína, donde la carga neta de la proteína es negativa. Este fenómeno puede explicarse por la presencia de parches cargados positivamente que sirven como intermediarios en la superficie de la proteína (Weinbreck y col., 2004).

Weinbreck y colaboradores (2004) han demostrado que en soluciones de proteína de suero y carragenina (46%  $\kappa$ , 24%  $i$ , 9%  $\lambda$  y 21% otros) en una relación 15:1, la turbidez incrementa abruptamente en un pH por encima del punto isoeléctrico y en dependencia de la concentración

de  $\text{CaCl}_2$ . Mientras que en blancos de proteína de suero o de carragenina, se mantienen con baja turbidez, confirmando de esta forma la formación de complejos al mezclarlos.

El calcio juega un rol importante, ya que permite la formación de estos complejos a valores de pH por encima del punto isoeléctrico de las proteínas séricas ( $pI=5.2$ ), hasta un máximo de pH 8 con 140mM de  $\text{CaCl}_2$ . Además, la separación de fase que regularmente sucede al llegar al punto isoeléctrico, también cambia a valores superiores de pH, que siempre son inferiores a los de formación de complejos. Al parecer, los iones de calcio divalentes sirven como puente iónico entre la proteína de suero cargada negativamente y las moléculas de carragenina con carga similar (Weinbreck y *col.*, 2004).

Para entender mejor este fenómeno, es importante mencionar que existe un rango de pH alcalino donde no se forman complejos en lo absoluto, seguido de un rango de pH ligeramente más ácido por encima del punto isoeléctrico entre 5.2 y 5.5 donde se forman los complejos solubles (que serán modificados a valores de pH más altos al adicionar  $\text{CaCl}_2$ ). A pesar de que ambos compuestos presenten cargas negativas, la presencia de dichos parches positivos y las fluctuaciones de carga de la proteína cercanas al punto isoeléctrico, permiten la interacción entre componentes. Si el pH sigue disminuyendo se alcanza el pH de formación de complejos insolubles y ocurre una separación de fase macroscópica cercana al punto isoeléctrico y por debajo de este (Weinbreck y *col.*, 2004).

### **6.3 Grenetina.**

La gelatina o grenetina es una proteína de origen animal que se obtiene a partir del colágeno del tejido conectivo, principalmente de la piel y del hueso de los animales. El lavado de la materia prima se puede efectuar con soluciones ácidas o alcalinas, para después someterla a una cocción en agua a una temperatura menor de  $80^\circ\text{C}$  y a pH ácido o básico. En esta etapa existe una alteración de la triple hélice del colágeno en la que se rompen enlaces intermoleculares e intramoleculares y se producen cadenas menos estructuradas, que corresponden propiamente a la gelatina (Badui, 1999; Dickinson y Babin, 2001). La formación de geles de gelatina se afecta con el pH, la fuerza iónica, la concentración, el punto isoeléctrico de la gelatina, etc. Por su naturaleza química, esta proteína está sujeta a reacciones de deterioro, como la hidrólisis, por acción de

ácidos, enzimas y microorganismos, que pueden destruir la estructura tridimensional que conforma el gel (Badui, 1999).

### **6.3.1 Interacción de grenetina en presencia de transglutaminasa.**

Al incubar la enzima transglutaminasa en una solución con grenetina, existe una degradación de las cadenas que conforman la grenetina, haciéndola menos efectiva para formar entrecruzamiento de triples hélices características de los geles de grenetina. Del mismo modo se pierde la termoreversibilidad que pudiera tener el gel, ya que de manera natural, la grenetina forma un gel reversible mediante la formación de una red de biopolímero entrecruzado mediante puentes de hidrogeno. Sin embargo, el añejamiento a temperatura de refrigeración aumenta la rigidez de la estructura formada (Dickinson y Babin, 2001).

### **6.3.2 Interacción entre grenetina y proteínas séricas en presencia de transglutaminasa.**

Tanto el suero como la grenetina son subproductos proteínicos de la industria agrícola. Por una parte, el suero es abundante, económico y se desperdicia durante la elaboración de queso. Por otra parte, las pieles y huesos de los animales que son el mayor subproducto de la industria cárnica, son ricos en colágeno (estructural del tejido conectivo). A partir de la hidrólisis parcial del colágeno es posible producir grenetina, que es una mezcla polidispersa de fragmentos de colágeno de tamaño variado.

Una variedad de proteínas alimenticias, incluyendo grenetina, caseína y proteínas de suero han sido polimerizadas por la formación de entrecruzamientos intermoleculares mediados por transglutaminasa (Brown, 2009; Færgemand y Qvist, 1999; Bordignon-Luiz y *col.*, 2008; Jaros y *col.*, 2009; Corredig, 2009; Coussons y *col.*, 1995).

La reducción de enlaces disulfuro en las proteínas globulares mediante un agente reductor como el DTT antes del tratamiento con transglutaminasa, muestra incrementar la accesibilidad a grupos amino primarios (Færgemand y *col.*, 1997).

Cuando una pequeña cantidad de gnetina se añade en una solución de aislado de proteína de suero se forma un gel, y si se ha incubado Tgasa en presencia del agente reductor, la fuerza del gel resultante es 90% mayor que los de gnetina sola. El gel formado no se derrite a temperaturas por debajo de 60°C y se confirma el entrecruzamiento de proteínas de suero (Brown, 2009).



## **7. Objetivos**

### **7.1 Objetivo general**

Estudiar el efecto de la adición de hidrocoloides durante la coagulación enzimática de un sistema lácteo con o sin entrecruzamiento de proteína y modificando el porcentaje de calcio.

### **7.2 Objetivos específicos**

- Determinar el efecto de la concentración de calcio, tiempo de incubación con transglutaminasa y contenido de carragenina en los porcentajes de proteína y grasa retenidos en el sistema.
- Estudiar el efecto de la concentración de calcio, tiempo de incubación con transglutaminasa y contenido de carragenina en la sinéresis de geles lácteos
- Evaluar el efecto de la concentración de calcio, tiempo de incubación con transglutaminasa y contenido de carragenina en las propiedades de texturales: firmeza, cohesividad, elasticidad, adhesividad, resiliencia, gomosidad, pegajosidad y gradiente de fuerza, de geles lácteos.
- Estudiar la microestructura mediante microscopía diferencial de barrido de los geles lácteos elaborados.

## **8. Materiales y Métodos.**

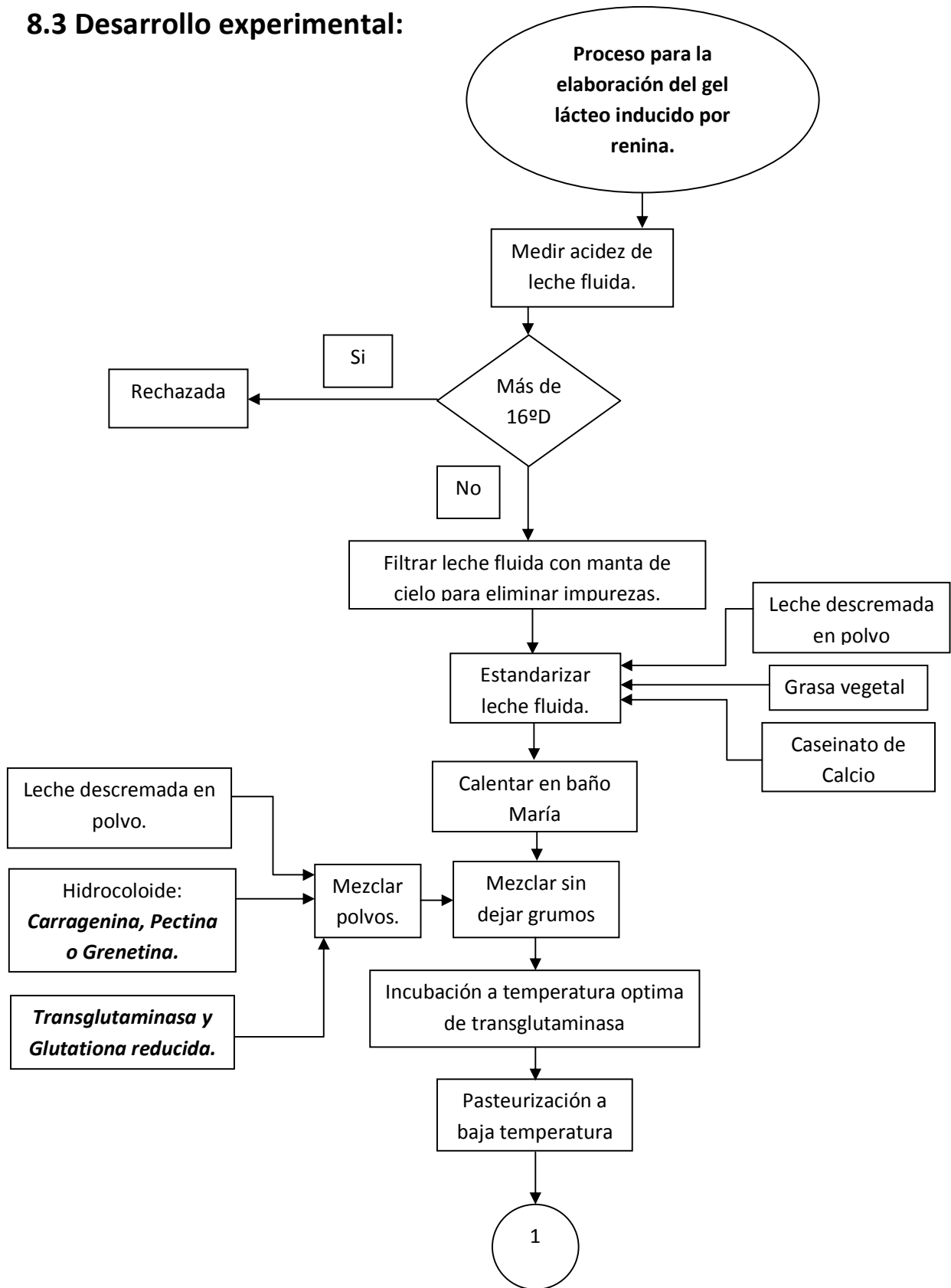
### **8.1 Materiales**

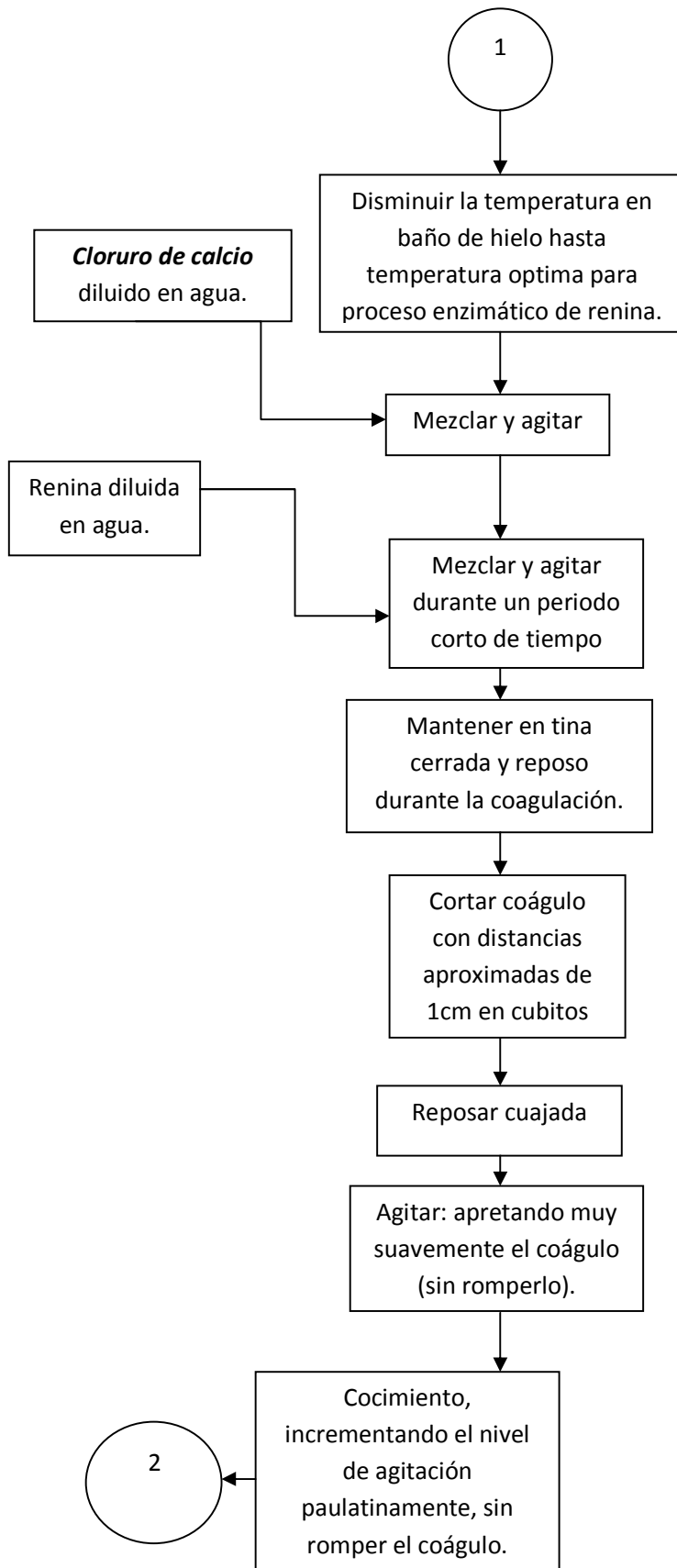
- Se obtuvo leche fluida de un establo local y fue estandarizada @ 6.7% de grasa, 4.2% de proteína y 18.8% de sólidos.
- Leche descremada en polvo LH (Dairy America) para estandarizar.
- Caseinato de calcio (Danisco Mexicana) para estandarizar.
- Grasa vegetal (Colon) para estandarizar.
- Pectina de alto metoxilo (Danisco Mexicana).
- Grenetina comercial (Danisco mexicana).
- Carragenina, principalmente iota (Danisco Mexicana).
- Transglutaminasa B con actividad de 100U/g de proteína (DVA Mexicana).
- Cloruro de calcio (Danisco Mexicana).
- Renina (Danisco Mexicana).
- Glutaciona reducida (Sigma Aldrich).
- Cloruro de sodio (Danisco Mexicana).
- Estabilizante (Danisco Mexicana).

### **8.2 Equipo**

- Vasijas de acero inoxidable para lotes de leche de 5 kg.
- Baño María con control de temperatura.
- Agitadores rotatorios de propela.
- Cámara de incubación con control de temperatura.
- Termómetros.
- Palas para agitación.
- Manta de cielo para desuerado.
- Moldes de acero inoxidable para queso.
- Prensa hidráulica.
- Balanza analítica.
- Refrigerador a 4°C.
- Homogeneizador.

### 8.3 Desarrollo experimental:





~ 60 ~

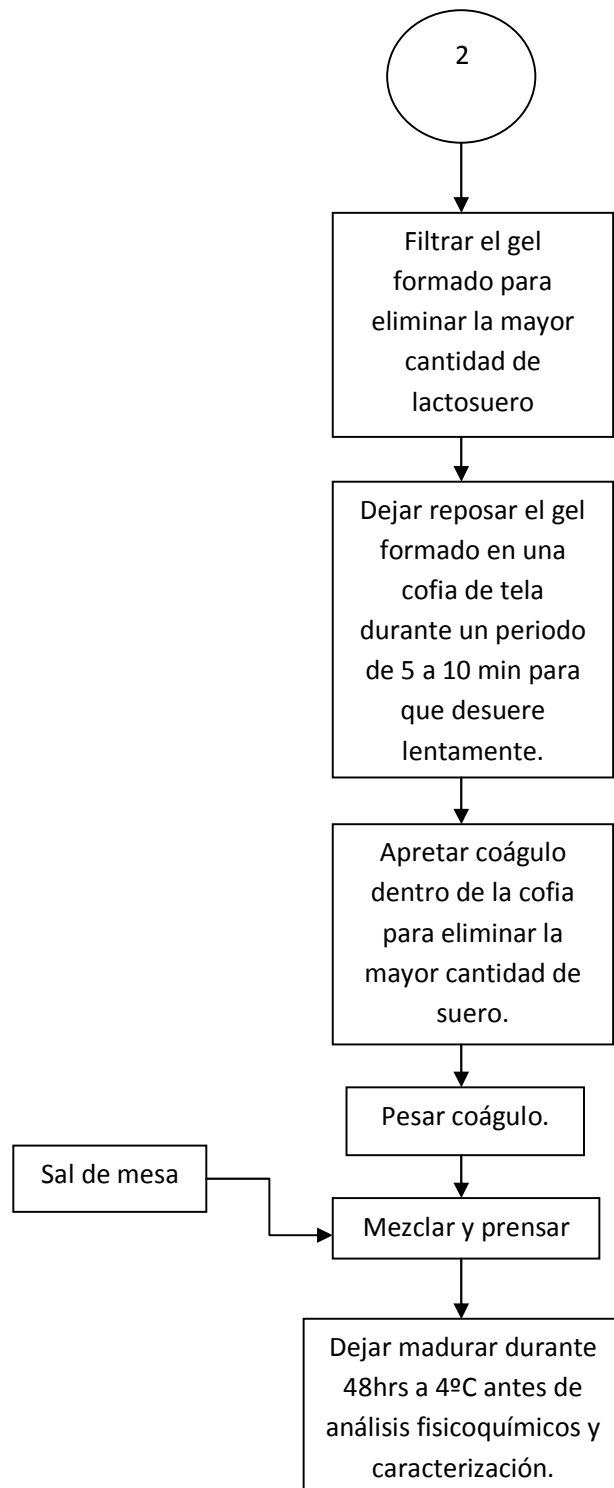


Figura 17. Proceso para la elaboración de un gel lácteo.

## **8.4 Métodos**

### **8.4.1 Porcentaje de proteína en el suero.**

El porcentaje de proteína que se pierde junto con el suero puede medirse cuantitativamente mediante el método de Sørensen (Miranda, 1974). El método consiste en agregar en un pequeño vaso de precipitados de unos 50ml una alícuota de 10ml de agua y 10ml del suero expulsado durante la sinéresis del gel. Este suero, ahora diluido, es neutralizado con NaOH al 0.1N, usando fenolftaleína como indicador. Es preciso detener la titulación cuando aparece una débil coloración rosada que persiste por 30 segundos. Agregar entonces 2 ml. de formaldehído al 36% y agitar suavemente el vaso de precipitados, para después dejarlo reposar durante 5 minutos antes de una segunda titulación con NaOH. Finalmente, los mililitros gastados durante la segunda valoración se multiplican por 1.83 para obtener el porcentaje de proteína contenida en el suero resultante. Es preciso mencionar que esta técnica presenta un rango de variación de  $\pm 0.1\%$  a diferencia del método Kjendal que es más preciso.

### **8.4.2 Porcentaje de grasa en suero.**

En un butirometro para suero de leche, se adicionan 10 ml de ácido sulfúrico con densidad de  $1.816 \pm 0.003$  g/ml al 90%. Después, una alícuota de suero de 11 ml. es adicionada por las paredes del butirometro antes de agregar un mililitro de alcohol amílico con densidad de  $0.811 \pm 0.002$ g/ml. El butirometro se cierra con un tapón de caucho y se voltea con cuidado de un lado a otro hasta tener una sola fase homogénea. Se coloca en una centrifuga Gerber para centrifugar durante 15 minutos. Posteriormente se mide el porcentaje de grasa directamente en el butirometro mediante una ligera presión manual en el tapón de caucho del mismo, asegurándose de que el tapón de caucho se mantenga siempre en la parte inferior. Es preciso hacer la medición de inmediato, ya que si la grasa se enfría lo suficiente solidificará y requerirá de un ligero calentamiento a baño María para su medición.

### **8.4.3 Sinéresis.**

Para las mediciones de sinéresis, se realizó una técnica empírica descrita por Lucey (1998) y Ye (2007) para la cuantificación del suero superficial.

En resumen, se cortan rebanadas de aproximadamente 0.5 cm de ancho de un gel lácteo inducido por renina, y de estas, se pesan 85g de muestra en un vaso de vidrio volumétrico de 100ml. El vaso es después sellado con parafilm y aluminio antes de incubar durante 16 horas a 30°C. Después del tiempo de incubación, el suero liberado es cuidadosamente decantado y pesado.

El índice de sinéresis (%) es calculado como:

Índice de sinéresis (%) = (peso del suero / peso de la muestra) X 100%

Donde, el índice de sinéresis indica la separación espontánea del suero superficial en un gel inducido por renina.

#### **8.4.4 Análisis de Perfil de Textura (TPA).**

Para la medición de los parámetros texturales en geles lácteos a base de renina, un estudio completo se pudo llevar a cabo a través de un Análisis de Perfil de Textura (TPA), este se realizó a temperatura ambiente (20°C aprox.) usando un texturómetro modelo TA-XT2 (Texture Technologies Corp., White Plains, N.Y.; Stable Micro Systems, UK). Cada muestra fue cortada del centro del gel y mantenida a 20°C por 30 minutos en contenedores cerrados. Durante la prueba, la muestra es comprimida en un 20% de su altura original por el embolo, después, este se retrae antes de iniciar un segundo ciclo de compresión para simular la masticación humana (Bullens, 1994; Bourne, 1988; Lobato-Caballeros y *col.*, 2002).

Según Szczesniak (1966), Friedman (1962) y Lobato-Caballeros (1998 y 2006), los parámetros arrojados por el análisis permiten determinar la **dureza, cohesividad, elasticidad, adhesividad, resiliencia, gomosidad y masticabilidad** de la muestra (Figura 18). Sin embargo, en este estudio no se determinó la masticabilidad ya que es un parámetro que se utiliza únicamente para muestras sólidas.

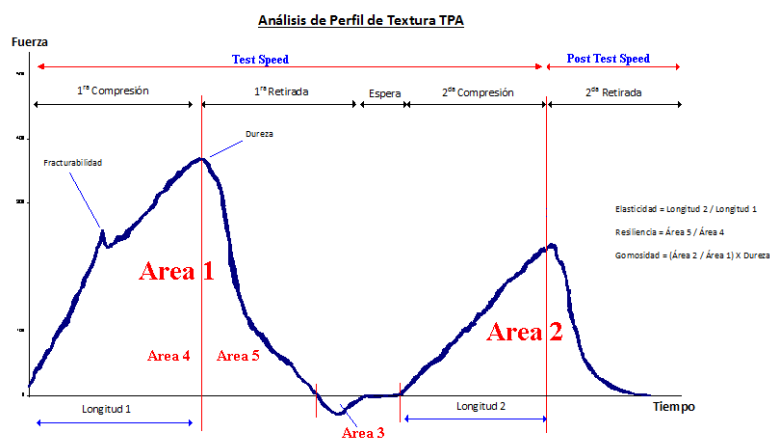


Figura 18. Gráfico típico generado de un análisis de perfil de textura (TPA).

El embolo utilizado es un cilindro plástico de ½ pulgada de diámetro (P/0.5), y la muestra deberá ser un cubo extraído de la parte interna del gel con dimensiones de 3x3x3cm. El análisis se realiza por triplicado y se establece un promedio.

Durante la prueba, la muestra es alcanzada por el embolo a 1.0 mm/s (Pre-Test Speed), hasta que 5g (Trigger force) de fuerza se detectan. El embolo entonces comienza a comprimir la muestra hasta alcanzar el 80% de su volumen original, la fuerza aplicada es grabada como el primer pico de fuerza. El embolo entonces se mantiene comprimiendo la muestra por 5 segundos (Time) para lograr un buen contacto entre el embolo y la muestra. Después de este tiempo, el embolo se retira a su posición inicial a una velocidad máxima de 5mm/s (Post-Test Speed). Durante este lapso, la fuerza necesaria para separar el embolo de la superficie de la muestra es registrada, y el área bajo la región positiva de la curva es llamada trabajo de “adhesión”, y la distancia transcurrida fuera de la muestra antes de la separación es regularmente llamada “cohesividad”. Para el caso del semisólido, esta distancia es también llamada “fibrosidad”. Posteriormente, y transcurridos 5 segundos (Time), el embolo vuelve a repetir la operación para medir un segundo pico de fuerza sobre la misma área de contacto en la muestra.

#### 8.4.5 Gradiente de fuerza.

El gradiente de fuerza es una prueba de compresión uniaxial recomendada por Danisco Mexicana. Durante esta compresión es posible medir la resistencia ofrecida por el semisólido a la penetración, entre más duro sea el material, mayor será la fuerza necesaria para alcanzar la



fractura del espécimen. Esta prueba se desarrolla utilizando un texturómetro modelo TA-XT2 (Texture Technologies Corp., White Plains, N.Y.; Stable Micro Systems, UK) con un embolo cilíndrico de acero inoxidable de 5mm de diámetro (P/5) que comprime paulatinamente una muestra obtenida de la parte interna del gel lácteo con dimensiones de 3x3x3cm (Fig. 19). La prueba preferentemente se lleva a cabo por triplicado y se establece un promedio final.

Durante la prueba, el embolo se acerca a la muestra a una velocidad de 1.0 mm/s (Pre-Test Speed), hasta que 5g (Trigger force) de fuerza se detectan. El embolo entonces comienza a comprimir la muestra y la fuerza necesaria para penetrar la muestra es grabada como el gradiente de fuerza. Por su parte, el embolo sigue comprimiendo la muestra hasta alcanzar una distancia de 20.0mm. Después de este lapso, el embolo se retira al punto de partida a una velocidad máxima de 10mm/s (Post-Test Speed).

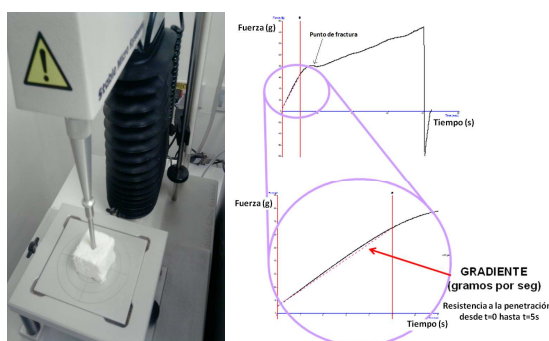


Figura 19. Gradiente de fuerza

#### 8.4.6 Pegajosidad.

En una prueba de compresión uniaxial, cuando el embolo no alcanza a penetrar la muestra o espécimen y es retirado a su punto inicial después de una ligera compresión, existe una fuerza de resistencia a la separación de ambos cuerpos en contacto, mejor conocida como pegajosidad (Prueba recomendada por Danisco Mexicana). Durante esta medición no existe una alta deformación del material, ya que regularmente este regresa a su forma original. Para la medición se utiliza un texturómetro modelo TA-XT2 (Texture Technologies Corp., White Plains, N.Y.; Stable Micro Systems, UK) con un embolo esférico de acero inoxidable con una pulgada de diámetro (P/1S) que sirve para comprimir una muestra de la parte interna del semisólido con dimensiones

de 3x3x3cm en una distancia constante y durante determinado periodo de tiempo antes de separarse del espécimen. La medición se hace por triplicado y se establece un promedio.

La prueba comienza cuando el embolo se acerca a la muestra a 5.0 mm/s (Pre-Test Speed), hasta que 5g (Trigger force) de fuerza normal en la muestra se detectan. El embolo entonces se mantiene comprimiendo la muestra por dos segundos (Hold time) para lograr un buen contacto entre el embolo y la muestra. Después de este tiempo, el embolo se retira 4mm (Distance) de la muestra a una velocidad máxima de 10mm/s (Post-Test Speed). Durante este tiempo, la fuerza necesaria para separar el embolo de la superficie de la muestra es registrada como un pico de fuerza negativa en un grafico de fuerza contra tiempo y se registra como pegajosidad (Fig. 20).

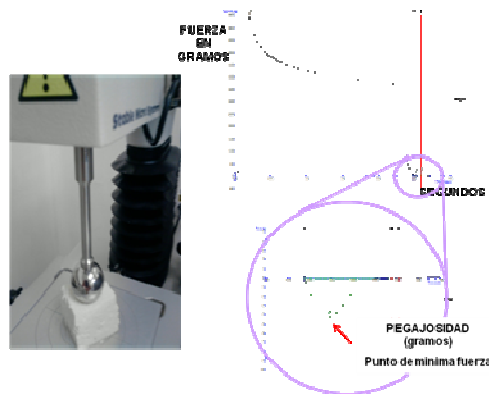


Figura 20. Pegajosidad

#### 8.4.7 Micro estructura de geles lácteos

La microestructura de los geles fue observada en un microscopio electrónico de barrido modelo JEOL JEM-6390LV (JEOL, Japón). Las muestras fueron cortadas del interior de cada gel con un cuchillo en rebanadas muy finas rectangulares de aproximadamente 1mm de espesor. Las rebanadas se introdujeron inmediatamente en un desecador durante 15 días. Las piezas secas se montaron en pequeños soportes cilíndricos metálicos usando cinta con adhesivo por ambos lados, posteriormente las muestras fueron recubiertas con una capa delgada de oro y observadas a varias magnificaciones.

## 8.5 Herramientas estadísticas para la evaluación de los métodos

### 8.5.1 Evaluación de variables mediante un diseño de experimentos Plackett y Burman.

La experimentación se dividió en dos partes. Durante la primera etapa se llevo a cabo un diseño de experimentos Plackett y Burman para filtrar los factores que afectaban positivamente el **gradiente de fuerza**, sin incrementar la **pegajosidad** del gel control, ya que estos son atributos deseables por el consumidor.

Los factores seleccionados para el desarrollo de este primer diseño fueron contenido de carragenina, contenido de pectina, contenido de grenetina, tiempo de incubación con transglutaminasa y concentración de calcio. La Tabla 3 muestra estos factores seleccionados y sus respectivos niveles de variación, los cuales fueron utilizados para generar un diseño Plackett y Burman con 8 experimentos (Tabla 4), mediante el paquete estadístico Design Expert V.8.

Tabla 3. Factores seleccionados y sus niveles de variación

Factores				
Carragenina	Pectina	Grenetina	Tgasa	Calcio
0%-0.025%	0%-0.08%	0%-0.3%	0%-0.07%	0.05%-0.2%
Niveles				

Tabla 4. Diseño experimental Plackett y Burman

Corrida	Variables				
	Carragenina	Pectina	Grenetina	Tgase	Calcio
1	0.025	0.000	0.000	0.070	0.200
2	0.025	0.080	0.300	0.000	0.200
3	0.000	0.080	0.300	0.070	0.050
4	0.025	0.080	0.000	0.070	0.050
5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050
6	0.025	0.000	0.300	0.000	0.050
7	0.000	0.000	0.300	0.070	0.200
8	0.000	0.080	0.000	0.000	0.200
<i>Control</i>	<i>0.000</i>	<i>0.000</i>	<i>0.000</i>	<i>0.000</i>	<i>0.100</i>

### 8.5.2 Diseño central compuesto y metodología de superficie de respuesta

Una vez encontradas las variables significativas correspondientes al diseño Plackett y Burman, la siguiente etapa fue establecer un diseño experimental central compuesto conformado de un factorial  $2^k$  (donde  $K=3$ ), una serie de corridas axiales y 4 puntos centrales, teniendo en total 18 experimentos. Las variables independientes establecidas fueron concentración de carragenina, cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) y tiempo de incubación con transglutaminasa. Por otro lado, las variables a evaluar fueron: **porcentaje de proteína en el suero, porcentaje de grasa en suero, sinéresis, análisis de perfil de textura (TPA), gradiente de fuerza y pegajosidad.**

En la tabla 5 se muestran los efectos principales o factores “k” y sus respectivos niveles de variación para el desarrollo del diseño central compuesto  $2^k$ .

Tabla 5. Factores y niveles de variación

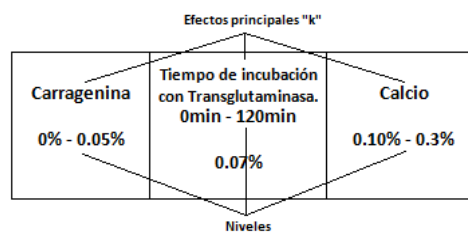


Tabla 6. Diseño experimental central compuesto  $2^3$ .

<i>Diseño final, central compuesto <math>2^3</math></i>				
	<i>Variables</i>			
Corrida	Carragenina	Incubación	Calcio	
	(%)	(min)	(%)	
1	0.040	95.68	0.14	
2	0.040	24.32	0.26	
3	0.010	95.68	0.26	
4	0.025	60.00	0.20	
5	0.010	95.68	0.14	
6	0.025	60.00	0.20	
7	0.025	60.00	0.30	
8	0.050	60.00	0.20	
9	0.025	60.00	0.20	
10	0.025	0.00	0.20	
11	0.010	24.32	0.14	
12	0.025	60.00	0.20	
13	0.010	24.32	0.26	
14	0.040	95.68	0.26	
15	0.025	60.00	0.10	
16	0.000	60.00	0.20	
17	0.040	24.32	0.14	
18	0.025	120.00	0.20	
Control	0.000	0.00	0.14	

## 9. Resultados y discusión

### 9.1 Evaluación mediante un diseño de experimentos Plackett y Burman

Con los resultados obtenidos del diseño Plackett y Burman se concluyó que las variables transglutaminasa y  $\text{CaCl}_2$  ayudaron a incrementar el gradiente de fuerza (figura 21). A pesar de que la combinación entre las variables carragenina y pectina también incrementaron el gradiente de fuerza, la presencia de pectina incrementó la pegajosidad (figura 22) y favoreció la pérdida de proteína y grasa en el gel. Es posible que la pectina de alto metoxilo que no es capaz de formar estructuras tipo gel a pH neutro con las caseínas (Marozienne y de Kruif, 2000), forme complejos con las proteínas de suero en presencia de calcio (Voragen y *col.*, 2009). A pesar de esto, dichos complejos se pierden junto con el líquido que conforma el suero, por lo que la agregación se verá desfavorecida y su interacción no muestra relevancia. Es por esto que la pectina no fue considerada para el siguiente diseño. A demás, los polisacáridos sulfatados como las carrageninas, interactúan con mayor fuerza con las proteínas que los polisacáridos carboxilados como alginatos y pectinas (Doublier y *col.*, 2000), generando de esta forma una agregación mas fuerte entre las proteínas y reflejándose en el incremento de la rigidez del sistema o gradiente de fuerza del gel.

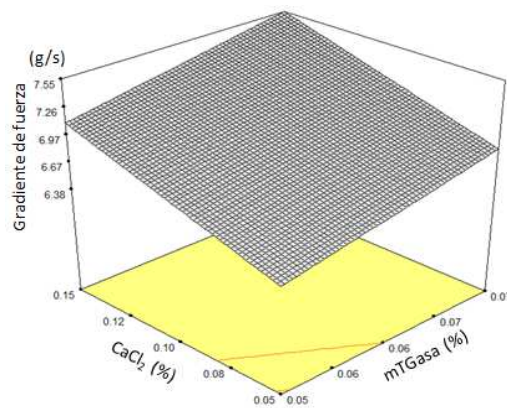


Fig. 21. Gradiente de fuerza para la interacción  $\text{CaCl}_2$  / mTGasa.

Por otra parte, la carragenina (figura 22), y la combinación entre gnetina y calcio que reducen la pegajosidad, pueden ser utilizados en un posterior diseño de experimentos. Sin embargo, a pesar de que la gnetina en combinación con calcio y transglutaminasa, incrementa el gradiente de fuerza y disminuye la pegajosidad (figura 23), tiene la capacidad de retener humedad en el gel, lo

que puede favorecer el crecimiento microbiano durante el almacenamiento. Por esta razón, la gretina no fue considerada en el diseño central compuesto.

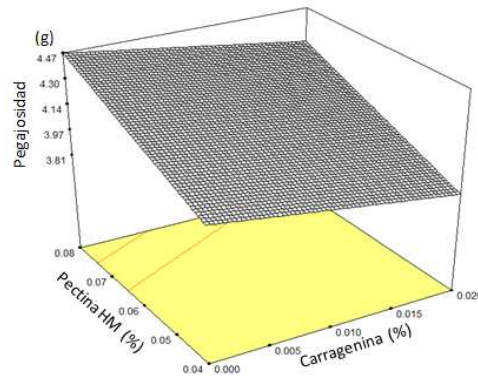


Fig. 22. Pegajosidad para la interacción pectina / carragenina.

El calcio incrementa el gradiente de fuerza en el gel (figura 21), y la pegajosidad del coágulo. Sin embargo, en presencia de carragenina y transglutaminasa, incrementa la fuerza del gel de forma sinérgica, disminuyendo la pegajosidad del mismo (figura 23 corrida 1; tabla 4 corrida 1).

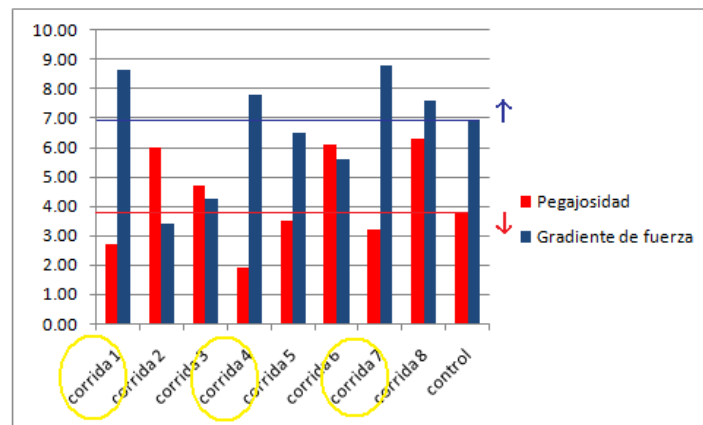


Fig. 23. Respuestas del diseño Plackett & Burman.

Es por esto que tanto la carragenina, como la transglutaminasa y el  $\text{CaCl}_2$ , fueron las variables seleccionadas para realizar un diseño central compuesto  $2^3$ , estudiando el efecto de éstas sobre las distintas variables de respuesta propuestas.

## 9.2 Superficies de respuesta mediante un diseño central compuesto 2<sup>3</sup>

### 9.2.1 Porcentaje de proteína en suero

Uno de los atributos preferentemente deseables durante la elaboración o manufactura de geles lácteos a base de renina es que el contenido de proteínas que se pierde junto con el suero sea mínimo.

En la figura 24 se puede apreciar que la pérdida de proteína en el suero depende mucho de la concentración de calcio presente. A concentraciones de calcio de 0.10% el porcentaje de proteína en el suero fue menor a medida que se incrementó el contenido de carragenina independientemente del tiempo de incubación. A pesar de que no se observa una influencia importante del tiempo de incubación en la retención de proteína, es posible visualizar una ligera disminución de proteína en suero al incrementar la incubación con transglutaminasa. La carragenina es un polisacárido con grupos sulfatados capaz de interactuar con caseínas y seroproteínas a través de iones calcio. Esto al parecer, favorece la agregación proteica evitando que las seroproteínas se pierdan en el desuerado cuando el porcentaje de cloruro de calcio es bajo.

Por otro lado, al emplear concentraciones mayores de calcio (0.3%), es posible observar que el porcentaje de proteína en suero fue mínimo al utilizar bajas concentraciones de carragenina. De acuerdo con Marangoni *y col.* (2000), los sitios hidrofóbicos de las proteínas del suero que logran exponerse durante la pasteurización y en presencia de calcio, se agregan durante el enfriamiento y favorecen la formación de un gel con un máximo en fuerza y elasticidad bajo concentraciones de calcio de 30mM.

A pesar de que Weinbreck *y col.* (2004) establecen que es posible formar complejos solubles favorecidos por el incremento en la concentración de  $\text{CaCl}_2$  entre las proteínas séricas y las carrageninas a pH neutro, parece ser que dicha interacción únicamente sucede cuando el porcentaje en peso de  $\text{CaCl}_2$  es menor a 0.20%. Por otro lado, Lucey y Fox (1993), Solorza y Bell (1998) y Joshi *y col.* (2004) afirman que la interacción entre los residuos de las  $\kappa$ -caseínas cuando se encuentra en su forma hidrolizada, comienza cuando el calcio se encuentra por arriba de 10mM (>0.10%). Si esto es cierto, es entonces posible que las interacciones mas fuertes sean favorecidas

entre caseínas y carrageninas por encima de este porcentaje de calcio, desplazando así a las proteínas globulares presentes junto con el suero.

El factor tiempo de incubación con transglutaminasa parece no favorecer considerablemente la retención de proteínas séricas en el coágulo de caseínas. Solo es posible observar que bajo condiciones de 0.3% de  $\text{CaCl}_2$ , el porcentaje de proteína en suero disminuye ligeramente a medida que aumenta el tiempo de incubación y la concentración de carragenina es  $>0.025\%$ . Se ha reportado que las proteínas del suero son sustratos pobres para la reacción enzimática debido a su estructura globular compacta. La  $\beta$ -lactoglobulina puede actuar como sustrato para la transglutaminasa únicamente en sistemas de única proteína, ya que si la  $\beta$ -caseína está presente también en el sistema, la  $\beta$ -lactoglobulina no es utilizada por la enzima (Bordignon-Luis y col., 2008). Por otro lado, Corredig (2009), Jaros (2009) y Bönisch (2008) aseguran que al existir  $\kappa$ -caseína en el sistema, la reacción de catálisis se verá mayormente favorecida por esta que por la  $\beta$ -caseína. Por lo que al existir caseínas presentes en el sistema, la afinidad de catálisis será por dichas proteínas, dejando a las proteínas solubles libres en solución.

La ecuación 1 representa el modelo matemático para esta variable, el cual mostró poco ajuste con los datos experimentales ( $P>0.05$ ). De acuerdo con el ANOVA (Anexo II), la interacción carragenina-calcio fue el único factor significativo.

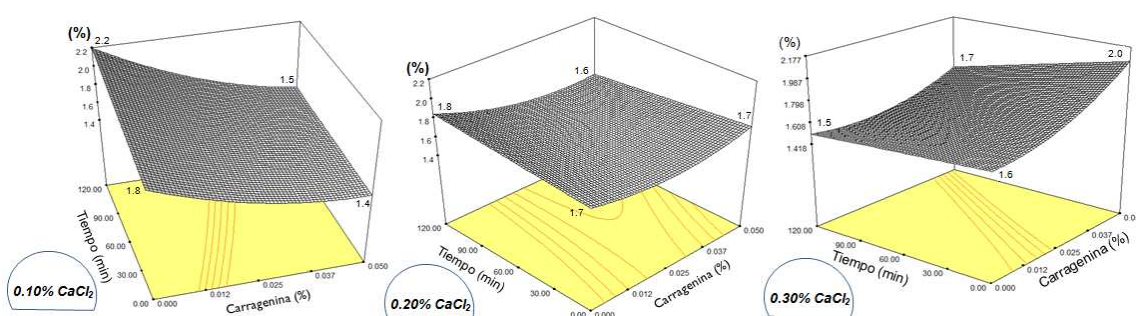


Fig. 24. Superficie de respuesta para % de proteína en suero.

$$\text{Proteína en suero} = +1.98 - 26.18 * \text{Carragenina} + 4.43 \times 10^{-3} * \text{Tiempo} - 1.28 * \text{Calcio} + 172.73 * \text{Carragenina}^2 - 0.04 * \text{Carragenina} * \text{Tiempo} + 89.10 * \text{Carragenina} * \text{Calcio} - 0.01 * \text{Tiempo} * \text{Calcio} \quad (\text{Ec. 1})$$



### 9.2.2 Porcentaje de grasa en suero

La Figura 25 muestra la influencia del tiempo de incubación y contenido de carragenina en el porcentaje de grasa en suero a distintas concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ . Se puede observar que al emplear una concentración de  $\text{CaCl}_2$  del 0.10%, el contenido de grasa en suero se incrementó notablemente al aumentar el tiempo de incubación independientemente de la concentración de carragenina. Sin embargo, al incrementar el contenido de  $\text{CaCl}_2$  (0.3%) en el sistema, la tendencia fue a la inversa, es decir, el porcentaje de grasa en suero fue mayor a cortos tiempos de incubación. Es posible deducir que a bajos contenidos de calcio las moléculas de caseína comienzan a comportarse como partículas de gel por la formación de enlaces covalentes formados por la catálisis enzimática dentro y fuera de las micelas de caseína (Corredig, 2009). Lo anterior favorecería la retención de humedad en el coágulo, desplazando a los glóbulos de grasa hacia el suero como consecuencia de la incompatibilidad termodinámica hidrofóbico-hidrofílico en el sistema. Sin embargo, Jaros (2009) y Bönisch (2008) mencionan que dicha capacidad de retención de agua disminuye al incrementar la adición de  $\text{CaCl}_2$ . Y si la retención de humedad disminuye, nuevamente se verán favorecidas las interacciones hidrofóbicas. En términos generales se puede observar que al incrementar el contenido de  $\text{CaCl}_2$ , la cuajada retuvo una mayor cantidad de grasa. De acuerdo con Eck (1990), los iones  $\text{Ca}^{2+}$  son necesarios para la existencia de micelas de caseína y facilitan la retención de grasa en la cuajada. Esto se debe a que al incrementar la concentración de calcio se favorecen e incrementan las interacciones hidrofóbicas mediante el abastecimiento de enlaces dentro y fuera de las micelas de caseína (Joshi 2004 y 2003; Lucey y Fox 1993).

Por otro lado, una concentración aproximada de carragenina de 0.025% conllevaría a una menor pérdida de grasa en suero independientemente del tiempo de incubación y del contenido de calcio. Lo anterior se puede atribuir a la formación de una red entre las micelas de caseína y la carragenina en su forma principalmente helicoidal (Langendorff y col., 1999). Si la carragenina incrementa por arriba de 0.025% aumenta la cantidad de grasa en el suero sobre todo a concentraciones elevadas de  $\text{CaCl}_2$  (0.3%). Según Langendorff (1999), cuando la concentración de carragenina está por encima de 0.025%, se da la formación de una segunda red entre carragenina-carragenina lo que favorece la retención de humedad. Esta última interacción es térmicamente reversible y puede perderse durante el cocimiento de la cuajada.

El modelo matemático obtenido para esta variable se representa en la ecuación 2. El modelo mostró un buen ajuste a los datos experimentales ( $P < 0.05$ ), siendo la carragenina y el  $\text{CaCl}_2$  las variables que más influencia tuvieron sobre el porcentaje de grasa en suero.

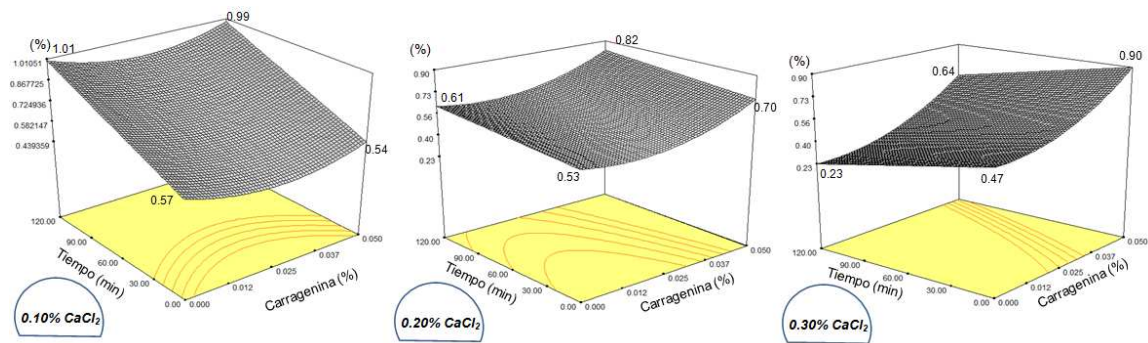


Fig. 25. Superficie de respuesta para la pérdida en % de grasa en suero.

$$\text{Grasa en suero} = +0.59 -13.39*\text{Carragenina} +6.72\times 10^{-3}*\text{Tiempo} -0.36*\text{Calcio} +177.39*\text{Carragenina}^2 +42.43*\text{Carragenina}*\text{Calcio} -0.029*\text{Tiempo}*\text{Calcio} \quad (\text{Ec. 2})$$

### 9.2.3 Sinéresis

La sinéresis no es más que la separación de las fases que componen una suspensión o mezcla. Es la extracción o expulsión del líquido contenido en un gel, por lo que el gel pasa de ser una sustancia homogénea a una segregación de componentes sólidos separados y contenidos en la fase líquida. Un ejemplo de esto puede ilustrarse mediante la separación en suero y cuajada a partir de la leche cortada (Kunitz, 1928; Prasad & Sundaram, 1950).

A demás, su medición es muy importante, ya que durante la transportación y almacenaje del gel lácteo, este puede presentar sinéresis en diferentes grados, lo cual es un atributo poco deseable para el consumidor, por lo que preferiblemente se busca su reducción.

En la figura 26 es evidente que un incremento gradual en el grado de sinéresis ocurre al incrementar el contenido de  $\text{CaCl}_2$  en el sistema. Joshi (2003 y 2004) y Lucey & Fox (1993) señalan también que al incrementar la concentración de calcio, se incrementa el grado de sinéresis en el gel debido a que se favorecen las interacciones hidrofóbicas entre micelas de caseína, generando una reestructuración final de la red.

Similar a los resultados obtenidos por Ye y col. (2007), cuando el porcentaje de CaCl<sub>2</sub> es de 0.10% es posible identificar un incremento en el grado de sinéresis de hasta aproximadamente 4 veces al incrementar el porcentaje de carragenina. Así mismo, al aumentar el tiempo de incubación con transglutaminasa la sinéresis se ve favorecida. Este incremento en el grado de sinéresis es el resultado de la capacidad de retención de humedad que tienen tanto la carragenina, como la transglutaminasa. Dicho incremento en la humedad durante la elaboración de geles lácteos inducidos por renina y en presencia de carragenina a pH neutro también fue encontrado por Henry y Joseph (1986).

Al incrementar el porcentaje de CaCl<sub>2</sub> se puede observar que el efecto de la concentración de carragenina y el tiempo de incubación es menos intenso. De acuerdo con Jaros (2009) y Bönisch (2008), existe una reducción en la separación de suero al utilizar transglutaminasa microbiana en pequeñas dosis. Por otra parte, la capacidad para disminuir la sinéresis también es posible al utilizar carragenina iota (Danisco México, 2010; Badui, 1999; Langendorff, 1999; Payens, 1971).

La ecuación 3 muestra el modelo matemático para la sinéresis. Este modelo mostró poco ajuste con los datos experimentales ( $P > 0.05$ ).

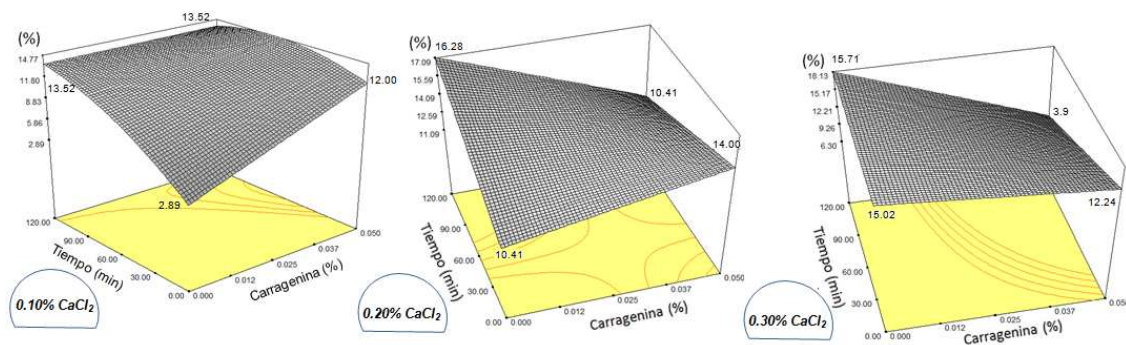


Fig. 26. Superficie de respuesta para la sinéresis.

$$\text{Sinéresis} = -7.87 + 304.41 \cdot \text{Carragenina} + 0.19 \cdot \text{Tiempo} + 123.31 \cdot \text{Calcio} - 4.80 \times 10^{-4} \cdot \text{Tiempo}^2 - 157.33 \cdot \text{Calcio}^2 - 1.5 \cdot \text{Carragenina} \cdot \text{Tiempo} - 1202.08 \cdot \text{Carragenina} \cdot \text{Calcio} - 0.41 \cdot \text{Tiempo} \cdot \text{Calcio} \quad (\text{Ec. 3})$$

### 9.2.4 TPA Firmeza

La firmeza se define como el pico de fuerza máximo durante el primer ciclo de compresión (primer mordida) durante la prueba de TPA.

A concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  de 0.1 y 0.2% es posible notar que la firmeza prácticamente no es afectada por el incremento en el porcentaje de carragenina en el tiempo mínimo de incubación (Figura 27). Sin embargo, a medida que el periodo de incubación aumenta, la firmeza del gel se ve disminuida al incrementar la carragenina. Es posible que cuando se comienza a formar la segunda red de carragenina, esta retenga mayor cantidad de agua, debilitando así la firmeza del gel. La combinación entre ambos factores genera una retención sinérgica de humedad que se refleja en la disminución de la firmeza. Al aumentar la concentración de  $\text{CaCl}_2$  a 0.3%, puede observarse que la firmeza se incrementa gradualmente en presencia de carragenina e independientemente del tiempo de incubación. Esto sucede porque la carragenina iota es afín a los iones calcio, favoreciendo la interacción entre moléculas de carragenina durante su transición a hélices.

De acuerdo con Lucey y Fox (1993), Joshi *et al.* (2004) y Solorza y Bell (1998), la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  por encima de 100mM, provoca que la firmeza del gel se reduzca por la excesiva formación de enlaces calcio que interfiere con la formación adecuada de la red. Sin embargo, en este trabajo al aumentar la concentración de calcio no se identificó una influencia importante sobre la firmeza del gel.

El modelo matemático representado por la ecuación 4, mostró poco ajuste con los datos experimentales ( $P > 0.05$ ).

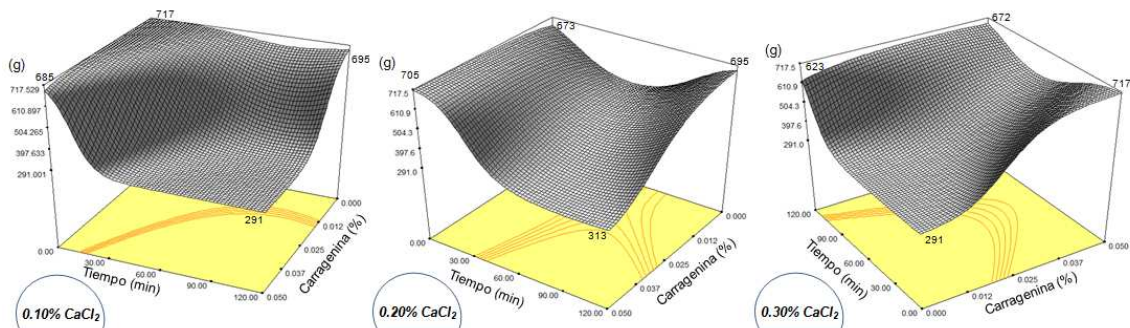


Fig. 27. Superficie de respuesta para la tendencia de la dureza.

$$\begin{aligned} \text{Logit (Dureza)} &= \text{Ln} [(Dureza-290.98)/(717.73-Dureza)] \\ &= +11.69 -181.87*\text{Carragenina} -0.17*\text{Tiempo} -33.25*\text{Calcio} -1180.82*\text{Carragenina}^2 +7.65*10^{-4}*\text{Tiempo}^2 \\ &\quad -68.66*\text{Calcio}^2 -1.26*\text{Carragenina}*\text{Tiempo} +1388.58*\text{Carragenina}*\text{Calcio} +0.44*\text{Tiempo}*\text{Calcio} \quad (\text{Ec. 4}). \end{aligned}$$

### 9.2.5 TPA Cohesividad

La cohesividad es la relación que existe entre el área de fuerza positiva durante la segunda compresión, con la fuerza que sucede durante la primera compresión. Se define como el grado con el que el material se desintegra bajo una acción mecánica.

A concentraciones alrededor de 0.10% de CaCl<sub>2</sub>, la cohesividad de los geles disminuye al aumentar la concentración de carragenina para cualquier tiempo de incubación. Sin embargo, al aumentar el contenido de CaCl<sub>2</sub>, el fenómeno se revierte, ya que la cohesividad disminuye al reducir la concentración de carragenina. Es importante resaltar que el tiempo de incubación no fue una variable significativa en esta propiedad, ya que no se observa una influencia bajo ninguna concentración de CaCl<sub>2</sub> (Figura 28). De acuerdo con Danisco México (2010) y Payens (1971), cuando la carragenina se encuentra presente en sistemas lácteos, la coherencia del gel dependerá principalmente de la cantidad de iones calcio.

La ecuación 5 muestra el modelo matemático para la cohesividad. Este modelo presentó un bajo ajuste con los datos experimentales ( $P>0.05$ ).

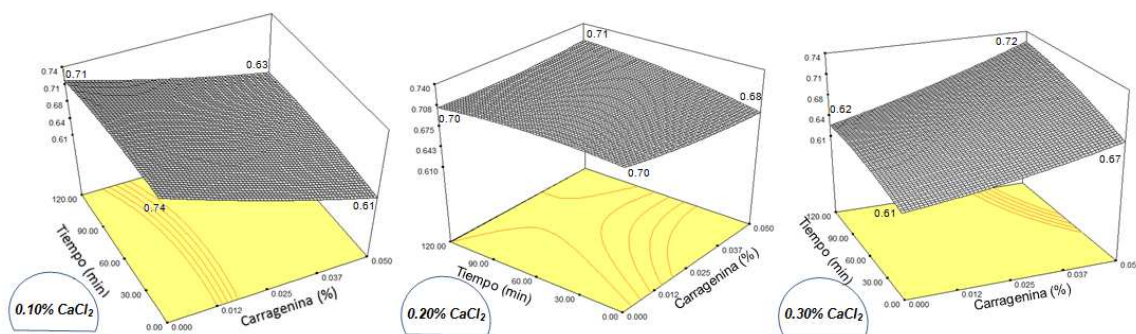


Fig. 28. Superficie de respuesta para cohesividad.

$$\begin{aligned} \text{Cohesividad} &= +0.70 -4.85*\text{Carragenina} -1.33*10^{-4}*\text{Tiempo} +0.73*\text{Calcio} +8.18*\text{Carragenina}^2 -1.91*10^{-6} \\ &\quad * \text{Tiempo}^2 -3.44*\text{Calcio}^2 +7.07*10^{-3}*\text{Carragenina}*\text{Tiempo} +18.38*\text{Carragenina}*\text{Calcio} +1.65*10^{-3} * \text{Tiempo} \\ &\quad * \text{Calcio} \quad (\text{Ec. 5}). \end{aligned}$$

### 9.2.6 TPA Elasticidad

La elasticidad está relacionada con la altura que el alimento recupera durante el lapso de tiempo entre el final de la primera mordida y el comienzo de la segunda.

Como se puede observar en la figura 29, la elasticidad del gel se incrementa al aumentar la concentración de carragenina por arriba de 0.037% en los distintos niveles de  $\text{CaCl}_2$  (0.1, 0.2 y 0.3%). Es posible que esto se deba a la formación de la red entre moléculas de carragenina-carragenina. De igual manera, *Danisco México* (2010) y Payens (1971) establecen que la carragenina, principalmente iota, brinda elasticidad a sistemas de geles lácteos.

Gerrard (2000) sostiene que la enzima transglutaminasa ayuda a mejorar eficientemente la elasticidad en sistemas proteínicos, pero en el estudio realizado se encontró que la elasticidad únicamente incrementa cuando el tiempo de incubación no rebasa de 60 minutos, ya que tiempos de incubación más prolongados provocan una ligera disminución en esta propiedad.

El modelo matemático obtenido para la elasticidad (Ec. 6) presentó un bajo ajuste con los datos experimentales ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, el ANOVA (Anexo II) mostró que la concentración de carragenina y su valor cuadrático tuvieron una influencia significativa sobre esta variable respuesta.

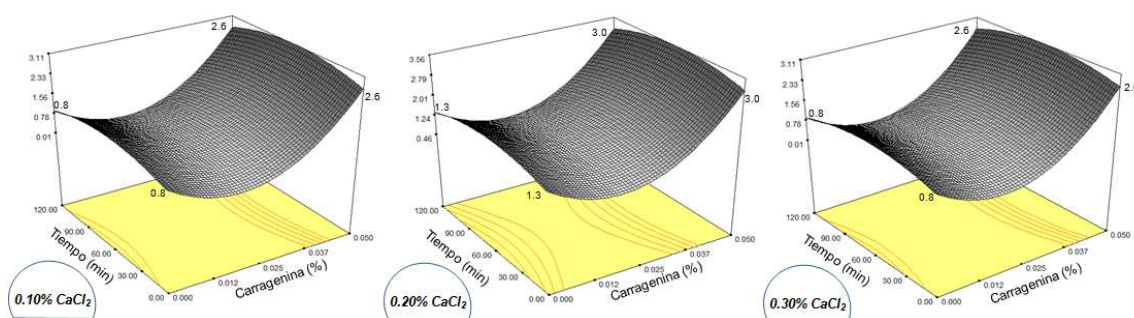


Fig. 29. Superficie de respuesta para la tendencia de elasticidad.

$$\text{Elasticidad} = -0.45 - 97.54 * \text{Carragenina} + 0.015 * \text{Tiempo} + 18.14 * \text{Calcio} + 2650.98 * \text{Carragenina}^2 - 1.25 \times 10^{-4} * \text{Tiempo}^2 - 45.36 * \text{Calcio}^2 \quad (\text{Ec. 6}).$$

### 9.2.7 TPA Adhesividad.

La adhesividad se define como el área de fuerza negativa para la primera mordida, y representa el trabajo requerido para vencer las fuerzas atractivas entre la superficie de un alimento y la superficie de otro material con el cual el alimento se pone en contacto.

Cuando se reduce el contenido de calcio, la matriz de para-caseína se mantiene hidratada, se hincha e incrementa el contenido total de humedad en el coagulo (Guinee y col., 2002; Joshi y col., 2003; Joshi y col., 2004). Esta reducción de calcio hace que las proteínas mantengan un menor grado de agregación en la matriz, y se refleja en un incremento de la adhesividad del sistema (Figura 30).

El tiempo de incubación disminuye ligeramente la adhesividad cuando este se encuentra por arriba de 60 minutos. Posiblemente el entrecruzamiento, que establece enlaces covalentes, mantenga a las proteínas mas fuertemente unidas, evitando el incremento en la adhesividad. Pero en el caso de que el tiempo de incubación incremente por arriba de 60 minutos, la adhesividad nuevamente se hará presente, posiblemente por el incremento en la humedad retenida dentro del coagulo.

La carragenina también incremento la adhesividad, pero solamente si existe una proporción alta de iones calcio (0.30%  $\text{CaCl}_2$ ), de lo contrario solo la reducirá (0.10 y 0.2%  $\text{CaCl}_2$ ).

El modelo matemático obtenido para la adhesividad (Ec. 7) presentó un buen ajuste con los datos experimentales ( $P < 0.05$ ). De acuerdo con el ANOVA (Anexo II), la interacción carragenina-calcio fue la que mayor influencia tuvo sobre esta propiedad.

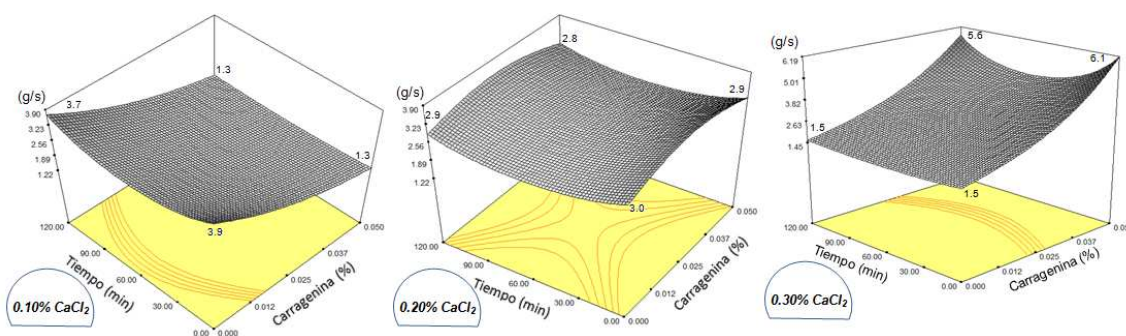


Fig. 30. Superficie de respuesta para la tendencia de adhesividad.

$$1/\text{Adhesividad} = +0.4 + 15.08 \cdot \text{Carragenina} + 2.41 \times 10^{-3} \cdot \text{Tiempo} - 2.51 \cdot \text{Calcio} + 82.82 \cdot \text{Carragenina}^2 - 1.91 \times 10^{-5} \cdot \text{Tiempo}^2 + 10.74 \cdot \text{Calcio}^2 - 94.25 \cdot \text{Carragenina} \cdot \text{Calcio} \quad (\text{Ec. 7}).$$

### 9.2.8 TPA Resiliencia.

Esta propiedad es una medición que indica como la muestra se recupera de la deformación en términos de velocidad y fuerzas derivadas. No es un parámetro originario del TPA, pero fue desarrollado para conocer más a detalle la recuperación elástica del material.

Al analizar la figura 31, se observa que cuando el porcentaje de calcio incrementa (0.3%), disminuye la resiliencia. Esto significa que a mayor contenido de calcio, la recuperación del gel después de su deformación será más rápida.

Para concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  de 0.1 y 0.2%, incrementos en el contenido de carragenina provocan una disminución en la resiliencia a cualquier tiempo de incubación (Figura 27). Sin embargo, cuando la concentración de calcio en el sistema se incrementa (0.30%  $\text{CaCl}_2$ ), la resiliencia disminuye.

Aunque el tiempo de incubación no modifica considerablemente la recuperación del gel, parece incrementar el tiempo de recuperación cuando existe carragenina presente y en dependencia del incremento en la concentración de calcio. Es decir, totalmente lo contrario a lo que sucede cuando no existe carragenina ni tiempo de incubación presentes.

El modelo matemático para esta variable es representado por la ecuación 8. De acuerdo con el ANOVA (Anexo II), este modelo presentó un bajo ajuste a los datos experimentales ( $P > 0.05$ ).

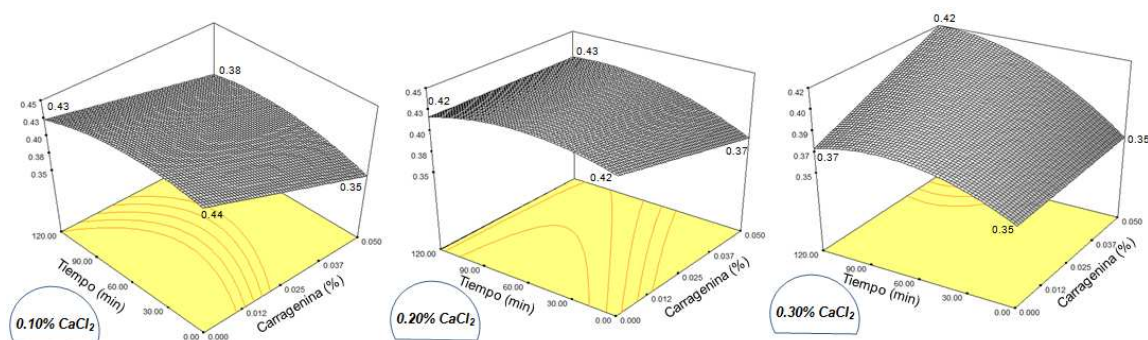


Fig. 31. Superficie de respuesta para resiliencia.



$$\text{Resiliencia} = +0.43 - 2.87 * \text{Carragenina} + 2.38 \times 10^{-4} * \text{Tiempo} + 0.34 * \text{Calcio} - 4.64 \times 10^{-6} * \text{Tiempo}^2 - 2.02 * \text{Calcio}^2 + 7.54 \times 10^{-3} * \text{Carragenina} * \text{Tiempo} + 9.9 * \text{Carragenina} * \text{Calcio} + 1.65 \times 10^{-3} * \text{Tiempo} * \text{Calcio} \quad (\text{Ec. 8}).$$

### 9.2.9 TPA Gomosidad.

La gomosidad se define como el producto de dureza por cohesividad y es una característica de los alimentos semisólidos con un menor grado de dureza y un alto grado de cohesividad.

La figura 32 muestra la influencia del tiempo de incubación y carragenina en la gomosidad a diferentes niveles de CaCl<sub>2</sub>. Es posible observar que cuando el porcentaje de carragenina se incrementa, la gomosidad disminuye bajo concentraciones de CaCl<sub>2</sub> de 0.1 y 0.2%. Sin embargo, el incremento en el nivel de calcio (0.3% CaCl<sub>2</sub>), confiere una interacción mas fuerte entre carrageninas y caseínas, lo que se refleja en geles lácteos como mayor gomosidad.

La gomosidad también se reduce durante el tratamiento con transglutaminasa en niveles de 0.10 y 0.20% de CaCl<sub>2</sub>, donde la reducción depende mucho del contenido de carragenina presente en el sistema. Por otro lado, a una concentración de 0.3% de CaCl<sub>2</sub>, el tiempo de incubación favorece la gomosidad, sobre todo a concentraciones mínimas de carragenina.

El modelo matemático para la variable gomosidad (Ec. 9) presentó un ajuste moderado a los datos experimentales ( $P \approx 0.05$ ), siendo la interacción carragenina-calcio y el cuadrático del tiempo de incubación los factores estadísticamente significativos (Anexo II).

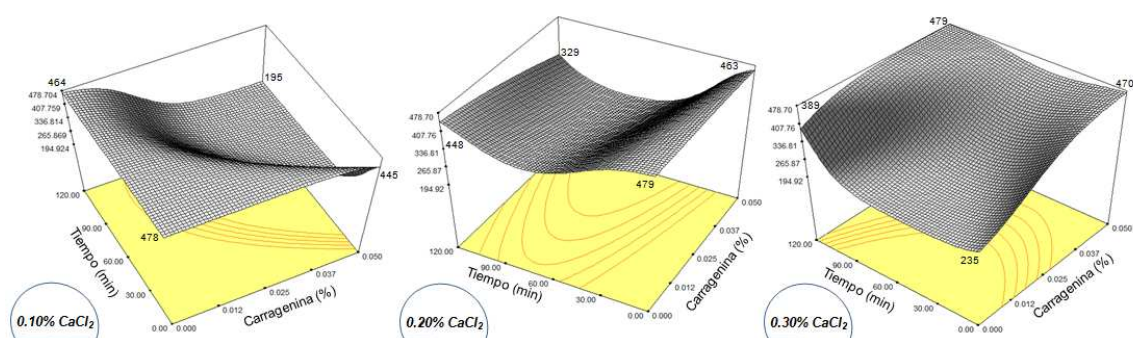


Fig. 32. Superficie de respuesta para la tendencia de gomosidad.

$$\begin{aligned} \text{Logit (Gomosidad)} &= \text{Ln}[(\text{Gomosidad}-194.58)/(478.71-\text{Gomosidad})] \\ &= +17.69 -342.31*\text{Carragenina} -0.21*\text{Tiempo} -64.62*\text{Calcio} +8.26\times 10^{-4}\text{Tiempo}^2 +1499.15 *\text{Carragenina} \\ &\quad *\text{Calcio} +0.44*\text{Tiempo}*\text{Calcio} \end{aligned} \quad (\text{Ec. 9}).$$

### 9.2.10 Gradiente de fuerza

El gradiente de fuerza es la resistencia que ofrece la superficie del material a la penetración. La influencia del tiempo de incubación, contenido de carragenina y concentración de  $\text{CaCl}_2$  en el gradiente de fuerza es mostrada en la figura 33.

Al emplear una concentración de  $\text{CaCl}_2$  de 0.1%, el gradiente de fuerza disminuye al incrementar simultáneamente el contenido de carragenina y el tiempo de incubación. Sin embargo, cuando el tiempo de incubación y la carragenina incrementan bajo contenidos de  $\text{CaCl}_2 > 0.2\%$ , los sitios expuestos por el agente reductor son primeramente ocupados por la reacción de catálisis y formación de enlaces covalentes. Posteriormente, la carragenina comienza a agregarse en hélices para formar la primera red con micelas de caseína y casi a la par con la formación de enlaces reforzadores de calcio durante el enfriamiento del sistema. Es por eso que debido a la metodología establecida (Diagrama 1) se incrementa muy considerablemente el gradiente de fuerza del gel al aumentar el calcio durante su elaboración (Fig 29). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Lucey y Fox (1993), Joshi y *col.* (2004) y Solorza y Bell (1998). Por su parte, la carragenina, molécula sensible a los iones calcio, favorece la interacción entre sus moléculas durante la transición a hélices. Así, el incremento en la densidad de carga negativa en las hélices se vuelve más fuerte, y por consiguiente, su interacción con micelas de caseína también lo es. Como resultado, incrementa la resistencia a la penetración.

La ecuación 10 representa el modelo matemático para esta variable. De acuerdo con el ANOVA (ANEXO III), el modelo mostró un buen ajuste a los datos experimentales ( $P < 0.05$ ), siendo la interacción carragenina-calcio y el cuadrático del tiempo de incubación los factores que más influencia tuvieron.

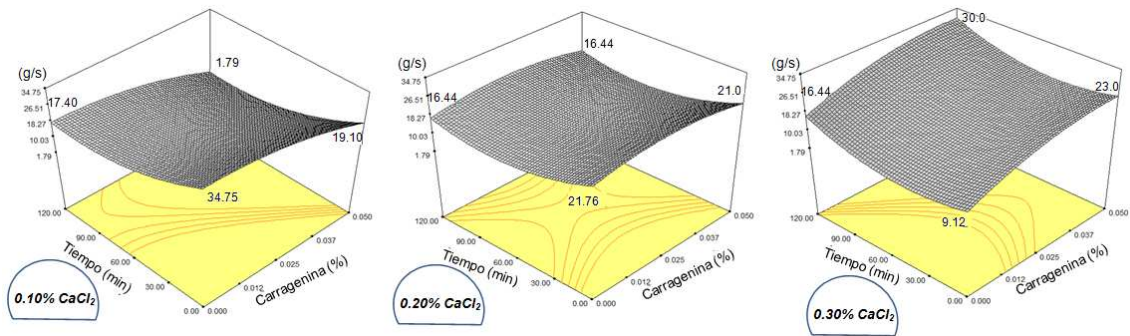


Fig. 33. Superficie de respuesta para el gradiente de fuerza.

$$\text{Gradiente} = +47.47 - 275.97 \cdot \text{Carragenina} - 0.45 \cdot \text{Tiempo} - 127.26 \cdot \text{Calcio} - 6438.51 \cdot \text{Carragenina}^2 - 1.73 \times 10^{-3} \cdot \text{Tiempo}^2 + 2918.94 \cdot \text{Carragenina} \cdot \text{Calcio} + 1.0 \cdot \text{Tiempo} \cdot \text{Calcio} \quad (\text{Ec. 10})$$

### 9.2.11 Pegajosidad.

De acuerdo con la figura 34, la pegajosidad se eleva al incrementar el tiempo de incubación manteniendo una concentración mínima de carragenina y para cualquier concentración de  $\text{CaCl}_2$ . Esto se puede explicar por la retención de humedad en el coágulo. Sin embargo, el comportamiento de esta variable respuesta se revierte si se aumenta la concentración de carragenina. En términos generales, se puede observar que si la cantidad de calcio se incrementa en el sistema, la pegajosidad se reducirá, ya que el calcio favorece la sinéresis del gel (Jaros y *col.*, 2009; Bönisch y *col.*, 2008).

La ecuación 11 muestra el modelo matemático para la variable pegajosidad. El modelo presentó un ajuste moderado a los datos experimentales ( $P \approx 0.05$ ), siendo la concentración de carragenina la variable más significativa, seguida de la interacción carragenina-calcio (ANOVA, Anexo II).

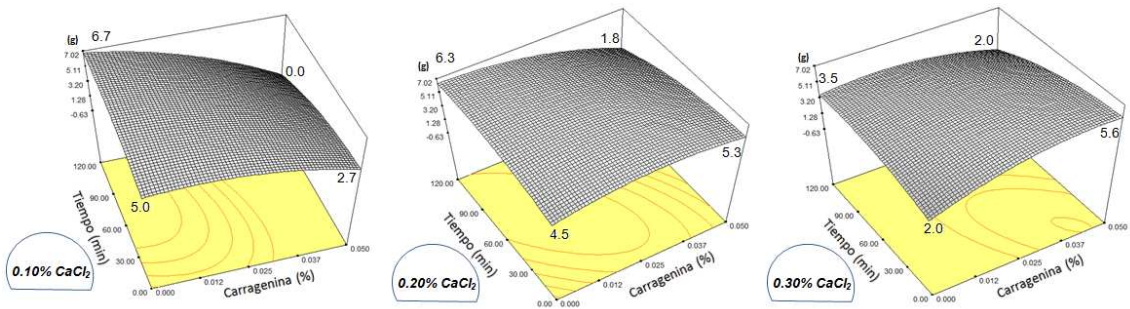


Fig. 34. Superficie de respuesta para la pegajosidad.

$$\text{Pegajosidad} = +3.39 -12.03*\text{Carragenina} +0.41*\text{Tiempo} -29.11*\text{Calcio} -1831.28*\text{Carragenina}^2 -2.28*10^{-4}*\text{Tiempo}^2 -113.01*\text{Calcio}^2 -0.87*\text{Carragenina}*\text{Tiempo} +586.62*\text{Carragenina}*\text{Calcio} \quad (\text{Ec. 11}).$$

### 9.2.12 Microestructura

La figura 35 muestra la microestructura de geles obtenidos bajo distintas condiciones de elaboración. Al parecer no existe una diferencia significativa en cuanto a microestructura entre las muestras control (Fig. 35c) y las muestras de la invención (Fig. 35d). Sin embargo, las muestras que contienen únicamente carragenina (Fig. 35a) presentaron una superficie mayormente lisa que el control. Mientras que las muestras que fueron únicamente incubadas con la enzima (Fig. 35b), presentaron mayor cantidad de porosidades en la red formada, posiblemente por el incremento en la retención de humedad. Cuando las muestras incubadas con transglutaminasa fueron adicionadas con carragenina, pareció desaparecer ligeramente la porosidad de la microestructura (Fig. 35d).

A diferencia de los resultados obtenidos por Mc Mahon (1999), Guinee (2002) y Joshi (2004), en el presente estudio no se pudo distinguir la fase estructural de la proteína y de la grasa por que el método de secado fue distinto. Pero a pesar de esto, McMahon (1999), Guinee (2002) y Joshi (2004) concuerdan con el hecho de que al incrementar la concentración de  $\text{CaCl}_2$  durante la elaboración del gel, se incrementa la interacción entre las partículas de proteína, generando espacios más grandes dentro de la red y columnas de fibras más anchas formadas por el favorecimiento de la interacción entre caseínas. Mientras que los geles con concentraciones más bajas de  $\text{CaCl}_2$  presentaron redes más homogéneas, con espacios más pequeños y mejor distribuidos en el volumen total ocupado por la red.

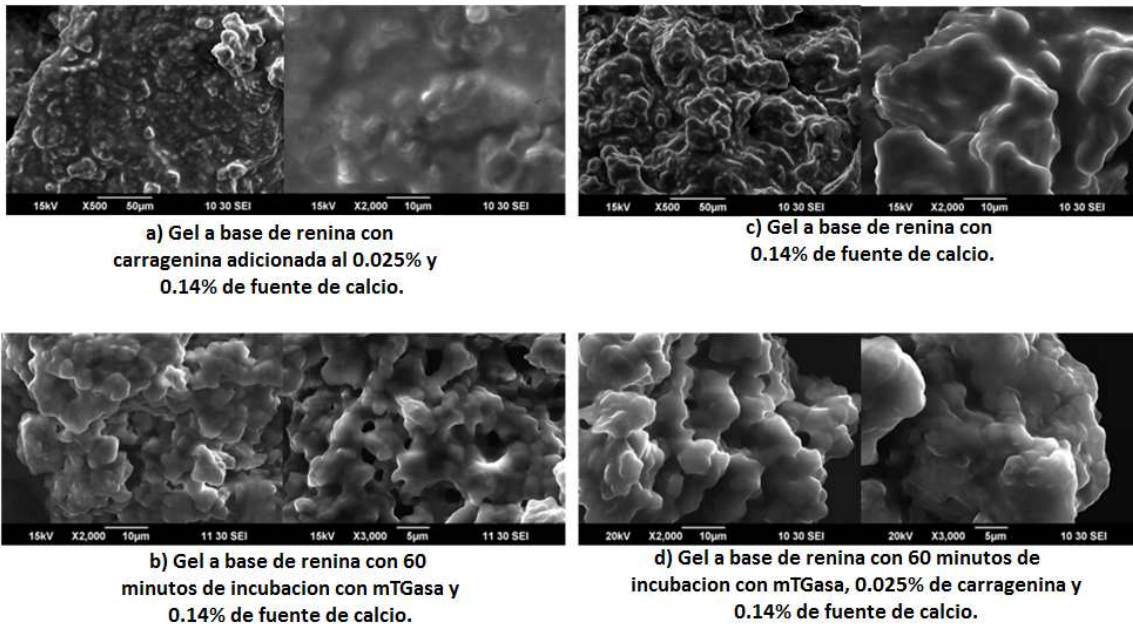


Fig. 35. Microscopia por SEM de diferentes muestras de geles lácteos inducidos por renina.

## Conclusiones

1. La presencia de carragenina y calcio (<0.3%) favorecieron en cierta medida la retención de seroproteínas en el sistema. Por su parte, el tiempo de incubación mostró poca influencia en la retención proteica.
2. Una mayor cantidad de grasa puede ser retenida en el gel con la adición de  $\text{CaCl}_2$  y/o por la adición de carragenina a una concentración no mayor a 0.025%. Por su parte, la incubación con transglutaminasa únicamente desplazó a los glóbulos de grasa hacia el suero.
3. La sinéresis incrementó al aumentar cualquiera de los factores (carragenina, calcio y tiempo de incubación). Sin embargo, la combinación de estos en pequeñas proporciones reducen la sinéresis en comparación con el gel control.
4. La presencia de carragenina en el sistema disminuyó la firmeza del gel en dependencia del tiempo de incubación y de la cantidad de iones calcio. Siendo así que la interacción entre carragenina y  $\text{CaCl}_2$  favorecen la firmeza cuando ambos factores están en incremento. Al tener la combinación de carragenina y tiempo de incubación en su nivel más alto, se incrementó la dureza del coágulo cuando el  $\text{CaCl}_2$  está en el nivel más alto y disminuye dramáticamente al reducir el  $\text{CaCl}_2$ .
5. La cohesividad reduce por el incremento de  $\text{CaCl}_2$  o carragenina por separado. A pesar de esto, cuando ambos factores interactúan entre sí, sucede todo lo contrario. Y cuando todos los factores se encuentran en su nivel alto se incrementa la cohesividad abruptamente.
6. La carragenina por arriba de 0.037% incremento la elasticidad. Así como también se incrementa muy ligeramente cuando el tiempo de incubación no excede de 60 minutos.
7. La adhesividad fue disminuida al incrementar la concentración de  $\text{CaCl}_2$ , así como también el tiempo de incubación por debajo de 60 minutos, y la carragenina cuando el nivel de  $\text{CaCl}_2$  es mínimo. En contraste, incrementa este parámetro con la combinación de carragenina y  $\text{CaCl}_2$ , ambos en su nivel más alto.
8. Al incrementar el porcentaje de  $\text{CaCl}_2$  o carragenina se disminuye la resiliencia. Por otra parte, el incremento en la incubación con transglutaminasa solo modifica este parámetro en presencia de carragenina y en dependencia del calcio presente.

9. Al incrementar la concentración de iones calcio aumentó la gomosidad si se adiciona carragenina en el sistema, y reduce la gomosidad con el incremento en el tiempo de incubación. Además, en la interacción carragenina – tiempo de incubación, la gomosidad es mínima cuando el  $\text{CaCl}_2$  está en el nivel más bajo, y es máxima cuando el  $\text{CaCl}_2$  está en el nivel más alto.
10. El gradiente de fuerza o resistencia a la penetración del gel incrementa con la carragenina cuando el  $\text{CaCl}_2$  está en aumento. Dicho gradiente puede ser también incrementado de forma sinérgica cuando todos los factores se encuentran en el nivel más alto.
11. La pegajosidad disminuye al incrementar el porcentaje de  $\text{CaCl}_2$ , e incrementa al elevar el tiempo de incubación con transglutaminasa. Ambos factores estuvieron en dependencia el uno del otro. La carragenina que también afecta la pegajosidad, estuvo en dependencia del  $\text{CaCl}_2$ .
12. Finalmente, durante la determinación de la micro estructura, se pudo apreciar que los geles con carragenina presentaron una superficie mayormente lisa que el gel control. Mientras que los geles con incubación de transglutaminasa mostraron tener una superficie y micro estructura mayormente porosa. Sin embargo, la combinación entre la superficie lisa de la carragenina y la porosa por el efecto con transglutaminasa dieron como resultado una textura en la superficie con mayor similitud al gel control.

## Bibliografía

1. Akerstrom B., Flower D. R. and Salier J. P. *Lipocalins 2000*. Biochimica et Biophysica Acta. (2000), 1482, 1-356.
2. Badui Dergal S. (1999) *Química de los alimentos*. Ed. Pearson, 114-116, 160-161 y 193-194.
3. Belitz H.-D., Grosch W. and Schieberle P. *Food chemistry*. 4<sup>th</sup> revised and extended edition, Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2009) 498-501.
4. Bonnet Veronique, Duval Raphael, Tran Vinh and Rabiller Claude. *Mono-N-glycosidation of  $\beta$ -Cyclodextrin – Synthesis of 6-( $\beta$ -Cyclodextrinyl-amino)-6-deoxy-D-galactosides and of N-(6-Deoxy- $\beta$ -cyclodextrinyl)-galacto-azapane*. Eur. J. Org. Chem. 2003, 4810-4818.
5. Bönisch Martin P., Heidebach Thomas C. and Kulozik Ulrich. *Influence of transglutaminase protein cross-linking on rennet coagulation of casein*, Food Hydrocolloids 22 (2008) 288-297.
6. Bordignon-Luiz Marilde T., Gauche Cony, Vieira Joana T.C. and Ogliari Paulo J. *Cross linking of milk whey proteins by transglutaminase*. Process Biochemistry 43 (2008) 788-794.
7. Bourne M. C. (1978). *Texture Profile Analysis*. Food Technol., 32 (7), 62-66, 72.
8. Bourne M. C. (1988). *Basic Principles of Food Texture Measurement*. Lecture text of Dough Rheology and Baked Products Texture Workshop - Chicago.
9. Brown Eleanor M., Hernandez-Balada Eduard, Taylor Maryann M., Phillips John G. and Marmer William N. *Properties of biopolymer produced by transglutaminase treatment of whey protein isolate and gelatin*. Bioresource Technology 100 (2009) 3638-3643.
10. Bullens C.W. *Process and Ingredient Effects on the Structure of Reduced-Fat Cheddar Cheese*. FMC Corporation, Food Ingredients Division USA. (1994) 215-218.
11. Charm S. E. (1962). *The Nature and Role of Fluid Consistency in Food Engineering Applications*. Adv. Food Res., 11, 356-435.
12. Corredig M. *Dairy-derived ingredients: Food and nutraceutical uses*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition No. 182. (2009) Chap 15 394-416.
13. Coussons Peter J., Price Nicholas C., Kelly Sharon M., Smith Bryan and Sawyer Lindsay. *Transglutaminase catalyses the modification of glutamine side chains in the C-terminal region of bovine  $\beta$ -lactoglobulin*. Biochem. J. (1995) 283, 803-806.
14. de Jong G.A.H, Wijngaards G. and Koppelman S.J. (2003) *Transglutaminase inhibitor from milk*. Food chemistry and Toxicology, Vol. 68, Nr. 3, 820-825.
15. de Kruif C.G. and Tuinier R. *Polysaccharide protein interactions*. Food Hydrocolloids 15 (2001) 555-563.
16. Dickinson Eric & Babin Helen. *Influence of transglutaminase treatment on the thermoreversible gelation of gelatin*. Food hydrocolloids 15 (2001) 271-276.
17. Doublier J.L., Garnier C., Renard D. and Sanchez C. *Protein-polysaccharide interactions*. Current Opinion in Colloid & Interface Science 5 (2000) 202-2014.
18. Eck Andre. *El queso*. Omega, Barcelona, España (1990).
19. Færgemand M., Otte, J., Qvist K.B. *Enzymatic cross-linking of whey proteins by  $Ca^{2+}$ -independent microbial transglutaminase from *Streptomyces lydicus**. (1997) Food hydrocolloids. 11, 19-25.
20. Færgemand M. & Qvist K.B. *On the importance of using a  $Ca^{2+}$  independent transglutaminase for cross-linking of  $\beta$ -lactoglobulin*. Food hydrocolloids 13 (1999) 199-201.
21. Fox P.F. *Milk proteins: From expression to food. Chap. 1. Milk: An overview*. Ed. By Abby Thompson, Mike Boland and Harjinder Singh. Elsevier science. (2009) 1-36.
22. Friedman Herman H., Whitney James E., and Szczesniak Alina Surmacka. *The texturometer- A new instrument for objective texture measurement*. (1962) J. Food Sci. 28, 390-396.



23. Gerrard Juliet A. *Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications*. Trends in food science & technology 13 (2002) 391-399.
24. Goff H.D., Spagnuolo P.A., Dalgleish D.G. and Morris E.R. *Kappa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers*. Food Hydrocolloids 19 (2005) 371-377.
25. Guinee T.P., Feeney E.P., Auty M.A.E. and Fox P.F. (2002) *Effect of pH and Calcium Concentration on Some Textural and Functional Properties of Mozzarella Cheese*. Journal of Dairy Science 85: 1655-1669.
26. Han Xiao-Qing & Spradlin Joseph Edgar (2000) *Incorporacion de suero en queso procesado*. Patente española 2 246 811.
27. Han Xiao-Qing y Spradlin Joseph Edgar (2000) *Procedimiento de incorporacion de proteinas de suero en queso usando transglutaminasa*. Patente española 2 220 347.
28. Han Xiao-Qing & Spradlin Joseph E. (2001) *Cheese curd made using transglutaminase and non rennet protease*. Patente US 6,242,036 B1.
29. Henry & Joseph. (1986) *Method for making cheese using carrageenan*. Patent WO 86/ 00786.
30. Huppertz T. and de Kruif C.G. *Rennet-induced coagulation of enzymatically cross-linked casein micelles*. Int. Dairy Journal 17 (2007) 442-447.
31. Huppertz T. and de Kruif C.G. *Structure and stability of nanogel particles prepared by internal cross-linking of casein micelles*. Int. Dairy Journal 18 (2008) 556-565.
32. Informacion provista por *Danisco Mexico*.
33. Ipsen Richard & Otte Jeanette (2007) *Self assembly of partially hydrolyzed alpha-lactalbumin*. Biotechnology advances, 25, 602-605.
34. Jaros Doris, Partschefeld Claudia, Henle Thomas and Rohm Harald. *Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications*, Journal of texture studies 37 (2009) 113-155.
35. Jensen E.V. *Sulfhydryl- disulfide interchange*. Science Vol. 130 (1959) 1319-1323.
36. Joshi N.S., Muthukumarappan K. and Dave R.I. (2003) *Understanding the Role of Calcium in Functionality of Part Skim Mozzarella Cheese*. Journal of Dairy Science 86: 1918-1926.
37. Joshi N.S., Muthukumarappan K. and Dave R.I. (2004) *Effect of calcium on microstructure and meltability of part skim mozzarella cheese*. Journal of Dairy Science 87: 1975-1985.
38. Kashiwagi T., Yokoyama K., Ishikawa K., Ono K., Ejima D., Matsui H. and Suzuki E. *Crystal structure of microbial transglutaminase from streptococcus mobaraense*. J. Biol. Chem. (2002) 277, 44252-44260.
39. Kelvin K.T. Goh, Anwasha Sarkar and Harjinder Singh. *Milk proteins: From expression to food. Chap. 12. Milk protein-polysaccharide interactions*. Ed. By Abby Thompson, Mike Boland and Harjinder Singh. Elsevier science. (2009) 347-368.
40. Kunitz M. *Syneresis and Swelling of gelatin*. The journal of general physiology. (1928) 289.
41. Kuraishi Chiya, Sakamoto Jiro and Soeda Takahiko (1997) *Process for producing cheese using transglutaminase*. Patent US 5,681,598.
42. Langendorff V., Cuvelier G., Launay B., Michon C., Parker A. and De Kruif C.G. *Casein micelle/iota carrageenan interactions in milk: influence of temperature*. Food Hydrocolloids 13 (1999) 211-218.
43. Lobato-Caballeros C. & Vernon Carter E.J. *Microstructure and texture of cheese analogs containing different types of fat*. Journal of texture studies 29 (1998) 569-586.
44. Lobato-Caballeros C., Ramirez-Santiago C. and Osorio-Santiago V.J. *Microstructure and Texture of manchego cheese-like products made with canola oil, lipophilic and hydrophilic emulsifiers*. Journal of Texture Studies 33 (2002) 165-182.
45. Lobato-Caballeros C., Ramos-Solis L., Santos-Moreno A. and Rodriguez-Huezo M.E. *Microstructure and texture of panela type cheese-like products: use of low methoxyl pectin and canola oil as milk fat substitutes*. Revista Mexicana de Ingenieria Quimica Vol. 5 (2006) 71-79.

46. Lorenzen P.C. & Schlimme E. *Properties and potential fields of application of transglutaminase preparations in dairying*. Bulletin 332. Brussels, Belgium: International Dairy Federation; (1998), 47-53.
47. Lucey J.A. & Fox P.F. *Importance of Calcium and Phosphate in cheese manufacture: a Review*. Journal of Dairy Science (1993) 76, 1714-1724.
48. Lucey J.A., Munro P.A. and Singh H. *Whey separation in acid skim milk gels made with glucono- $\delta$ -lactone: Effects of heat treatment and gelation temperature*. Journal of Texture Studies (1998) 29, 413-426.
49. Marangoni A.G., Barbut S., McGaully S.E., Marcone M. and Narine S.S. *On the structure of particulate gels: the case of salt-induced cold gelation of heat-denatured whey protein isolate*. Food hydrocolloids 14 (2000) 61-74.
50. Maroziane A. & de Kruijff C.G. *Interaction of pectin and casein micelles*. Food Hydrocolloid (2000) 14, 391-394.
51. Mather I.H. *A review and proposed nomenclature for major milk proteins of the milk fat globule membrane*. Journal of Dairy Science (2000) 83, 203-47.
52. Matz S. A. (1962). *Food Texture*. AVI Publishing Co., Westport, CT.
53. McMahon D.J. and Oberg C.J. *Deconstructing Mozzarella*. Dairy Ind. (1999) Int. 63: 23-26.
54. Mestres L.J., Romero C.S. y Roser. *Productos Lacteos. Tecnologia*. (2004) 26-30.
55. Miranda Espinoza Adela Cristina. *Determinacion de nitrógeno amínico y proteínas por el método de Sorensen*. (1974) Farmacia tesis 197, UNAN.
56. Miwa Noriko, Kumazawa Yoshiyuki, Nakagoshi Hiroyuki and Sakaguchi Shoji (2004) *Method for modifying raw material milk and dairy product prepared by using the modified raw material milk*. Patent US 6,716,461 B2.
57. Monogioudi Evanthia, Creusot Nathalie, Kruus Kristiina, Gruppen Harry, Buchert Johanna and Mattinen Maija-Liisa. *Cross-linking of  $\beta$ -casein by Trichoderma reesei tyrosinase and Streptococcus mobaraense transglutaminase followed by SEC-MALLS*. Food Hydrocolloids 23 (2009) 2008-2015.
58. Montgomery D.C. *Diseño y análisis de experimentos*. 2ª. Ed., México, Limusa Wiley, (2006) 343-347, 456-461.
59. Olsen Robert L. *Effects of Polysaccharides on Rennet Coagulation of Skim Milk Proteins*. (1989) J. Dairy Sci. 72, 1695-1700.
60. Pastorino A.J., Ricks N.P., Hansen C.L. and McMahon D.J. *Effect of calcium and water injection on structure-function relationships of cheese*. (2003) J. Dairy Sci. 86, 1, 105-113.
61. Payens T.A.J. *Light Scattering of Protein Reactivity of Polysaccharides Especially of Carrageenans*. (1971) Research Papers 141-149.
62. Peleg M. (1983). *The semantics of rheology and texture*. Food Technol., 11, 54-61.
63. Pomeranz Y. and Meloan C. E. (1994). *Rheology. Food Analysis: Theory and Practice*, pp. 449-487.
64. Prasad M. and Sundaram V. *Syneresis of sodium oleate gels in organic solvents*. Proceedings Mathematical Science. (1950) 33 (6) 344.
65. Rao V. N. M., Delaney R. A. M. and Skinner G. E. (1995). *Rheological Properties of Solid Foods*. Engineering Properties of Foods - 2nd Rev. Ed, pp. 55-97.
66. Rocha C., Teixeira J.A., Hilliou L., Sampaio P. and Goncalves M.P. *Rheological and structural characterization of gels from whey protein hydrolysates/locust bean gum mixed systems*, Food hydrocolloids 23 (2009) 1734-1745.
67. Siebum Arjan, van Wijk Arjan, Schoevaart Rob and Kieboom Tom. *Galactose oxidase and alcohol oxidase: Scope and limitations for the enzymatic synthesis of aldehydes*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 41 (2006) 141-145.
68. Snoeren Th. H.M., Payens T.A.J., Jeunink J. and Both P. *Electrostatic interaction between  $\kappa$ -carrageenan and  $\kappa$ -casein*. Milchwissenschaft 30 (7) 1975, 393-396.
69. Solorza F.J. & Bell A.E. *The effect of calcium addition on the rheological properties of a soft cheese at various stages of manufacture*. International Journal of Dairy Technology. Vol 51, No. 1. (1998) 23-29.
70. Stainsby G. *Proteinaceous gelling systems and their complexes with polysaccharids*, Food Chemistry 6 (1980) 3-14.

71. Swaisgood, H. E. (1992) *Chemistry of the caseins*. Fox, P. F. (Ed.). *Advanced dairy chemistry - Vol.1 Proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, London - New York, pp 140-176.
72. Szczesniak A. S. (1963). *Classification of textural characteristics*. J. Food Sci, 28, 385-389.
73. Szczesniak A. S., Brandt M. A. and Friedman H. H. (1963). *Development of standard rating scales for mechanical parameters of texture and correlation between the objective and sensory methods for texture evaluation*. J. Food Sci., 28, 397-403.
74. Szczesniak A. S. (1963). *Objective measurements of food texture*. J. Food Sci., 28, 410-420.
75. Szczesniak A. S. (1966). *Texture Measurements*. Food Technol., 20, 50, 55-58.
76. Szczesniak A. S. (1975). *Application of the General Foods texturometer to specific food products*. J. Text. Studies, 6, 117-138.
77. Szczesniak A. S. (1987). *Correlating Sensory with Instrumental Texture Measurements - An Overview of Recent Developments*. J. Text. Studies, 18, 1-15.
78. van Wijk Arjan, Siebum Arjan, Schoevaart Rob and Kieboom Tom. *Enzymatically oxidized lactose and derivatives thereof as potential protein cross-linkers*. Carbohydrate Research 341 (2006) 2921-2926.
79. Veisseyre Roger. *Lactologia Tecnica: Composicion, recogida, tratamiento y transformacion de la leche*. (1988) Acriba, Zaragoza, Espana 376-440.
80. Voragen Alphons G.J., Sperber Bram L.H.M, Schols Henk A., Cohen Stuart Martien A. and Norde Williem. *Influence of the overall charge and local charge density of pectin on the complex formation between pectin and  $\beta$ -lactoglobulin*, Food hydrocolloids 23 (2009) 765-772.
81. Walstra P. *Casein Sub-micelles: Do they exist?* International Dairy Journal (1999) 9, 189-192.
82. Weinbreck Fanny, Nieuwenhuijse Hans, Robijn Gerard W. and de Kruif Cornelis G. *Complexation of whey proteins with carrageenan*. J. Agric. Food Chem. (2004), 52, 3550-3555.
83. Ye A., Tan Y.L., Singh H. and Hemar Y. *Effects of biopolymer addition on the dynamic rheology and microstructure of renneted skim milk systems*. Journal of Texture Studies 38 (2007) 404-422.
84. Ye A. *Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review*. International Journal of Food Science and Technology 43 (2008) 406-415.

## Anexo I

Cuadro 1. DISEÑO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA.

Diseño final, central compuesto 2 <sup>3</sup>									
Corrida	Variables			Respuestas					
	Carragenina (%)	Incubación (min)	Calcio (%)	Pegajosidad (g)	Gradiente de Fuerza (g/seg.)	Dureza (TPA)	Adhesividad (TPA)	Elasticidad (TPA)	Cohesividad (TPA)
1	0.040	95.68	0.14	3.27	10.59	291.98	1.91	1.00	0.67
2	0.040	24.32	0.26	5.21	18.61	514.67	4.24	1.00	0.67
3	0.010	95.68	0.26	5.74	16.82	428.44	2.15	1.00	0.66
4	0.025	60.00	0.20	6.04	15.14	404.16	2.83	1.00	0.66
5	0.010	95.68	0.14	6.90	14.87	504.12	2.72	0.99	0.73
6	0.025	60.00	0.20	6.62	20.02	581.91	2.75	0.99	0.74
7	0.025	60.00	0.30	5.13	17.47	407.24	1.96	1.00	0.68
8	0.050	60.00	0.20	4.20	13.80	415.62	2.15	5.22	0.70
9	0.025	60.00	0.20	6.10	16.57	457.04	3.18	0.99	0.73
10	0.025	0.00	0.20	6.87	29.62	716.73	3.20	1.00	0.67
11	0.010	24.32	0.14	5.91	21.10	571.62	2.61	1.00	0.73
12	0.025	60.00	0.20	7.34	14.58	367.47	2.45	1.00	0.68
13	0.010	24.32	0.26	4.92	13.89	373.23	2.93	1.00	0.68
14	0.040	95.68	0.26	5.69	22.22	553.62	4.73	0.99	0.70
15	0.025	60.00	0.10	5.73	20.63	634.44	2.20	1.00	0.65
16	0.000	60.00	0.20	6.64	15.26	620.24	2.56	1.00	0.70
17	0.040	24.32	0.14	5.63	14.86	465.23	1.88	1.02	0.69
18	0.025	120.00	0.20	4.60	19.96	623.85	3.32	1.00	0.72
Control	0.000	0.00	0.14	6.01	14.22	434.52	4.15	1.00	0.67

Cuadro 2. DISEÑO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA (CONTINUACION).

Diseño final, central compuesto 2 <sup>3</sup>									
Corrida	Variables			Respuestas					
	Carragenina (%)	Incubación (min)	Calcio (%)	Gomosidad (TPA)	Masticabilidad (TPA)	Resiliencia (TPA)	Grasa en suero (%)	Proteína en suero (%)	Sinéresis (%)
1	0.040	95.68	0.14	195.58	194.78	0.41	0.8	1.46	14.3
2	0.040	24.32	0.26	346.05	344.63	0.38	0.7	1.78	12.6
3	0.010	95.68	0.26	282.89	282.89	0.40	0.4	1.50	14.6
4	0.025	60.00	0.20	268.00	266.90	0.39	0.5	1.55	15.4
5	0.010	95.68	0.14	366.90	363.90	0.45	0.7	1.73	15.6
6	0.025	60.00	0.20	429.60	426.08	0.46	0.6	1.55	14.8
7	0.025	60.00	0.30	275.45	274.32	0.41	0.5	1.59	15.2
8	0.050	60.00	0.20	292.42	1525.63	0.42	0.8	1.68	13.8
9	0.025	60.00	0.20	331.93	329.21	0.44	0.5	1.73	14.4
10	0.025	0.00	0.20	477.71	475.75	0.38	0.4	1.59	10.9
11	0.010	24.32	0.14	417.53	415.82	0.45	0.7	1.68	12.0
12	0.025	60.00	0.20	250.13	249.11	0.40	0.6	1.64	14.3
13	0.010	24.32	0.26	253.74	254.78	0.41	0.5	1.64	15.0
14	0.040	95.68	0.26	386.76	383.59	0.41	0.5	1.59	9.6
15	0.025	60.00	0.10	414.34	412.64	0.39	0.6	1.68	9.8
16	0.000	60.00	0.20	436.66	434.87	0.42	0.5	1.87	13.3
17	0.040	24.32	0.14	320.59	325.85	0.42	0.6	1.55	14.5
18	0.025	120.00	0.20	447.11	447.11	0.42	0.7	1.78	13.8
Control	0.000	0.00	0.14	291.38	290.18	0.38	0.7	1.68	15.0

## Anexo II

Cuadro 3. ANOVA REDUCIDO A MODELO CUADRATICO PARA LA SUPERFICIE DE RESPUESTA DE LA PROTEINA PERDIDA EN EL SUERO.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	0.10	7	0.015	1.56	0.2536	
Residual	0.094	10	9.411E-03			
Lack of Fit	0.072	7	0.010	1.38	0.4307	
Pure Error	0.022	3	7.425E-03			
Cor Total	0.20	17				
Root MSE	0.097	R-Squared	0.5214			
Dep Mean	1.64	Adj R-Square	0.1863			
C.V.	5.90	Pred R-Squar	-0.9992			
PRESS	0.39	Adeq Precisis	4.551	Desire > 4		
Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	t for Ho	Prob >  t	VIF
Intercept	1.61	1	0.030			
A-Carragenin:	-0.036	1	0.026	-1.37	0.2020	1.00
B-Tiempo	-3.695E-03	1	0.026	-0.14	0.8909	1.00
C-Calcio	-4.493E-03	1	0.026	-0.17	0.8675	1.00
A <sup>2</sup>	0.038	1	0.026	1.45	0.1769	1.00
AB	-0.024	1	0.034	-0.69	0.5044	1.00
AC	0.079	1	0.034	2.30	0.0446	1.00
BC	-0.036	1	0.034	-1.06	0.3154	1.00

Cuadro 4. ANOVA REDUCIDO A MODELO CUADRATICO PARA LA SUPERFICIE DE RESPUESTA DE GRASA PERDIDA EN SUERO.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	0.18	6	0.030	4.09	0.0210	
Residual	0.080	11	7.250E-03			
Lack of Fit	0.070	8	8.719E-03	2.62	0.2313	
Pure Error	1.000E-02	3	3.333E-03			
Cor Total	0.26	17				
Root MSE	0.085	R-Squared	0.6906			
Dep Mean	0.59	Adj R-Square	0.5219			
C.V.	14.46	Pred R-Squar	-0.0352			
PRESS	0.27	Adeq Precisis	6.967	Desire > 4		
Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	t for Ho	Prob >  t	VIF
Intercept	0.56	1	0.027			
A-Carragenin:	0.059	1	0.023	2.56	0.0267	1.00
B-Tiempo	0.030	1	0.023	1.29	0.2250	1.00
C-Calcio	-0.064	1	0.023	-2.76	0.0186	1.00
A <sup>2</sup>	0.039	1	0.023	1.70	0.1172	1.00
AC	0.038	1	0.030	1.25	0.2388	1.00
BC	-0.062	1	0.030	-2.08	0.0621	1.00

Cuadro 5. ANOVA REDUCIDO A MODELO CUADRATICO PARA LA SUPERFICIE DE RESPUESTA DE SINERESIS.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	33.32	8	4.16	1.52	0.2725	
Residual	24.66	9	2.74			
Lack of Fit	23.95	6	3.99	16.83	0.0207	
Pure Error	0.71	3	0.24			
Cor Total	57.98	17				
Root MSE	1.66		R-Squared	0.5746		
Dep Mean	13.55		Adj R-Square	0.1965		
C.V.	12.21		Pred R-Square	-1.6957		
PRESS	156.30		Adeq Precisc	4.356	Desire > 4	
Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	t for Ho	Prob >  t	VIF
Intercept	14.44	1	0.66			
A-Carragenini	-0.39	1	0.45	-0.87	0.4066	1.00
B-Tiempo	0.36	1	0.45	0.81	0.4398	1.00
C-Calcio	0.33	1	0.45	0.73	0.4834	1.00
B <sup>2</sup>	-0.61	1	0.46	-1.34	0.2123	1.03
C <sup>2</sup>	-0.56	1	0.46	-1.22	0.2527	1.03
AB	-0.80	1	0.59	-1.36	0.2061	1.00
AC	-1.06	1	0.59	-1.82	0.1029	1.00
BC	-0.88	1	0.59	-1.50	0.1680	1.00

Cuadro 6. ANOVA REDUCIDO A MODELO CUADRATICO PARA LA SUPERFICIE DE RESPUESTA DE DUREZA TPA, CON UNA TRANSFORMACION DEL MODELO A LOGIT.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	56.71	9	6.30	1.63	0.2502	
Residual	30.84	8	3.85			
Lack of Fit	27.95	5	5.59	5.79	0.0895	
Pure Error	2.89	3	0.96			
Cor Total	87.54	17				
Root MSE	1.96		R-Squared	0.6477		
Dep Mean	-0.085		Adj R-Square	0.2514		
C.V.	-2314.59		Pred R-Square	-1.5231		
PRESS	220.88		Adeq Precisc	5.677	Desire > 4	
Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	t for Ho	Prob >  t	VIF
Intercept	-0.44	1	0.98			
A-Carragenini	-0.58	1	0.53	-1.08	0.3098	1.00
B-Tiempo	-0.98	1	0.53	-1.84	0.1035	1.00
C-Calcio	9.531E-03	1	0.53	0.018	0.9861	1.00
A <sup>2</sup>	-0.26	1	0.55	-0.47	0.6491	1.08
B <sup>2</sup>	0.97	1	0.55	1.77	0.1156	1.08
C <sup>2</sup>	-0.24	1	0.55	-0.44	0.6718	1.08
AB	-0.67	1	0.69	-0.96	0.3642	1.00
AC	1.23	1	0.69	1.77	0.1150	1.00
BC	0.92	1	0.69	1.33	0.2194	1.00

Cuadro 7. ANOVA REDUCIDO A MODELO CUADRATICO PARA LA SUPERFICIE DE RESPUESTA DE COHESIVIDAD TPA.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	5.479E-03	9	6.088E-04	0.70	0.6951	
Residual	6.920E-03	8	8.650E-04			
Lack of Fit	3.086E-03	5	6.172E-04	0.48	0.7772	
Pure Error	3.834E-03	3	1.278E-03			
Cor Total	0.012	17				
Root MSE	0.029		R-Squared	0.4419		
Dep Mean	0.69		Adj R-Square	-0.1860		
C.V.	4.25		Pred R-Squar	-1.5047		
PRESS	0.031		Adeq Precisis	2.654	Desire > 4	
Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	t for Ho	Prob >  t	VIF
Intercept	0.70	1	0.015			
A-Carragenin:	-4.979E-03	1	7.958E-03	-0.63	0.5490	1.00
B-Tiempo	5.132E-03	1	7.958E-03	0.64	0.5371	1.00
C-Calcio	-4.929E-03	1	7.958E-03	-0.62	0.5529	1.00
A <sup>2</sup>	1.808E-03	1	8.269E-03	0.22	0.8324	1.08
B <sup>2</sup>	-2.434E-03	1	8.269E-03	-0.29	0.7760	1.08
C <sup>2</sup>	-0.012	1	8.269E-03	-1.47	0.1797	1.08
AB	3.750E-03	1	0.010	0.36	0.7277	1.00
AC	0.016	1	0.010	1.56	0.1567	1.00
BC	3.500E-03	1	0.010	0.34	0.7451	1.00

Cuadro 8. ANOVA REDUCIDO A MODELO CUADRATICO PARA LA SUPERFICIE DE RESPUESTA DE ELASTICIDAD TPA.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	9.84	6	1.64	2.59	0.0818	
Residual	6.98	11	0.63			
Lack of Fit	6.98	8	0.87	1.635E+05	< 0.0001	
Pure Error	1.600E-05	3	5.333E-06			
Cor Total	16.82	17				
Root MSE	0.80		R-Squared	0.5852		
Dep Mean	1.23		Adj R-Square	0.3589		
C.V.	64.66		Pred R-Squar	-0.9278		
PRESS	32.42		Adeq Precisis	6.014	Desire > 4	
Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	t for Ho	Prob >  t	VIF
Intercept	1.03	1	0.40			
A-Carragenin:	0.52	1	0.22	2.41	0.0343	1.00
B-Tiempo	-1.851E-03	1	0.22	-8.587E-03	0.9933	1.00
C-Calcio	-5.858E-04	1	0.22	-2.718E-03	0.9979	1.00
A <sup>2</sup>	0.59	1	0.22	2.62	0.0240	1.08
B <sup>2</sup>	-0.16	1	0.22	-0.71	0.4906	1.08
C <sup>2</sup>	-0.16	1	0.22	-0.72	0.4888	1.08

Cuadro 9. ANOVA REDUCIDO A MODELO CUADRATICO PARA LA SUPERFICIE DE RESPUESTA DE ADHESIVIDAD TPA, CON UNA TRANSFORMACION INVERSA DEL MODELO.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	0.11	7	0.015	3.66	0.0316	
Residual	0.042	10	4.184E-03			
Lack of Fit	0.037	7	5.338E-03	3.58	0.1610	
Pure Error	4.488E-03	3	1.490E-03			
Cor Total	0.15	17				
Root MSE	0.065		R-Squared	0.7193		
Dep Mean	0.39		Adj R-Square	0.5229		
C.V.	16.78		Pred R-Squar	-0.2133		
PRESS	0.18		Adeq Precisis	5.747	Desire > 4	
Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	t for Ho	Prob >  t	VIF
Intercept	0.36	1	0.032			
A-Carragenin:	5.473E-03	1	0.018	0.31	0.7609	1.00
B-Tiempo	4.116E-03	1	0.018	0.24	0.8188	1.00
C-Calcio	-0.034	1	0.018	-1.92	0.0833	1.00
A <sup>2</sup>	0.018	1	0.018	1.01	0.3380	1.08
B <sup>2</sup>	-0.024	1	0.018	-1.34	0.2089	1.08
C <sup>2</sup>	0.038	1	0.018	2.09	0.0633	1.08
AC	-0.083	1	0.023	-3.64	0.0045	1.00

Cuadro 10. ANOVA REDUCIDO A MODELO CUADRATICO PARA LA SUPERFICIE DE RESPUESTA DE RESILIENCIA TPA.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	3.834E-03	8	4.793E-04	0.72	0.6738	
Residual	6.001E-03	9	6.668E-04			
Lack of Fit	2.825E-03	6	4.708E-04	0.44	0.8170	
Pure Error	3.177E-03	3	1.059E-03			
Cor Total	9.836E-03	17				
Root MSE	0.026		R-Squared	0.3899		
Dep Mean	0.41		Adj R-Square	-0.1525		
C.V.	6.22		Pred R-Squar	-1.4537		
PRESS	0.024		Adeq Precisis	2.398	Desire > 4	
Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	t for Ho	Prob >  t	VIF
Intercept	0.42	1	0.010			
A-Carragenini	-6.497E-03	1	6.988E-03	-0.93	0.3767	1.00
B-Tiempo	7.129E-03	1	6.988E-03	1.02	0.3342	1.00
C-Calcio	-7.426E-03	1	6.988E-03	-1.06	0.3156	1.00
B <sup>2</sup>	-5.906E-03	1	7.100E-03	-0.83	0.4270	1.03
C <sup>2</sup>	-7.143E-03	1	7.100E-03	-1.01	0.3406	1.03
AB	4.000E-03	1	9.130E-03	0.44	0.6716	1.00
AC	8.750E-03	1	9.130E-03	0.96	0.3629	1.00
BC	3.500E-03	1	9.130E-03	0.38	0.7103	1.00

Cuadro 11. ANOVA REDUCIDO A MODELO CUADRATICO PARA LA SUPERFICIE DE RESPUESTA DE GOMOSIDAD TPA, CON UNA TRANSFORMACION DEL MODELO A LOGIT.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	50.59	6	8.43	2.78	0.0675	
Residual	33.36	11	3.03			
Lack of Fit	28.02	8	3.50	1.97	0.3120	
Pure Error	5.33	3	1.78			
Cor Total	83.94	17				
Root MSE	1.74		R-Squared	0.6026		
Dep Mean	0.15		Adj R-Square	0.3859		
C.V.	1136.28		Pred R-Squar	-0.4460		
PRESS	121.39		Adeq Precisis	6.814	Desire > 4	
Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	t for Ho	Prob >  t	VIF
Intercept	-0.64	1	0.54			
A-Carragenini	-0.63	1	0.47	-1.34	0.2073	1.00
B-Tiempo	-0.82	1	0.47	-1.73	0.1115	1.00
C-Calcio	-0.053	1	0.47	-0.11	0.9117	1.00
B <sup>2</sup>	1.05	1	0.47	2.23	0.0475	1.00
AC	1.33	1	0.62	2.15	0.0544	1.00
BC	0.93	1	0.62	1.51	0.1599	1.00

Cuadro 12. ANOVA REDUCIDO A MODELO CUADRATICO PARA LA SUPERFICIE DE RESPUESTA DEL GRADIENTE DE FUERZA.



Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	230.40	7	32.91	3.92	0.0256
Residual	83.91	10	8.39		
Lack of Fit	65.97	7	9.42	1.58	0.3841
Pure Error	17.94	3	5.98		
Cor Total	314.31	17			
Root MSE	2.90		R-Squared	0.7330	
Dep Mean	17.56		Adj R-Square	0.5461	
C.V.	16.50		Pred R-Square	-0.0096	
PRESS	317.33		Adeq Precisk	7.609	Desire > 4

Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	t for Ho	Prob >  t	VIF
Intercept	16.96	1	1.15			
A-Carragenini	-0.21	1	0.78	-0.27	0.7945	1.00
B-Tiempo	-1.48	1	0.78	-1.89	0.0883	1.00
C-Calcio	0.35	1	0.78	0.45	0.6627	1.00
A <sup>2</sup>	-1.42	1	0.80	-1.79	0.1043	1.03
B <sup>2</sup>	2.20	1	0.80	2.77	0.0199	1.03
AC	2.58	1	1.02	2.52	0.0304	1.00
BC	2.13	1	1.02	2.08	0.0644	1.00

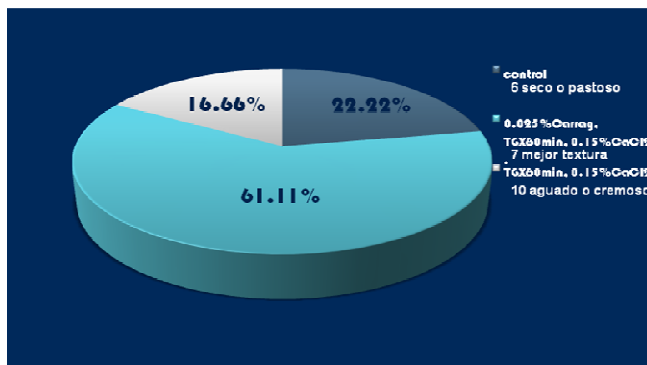
Cuadro 13. ANOVA REDUCIDO A MODELO CUADRATICO PARA LA SUPERFICIE DE RESPUESTA DE PEGAJOSIDAD.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	13.17	8	1.65	3.02	0.0602
Residual	4.91	9	0.55		
Lack of Fit	3.82	6	0.64	1.76	0.3444
Pure Error	1.09	3	0.36		
Cor Total	18.08	17			
Root MSE	0.74		R-Squared	0.7284	
Dep Mean	5.70		Adj R-Square	0.4869	
C.V.	12.97		Pred R-Square	-0.2242	
PRESS	22.14		Adeq Precisk	5.924	Desire > 4

Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	t for Ho	Prob >  t	VIF
Intercept	6.53	1	0.37			
A-Carragenini	-0.57	1	0.20	-2.85	0.0192	1.00
B-Tiempo	-0.29	1	0.20	-1.43	0.1870	1.00
C-Calcio	-0.085	1	0.20	-0.42	0.6813	1.00
A <sup>2</sup>	-0.40	1	0.21	-1.95	0.0832	1.08
B <sup>2</sup>	-0.29	1	0.21	-1.40	0.1950	1.08
C <sup>2</sup>	-0.40	1	0.21	-1.92	0.0866	1.08
AB	-0.46	1	0.26	-1.76	0.1122	1.00
AC	0.52	1	0.26	1.99	0.0784	1.00

### Aceptación por consumidores con muestras aleatorias:



Estudio no específico, realizado a 18 personas.

