

T.D. 467

INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD DE VALENCIA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES

Nº Registra 13152
DATA 4-2-99
SIGNATURA Biblioteca
Nº LISIS: R: 18625423

29'5 cm.

Químicas
T. D.
467

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
REGISTRE GENERAL
ENTRADA

18 NOV. 1999

N.º 147.172 (3248)
HORA
OFICINA AUXILIAR P.O. 1. 10

**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE GELATINA SOBRE EL
COMPORTAMIENTO REOLÓGICO EN SISTEMAS LÁCTEOS**

TESIS DOCTORAL
Ana Salvador Alcaraz
Valencia, 1998



UMI Number: U607190

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607190

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



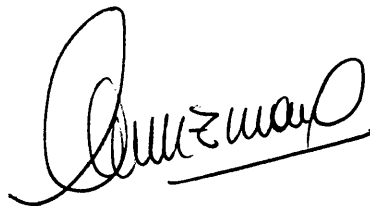
ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

Dra. SUSANA FISZMAN DAL SANTO, Colaborador Científico del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (Valencia), del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

HACE CONSTAR:

Que el presente trabajo titulado: **“Efecto de la adición de gelatina sobre el comportamiento reológico en sistemas lácteos”**, ha sido realizado bajo su dirección por la Lda. en Ciencias Químicas Ana Salvador Alcaraz, en el Departamento de Conservación y Calidad de Alimentos del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) (CSIC).

Valencia, Noviembre 1998

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Susana Fiszman', written in a cursive style with a horizontal line underneath.

Fdo. Susana Fiszman

*A Jose Miguel
A mis padres*

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todos aquellos que, de manera directa o indirecta, han hecho posible la realización de este trabajo.

En primer lugar, a mi directora Susana Fiszman, por haber dedicado su tiempo y esfuerzo en este trabajo, así como su dedicación e interés por mi formación, además de su amistad y confianza.

También he de mencionar al resto de compañeros del laboratorio, Luis y Elvira, Carlos, Vicenta, M^aLuisa e Inmaculada, por su inestimable ayuda y apoyo.

A todos mis amigos del Departamento y, en especial, a Amparo, Montse García, Montse Pons, M^aHelena, Elisa, Mariola, Javi, Ajo, M^aCarmen, Paco, Pilar y M^aJosé, por haber disfrutado de su compañía y de su apoyo en todo momento.

A mis padres, mis hermanas y, en especial, a Jose, por su ayuda y ánimo durante todo este tiempo.

A la empresa SKW-Biosystems, S.A. por su colaboración y, en especial, al Dr. Roberto Xalabarder por su interés y ayuda durante la realización del trabajo.

Finalmente agradezco al Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos por poner a mi disposición todos los medios necesarios para realizar este trabajo y al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Justificación del tema	3
1.2. Objetivos	5
2. ANTECEDENTES	7
2.1. Gelatina: Características y aplicaciones	9
2.1.1. Tipos de gelatina según su obtención	9
2.1.2. Mecanismo de gelificación	10
2.1.3. Propiedades funcionales	13
2.1.3.1. Fuerza de gel	13
2.1.3.2. Viscosidad	14
2.1.3.3. pH	14
2.1.3.4. Punto isoeléctrico	14
2.1.3.5. Punto de fusión	15
2.1.3.6. Punto de gelificación	15
2.1.4. Aplicaciones de la gelatina en la industria alimentaria	15
2.2. Aspectos fundamentales de la Reología	17
2.2.1. Modelos matemáticos que describen el comportamiento viscoelástico de los materiales	18
2.2.1.1. Modelo de Maxwell	18
2.2.1.2. Modelo de Kelvin-Voigt	19
2.2.1.3. Modelo de Burgers	21
2.2.2. Ensayos estáticos	23
2.2.2.1. Ensayos de relajación	23
2.2.2.2. Ensayos de fluencia	26
2.2.3. Ensayos dinámicos	28
2.2.3.1. Modelo desarrollado para un elemento elástico	29
2.2.3.2. Modelo desarrollado para un elemento viscoso	29
2.2.3.3. Modelo de Maxwell	30
2.2.3.4. Modelo de Kelvin-Voigt	30
2.2.3.5. Modelo desarrollado para muestras reales viscoelásticas	30
2.2.3.6. Realización de los ensayos dinámicos	32

3. OBTENCIÓN DE GELES DE GELATINA EN LECHE MEDIANTE ACIDIFICACIÓN DIRECTA	37
3.1. Introducción	39
3.1.1. Descripción y características de la leche	39
3.1.2. Obtención de productos lácteos gelificados	41
3.1.2.1. Acidificación enzimática	42
3.1.2.2. Acidificación directa	42
3.1.3. La gelatina como ingrediente en los productos lácteos	46
3.2. Materiales y Métodos	47
3.2.1. Materia prima	47
3.2.2. Reconstitución de la leche	47
3.2.3. Preparación de geles en frío	47
3.2.3.1. Preparación de la leche acidificada	47
3.2.3.2. Preparación de los geles en agua y en leche	47
3.2.4. Preparación de geles en caliente	48
3.2.4.1. Preparación de las disoluciones de gelatina	48
3.2.4.2. Preparación de los geles	48
3.2.5. Medida del pH	50
3.2.6. Análisis reológicos a grandes deformaciones	50
3.2.6.1. Ensayos de penetración	50
3.2.6.2. Ensayos de compresión: Análisis de perfil de textura	53
3.2.7. Análisis reológicos a pequeñas deformaciones	54
3.2.7.1. Determinación de la región lineal viscoelástica	55
3.2.7.2. Ensayo de cinética de maduración	55
3.2.7.3. Ensayo de barrido de temperaturas: determinación de la temperatura de fusión	56
3.2.8. Análisis estadístico	56
3.3. Resultados y Discusión	57
3.3.1. Geles ácidos obtenidos en frío	57
3.3.1.1. Análisis del comportamiento de los geles mediante ensayos reológicos a grandes deformaciones	58
3.3.1.1.1. Determinación de la fuerza Bloom y de la fuerza en el punto de rotura	58
3.3.1.1.2. Análisis de perfil de textura instrumental (TPA)	62
3.3.1.2. Análisis del comportamiento de los geles mediante ensayos reológicos a pequeñas deformaciones	66

3.3.1.2.1. Estudio de la cinética de maduración	66
3.3.1.2.2. Influencia del pH, tipo y concentración de gelatina. Mecanismo de maduración	67
3.3.1.2.3. Predicción del comportamiento de los geles después del período de maduración	71
3.3.1.2.4. Dependencia del módulo de elasticidad con la concentración de gelatina	72
3.3.1.2.5. Determinación de la temperatura de fusión	74
3.3.2. Geles ácidos obtenidos en caliente	75
3.3.2.1. Análisis del comportamiento de los geles mediante ensayos reológicos a grandes deformaciones	75
3.3.2.1.1. Determinación de la fuerza Bloom y de la fuerza en el punto de rotura	75
3.3.2.1.2. Análisis de perfil de textura instrumental (TPA)	78

4. OBTENCIÓN DE GELES DE GELATINA EN LECHE MEDIANTE FERMENTACIÓN LÁCTICA **82**

4.1. Introducción **83**

4.1.1. Etapas fundamentales en la fabricación del yogur	84
4.1.2. La consistencia como parámetro de calidad en el yogur	86
4.1.3. Uso de aditivos en el yogur	87
4.1.4. Adición de sólidos lácteos	90

4.2. Materiales y Métodos **91**

4.2.1. Materia prima	91
4.2.2. Preparación del yogur	91
4.2.3. Determinación de la acidez de las muestras	93
4.2.4. Determinación del grado de sinéresis	94
4.2.5. Análisis del comportamiento de los geles mediante ensayos reológicos a grandes deformaciones: ensayos de penetración	94
4.2.6. Análisis del comportamiento de los geles mediante ensayos reológicos a pequeñas deformaciones	95
4.2.6.1. Determinación de la región lineal viscoelástica	96
4.2.6.2. Determinación de la temperatura de formación del gel	96
4.2.6.3. Cinética de maduración	96
4.2.6.4. Espectro mecánico	97
4.2.7. Análisis estadístico	97

4.3. Resultados y Discusión	98
4.3.1. Determinación de la acidez	98
4.3.2. Determinación de la sinéresis	101
4.3.3. Análisis del comportamiento de los geles mediante ensayos reológicos a grandes deformaciones: ensayos de penetración	102
4.3.3.1. Estudio del perfil de las curvas de penetración	102
4.3.4. Análisis del comportamiento de los geles mediante ensayos reológicos a pequeñas deformaciones	106
4.3.4.1. Valor del pH obtenido en las muestras preparadas en el reómetro	106
4.3.4.2. Determinación de la temperatura de formación del gel	107
4.3.4.3. Cinética de maduración	109
4.3.4.4. Espectro mecánico	111
5. CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA POR CRYO-SEM DE LOS GELES DE GELATINA EN LECHE	113
5.1. Introducción	115
5.2. Materiales y Métodos	115
5.3. Resultados y Discusión	116
5.3.1. Geles ácidos obtenidos en frío	116
5.3.2. Geles inducidos por acidez obtenidos en caliente	116
5.3.3. Geles obtenidos mediante fermentación láctica	117
6. CONCLUSIONES	127
7. BIBLIOGRAFÍA	131

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

Las nuevas tendencias en alimentación hacen prever que en los próximos años tanto en España como en el resto de Europa, se ampliarán de modo espectacular los mercados para los productos elaborados, precocinados y listos para consumir. Así mismo, cada vez con más frecuencia los consumidores se interesan por alimentos más sanos y seguros, en los que se exige un bajo contenido calórico, bajo contenido en colesterol, menos cantidad de azúcares cariogénicos, etc.

También han variado las tecnologías aplicadas a los métodos de cocción, calentamiento y recalentamiento, tanto en la industria (calentamiento óhmico, altas presiones) como en el hogar (microondas) por lo que el desarrollo de formulaciones de alimentos debe adaptarse a ellas y conferir al producto acabado las propiedades funcionales que el consumidor espera del tradicional.

La sustitución de ingredientes tradicionales para conseguir estos fines suele llevar aparejados principalmente problemas de falta de estabilidad y pérdida de textura. El desarrollo de nuevas formulaciones para alimentos y en especial, en el grupo de los derivados lácteos, helados, postres, yogures, etc. que satisfagan estas demandas lleva implícito el doble reto de proporcionar texturas adecuadas y aditivos naturales alternativos.

Los hidrocoloides formadores de geles (pectinas, carragenatos, gelatinas, alginatos, entre otros) constituyen la alternativa más interesante, ya que debido a sus propiedades funcionales son capaces de reforzar estructuras, retener agua, estabilizar espumas y emulsiones y conferir cuerpo. Existen diversos hidrocoloides con capacidad de formar geles entre los que varían los mecanismos de formación y las condiciones de gelificación (Fizman, 1989). Las características finales de cada sistema serán dependientes de dichas condiciones. Este es un primer aspecto en la selección de un hidrocoloide para su utilización en una determinada aplicación. Sin embargo, existen otros factores que modifican las propiedades funcionales de los sistemas gelificados, entre ellos, la presencia de diversos ingredientes, sales, azúcares, proteínas, etc. (Dickinson, 1993; Fizman y Durán, 1989 y 1992). El estudio de las interacciones de los agentes espesantes (conocidos como hidrocoloides) entre sí o con las proteínas de la leche, es fundamental para la obtención de nuevas texturas. De todos los ingredientes que se pueden utilizar en la preparación de postres lácteos, la gelatina podría jugar un papel muy importante debido a sus propiedades funcionales (agente gelificante, estabilizante, espumante, se dispersa fácilmente en agua y es compatible con otros hidrocoloides presentes en los productos lácteos). La compatibilidad de la gelatina con las proteínas de la leche hace que su uso esté recomendado en la literatura comercial como ingrediente funcional en la preparación de una amplia gama de productos con diferentes texturas, aunque su aplicación en la actualidad es limitada.

La textura, justamente, es uno de los factores que más influyen en la calidad final de los alimentos elaborados. La calidad y aceptabilidad están muy influenciadas por las propiedades texturales. Éstas son extremadamente complejas y son dependientes de muchos efectos que están interrelacionados (Sánchez, 1996).

El estudio reológico de los alimentos y la medida objetiva de las propiedades texturales de los mismos continúa siendo un problema de capital importancia para los tecnólogos de alimentos.

La medida de la textura (dureza, fibrosidad, viscosidad y otras características) es importante por sí misma dado que la textura es valorada de forma subjetiva por el consumidor; pero también hay que tener en consideración el hecho de que la textura de los alimentos está fuertemente relacionada con el aroma y el sabor, color y otros factores que determinan la calidad de los alimentos frescos o cocinados. Debido a que la textura de los alimentos está constituida por muchas variables, es imposible obtener un índice general de medida de la misma. En general, son las propiedades mecánicas de los alimentos las que se estudian y miden para conocer la textura de los mismos. Se han desarrollado un gran número de instrumentos para medir las características mecánicas de los alimentos, que se centran sobre todo en la realización de pruebas de compresión.

También es importante en algunos casos, conocer las propiedades reológicas de los alimentos fluidos y semisólidos para el diseño de procesos de flujo, en control de calidad, en las mediciones de estabilidad en almacenamiento y proceso y en la comprensión y designación subjetiva de atributos de textura de alimentos (Davis, 1973).

Muchos productos lácteos, al igual que otros, presentan conjuntamente propiedades de flujo viscoso y sólido elástico, denominándose viscoelásticos. El conocimiento de las propiedades viscoelásticas es muy útil en el diseño y predicción de la estabilidad de muestras almacenadas. Éstas se pueden estudiar de diferentes modos. Uno de ellos, que en la actualidad está alcanzando gran importancia, es la realización de ensayos oscilatorios. En éstos se aplica una deformación o velocidad de deformación de forma oscilatoria continua, lo que hace que aparezca una onda sinusoidal de esfuerzos. Para los sólidos elásticos esta onda está en fase con la deformación aplicada; mientras que para un fluido viscoso perfecto existe un desfase de 90° . En los materiales viscoelásticos el ángulo de desfase está comprendido entre 0 y 90° . Los ensayos que se realizan con mayor frecuencia son el estudio de la cinética, la determinación del espectro mecánico y, en algunos casos como la gelatina, la determinación de la temperatura de fusión o gelificación del gel formado.

1.2. OBJETIVOS

El objetivo principal del trabajo es el estudio de la influencia de la gelatina en las características reológicas y texturales de diversos geles ácidos de leche.

Para la consecución de dicho fin se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- Estudio del efecto de la adición de gelatina en geles de leche preparados con acidificación directa con glucono- δ -lactona en frío (10°C). Análisis del efecto del pH, concentración y tipo de gelatina, así como del mecanismo de formación del gel.
- Estudio del efecto de la adición de gelatina en geles de leche preparados con acidificación directa con glucono- δ -lactona en caliente (90°C). Análisis del efecto del pH, concentración y tipo de gelatina.
- Estudio del efecto de la adición de gelatina en geles de leche (tipo yogur) preparados mediante fermentación tradicional utilizando fermentos lácticos compuestos por *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Análisis de efecto de la presencia de sólidos lácteos agregados y de la concentración de gelatina, así como del mecanismo de formación del gel.

Con el objeto de estudiar de modo comparativo la estructura interna de todos los geles de leche obtenidos en el presente trabajo, se va a realizar una caracterización microscópica de algunas muestras mediante la técnica de Criomicroscopía Electrónica de barrido (Cryo-SEM).

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1. GELATINA. CARACTERÍSTICAS Y APLICACIONES

2.1.1. Tipos de gelatina según su obtención

La gelatina es una proteína derivada del colágeno presente principalmente en la piel, en el tejido conectivo y en los huesos de los animales. El nombre gelatina empezó a usarse por el año 1700 y se deriva de la palabra latina “*gelatus*” que significa “firme o helado”. Aunque a veces se ha utilizado para designar a otros compuestos que forman gel, sólo se puede aplicar a aquellos materiales proteicos derivados del colágeno (Poppe, 1997).

La gelatina es un biopolímero compuesto por una cadena α de peso molecular de 100.000 Daltons. Esta cadena está formada por una serie de L-aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos que dan lugar a la estructura de una triple hélice característica. Los principales aminoácidos que la forman son la glicina (27%), prolina (16%), hidroxiprolina (14%), hidroxilisina y trazas de triptofano y cisteína (figura 2.1).

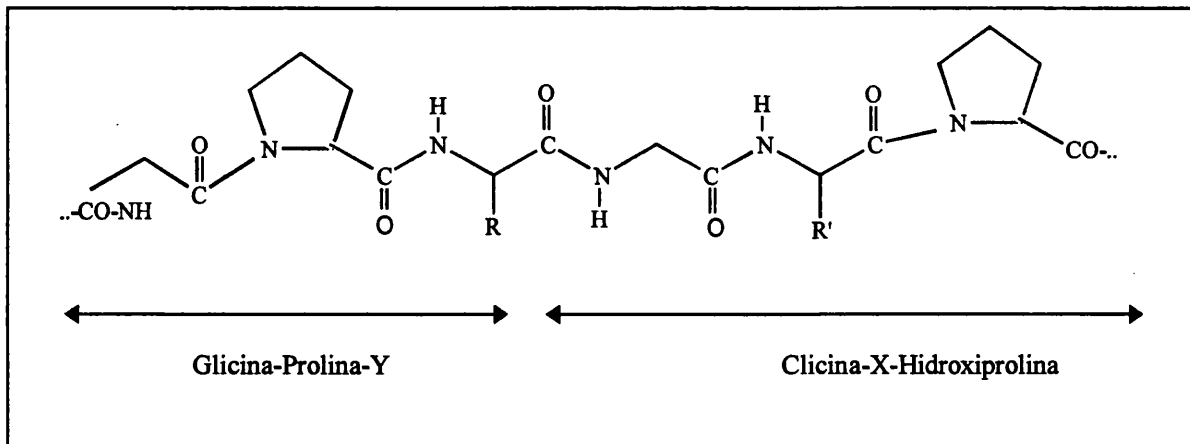


Figura 2.1. Configuración de la estructura principal de la gelatina, siendo X, Y cualquier aminoácido.

La gelatina se obtiene por hidrólisis parcial del colágeno. En este proceso, las fibras del colágeno altamente organizadas e insolubles en agua se convierten en un sistema más despolimerizado, soluble en agua, que es la gelatina. Debido a la complejidad de la estructura del colágeno y a la gran variedad de tratamientos químicos y enzimáticos que puede sufrir éste, se puede obtener una gran variedad de gelatinas (Poppe, 1997). Dependiendo de la naturaleza de la hidrólisis, se pueden describir, básicamente, dos tipos de gelatina comercial de grado alimentario:

- a) **Hidrólisis ácida.** Esta hidrólisis es la menos agresiva de las dos y se realiza sobre la piel de cerdo y los huesos de ganado vacuno joven (material menos entrecruzado). Se introduce la materia prima en un baño de ácido diluido (ácido sulfúrico o clorhídrico con la adición de ácido fosfórico para retrasar el desarrollo del color) durante 48 h a temperatura ambiente, hasta alcanzar un pH entre 3.5 y 4.5. Al final de este proceso se elimina el exceso de ácido lavando la materia prima con agua fría. Las gelatinas obtenidas mediante esta hidrólisis son las del tipo A.
- b) **Hidrólisis básica.** Esta hidrólisis se realiza sobre los huesos y tejido óseo del ganado bovino. Se sumerge el material en álcali (hidróxido de sodio) durante 20 semanas a temperatura ambiente. Durante este período de tiempo se empiezan a romper los enlaces peptídicos de las moléculas así como algunos enlaces covalentes entre las cadenas de aminoácidos. De esta forma la estructura del colágeno se va haciendo soluble en agua. Posteriormente la materia prima se neutraliza con ácido hasta pH 5-7. Las gelatinas obtenidas con este método son las gelatinas tipo B.

A continuación, para ambos tipos de gelatina, se realiza la primera extracción de la materia con agua caliente a 50-60°C, seguida de otras extracciones a mayores temperaturas. La calidad del producto final dependerá del tiempo, temperatura y pH del tratamiento efectuado. Posteriormente se lo somete a un filtrado, concentrado por evaporación, esterilizado, enfriamiento y después de una extrusión y secado se obtiene el producto final en polvo, que debe tener una humedad de 9-14% (Ledward, 1986).

El esquema de la fabricación de la gelatina a partir del colágeno está resumido en la figura 2.2.

2.1.2. Mecanismo de gelificación

La gelatina es un producto soluble en agua que, como ya se ha mencionado, se prepara mediante procesos que implican la destrucción de la estructura terciaria, secundaria e incluso, en parte, de la primaria del colágeno.

El colágeno está formado por tres cadenas, cada una de ellas formada por una hélice de L-prolina, organizadas en una triple hélice. Ésta se estabiliza por puentes de hidrógeno entre las cadenas y además tiene enlaces covalentes intramoleculares localizados en las zonas no helicoidales que suelen estar situados al final de dichas cadenas.

Aunque el colágeno tiene una estructura primaria muy característica donde la glicina ocupa cada tercera posición de los tripletes glicina-prolina-R o glicina-

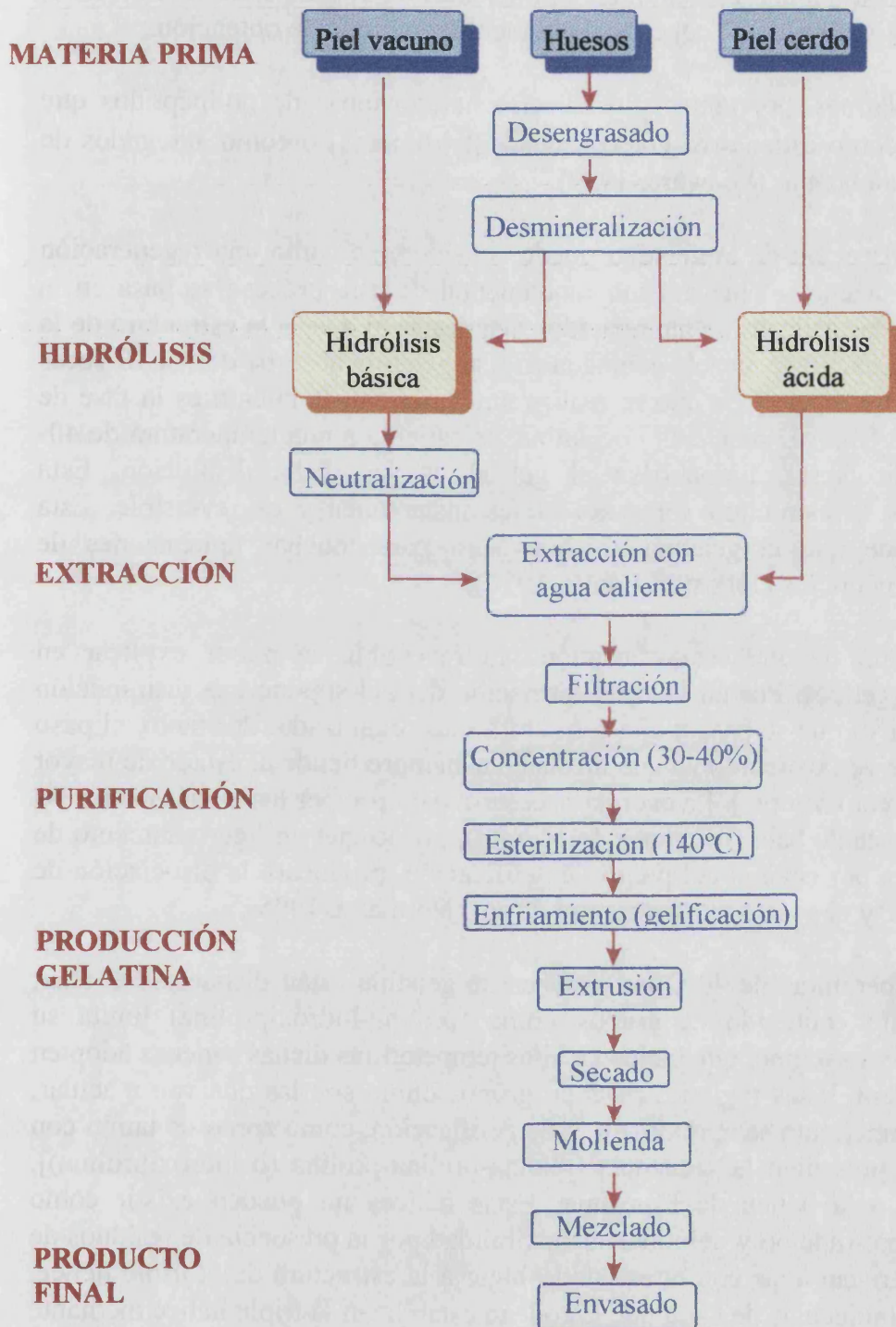


Figura 2.2. Esquema de la fabricación de la gelatina.

hidroxiprolina-R, (siendo R- cualquier aminoácido) de la cadena de aminoácidos, esta secuencia no es única y depende de la fuente y método de obtención.

Las gelatinas, por tanto, son mezclas heterogéneas de polipéptidos que pueden estar como cadenas α , como cadenas β (dímeros) o como agregados de elevado peso molecular (Ledward, 1992).

La gelificación de la gelatina puede considerarse como una regeneración parcial del colágeno. El mecanismo fundamental de este proceso se basa en la conversión de las cadenas de aminoácidos dispuestas al azar a la estructura de la triple hélice. Cuando se mezcla con agua fría, la gelatina absorbe de 5 a 10 veces su peso de agua. Esta etapa que se realiza antes del calentamiento es la fase de hinchamiento. Una vez hinchada la gelatina, se calienta a una temperatura de 40-60°C para disolverla, formándose el gel al enfriar dicha disolución. Esta conversión de la estructura sol a gel no es instantánea y es reversible. Esta propiedad hace que la gelatina sea muy útil para muchas aplicaciones de productos alimenticios (Johnston-Banks, 1990).

El hecho de que esta transición sea reversible se puede explicar en términos energéticos. Por un lado, la formación del gel supone una disminución de la entropía ya que se pasa a una estructura más organizada. Por tanto, el paso de gel a sol se ve favorecido ya que un sistema siempre tiende al estado de mayor desorden (mayor entropía). La energía necesaria para romper los enlaces entre las cadenas es bastante baja (inferior a 45 KJ/mol), por lo que un ligero aumento de la temperatura por encima del punto de gelificación, provocará la disociación de la triple hélice y el paso a una estructura de sol (Normand, 1995).

A temperaturas de 40°C las cadenas de gelatina están dispuestas al azar, aunque el alto contenido de grupos imino (prolina-hidroxiprolina) limita su flexibilidad. Esto sugiere que incluso a altas temperaturas dichas cadenas adopten cierta estructura. Estas regiones ricas en grupos imino son las que van a actuar, cuando la temperatura se aproxima a la de gelificación, como zonas de unión con aquéllas que presenten la secuencia [glicina-prolina-prolina (o hidroxiprolina)], dando lugar a la hélice de L-prolina. Estas hélices no pueden existir como monómeros en solución y debido a su flexibilidad por la presencia de residuos de glicina, se agregan unas con otras dando lugar a la estructura de la triple hélice. Además, las moléculas de agua que la rodean estabilizan la triple hélice mediante la formación de puentes de hidrógeno. La agregación de varias hélices se confirmó mediante microscopía electrónica (Ledward, 1986, 1992).

La cinética y mecanismo de formación de esta estructura es todavía objeto de debate pero los modelos cinéticos que se utilizan para describir este fenómeno se basan principalmente en un mecanismo de dos etapas (Normand, 1995):

- Una primera etapa (proceso lento), en la que las cadenas polipeptídicas se orientan de forma que se generen “sitios activos” en algún punto de ellas.
- Una segunda etapa (proceso rápido), en la que se produce la agregación de las cadenas simples entre sí por los “sitios activos generados”, dando lugar a la reestructuración de la triple hélice del colágeno.

Hay otros modelos que explican la primera etapa como un proceso rápido y la segunda, como uno lento. Sin embargo, los dos modelos son factibles y dependientes de la temperatura a la que se realice la medida.

Se ha comprobado que el proceso de gelificación depende de la concentración de gelatina (Johnston-Banks, 1990): a concentraciones de 0.5% el sistema gelifica de forma unimolecular, mientras que a concentraciones superiores este sistema para a ser bi- o trimolecular. Por tanto, se pueden describir tres posibilidades:

- a) Si la concentración de gelatina es inferior a 0.01g/100g: las cadenas individuales forman enlaces intramoleculares, pero no contribuyen en la formación de la red, por lo que no se observa gelificación.
- b) Si la concentración de gelatina está entre 0.2-0.5g/100g: comienza a aparecer alguna agregación entre las cadenas.
- c) Si la concentración de gelatina es superior a 1g/100g: se observa la estructura de gel formada por varios agregados de las cadenas.

Se puede destacar que la gelatina es el único agente gelificante que a concentraciones tan bajas como el 1% puede formar un gel termorreversible a 30-40°C. Esta característica de “fundir en la boca” es un atributo deseable en muchos alimentos, y por lo tanto, la gelatina es un ingrediente que aparece en la formulación de muchos productos.

2.1.3. Propiedades físicas y funcionales

2.1.3.1. Fuerza de gel

Una de las propiedades más importantes de las gelatinas es su capacidad para formar geles. La fuerza de gel se expresa en grados Bloom y, por definición, es la masa en gramos necesaria para comprimir con un émbolo cilíndrico, de 12.7 mm de diámetro, una distancia de 4 mm en un gel de 6.67% de concentración madurado a 10°C durante 16-18 h (GME, 1998).

Los grados Bloom de las gelatinas comerciales pueden variar entre 60 y 280 y se clasifican en tres tipos: Bloom bajo, cuando tienen una fuerza de gel



inferior a 150°Bloom; Bloom medio, cuando están entre 150-220° Bloom y Bloom alto, si tienen una fuerza de gel superior a 220°Bloom.

La fuerza de gel depende de la concentración, de la temperatura y de la presencia de otros compuestos, como por ejemplo, electrolitos; sin embargo, no se ve afectada por valores de pH dentro del intervalo 4-9 (Johnston-Banks, 1990).

2.1.3.2. Viscosidad

La viscosidad es una medida de las propiedades de la solución y está relacionada con el peso molecular y, en particular, con el grado de oligomerización de las cadenas α .

La viscosidad de la gelatina se mide a partir de una disolución al 6.67% de concentración y a una temperatura de 60°C. Se expresa en milipoise.

Depende de la temperatura (a partir de 40°C, la viscosidad decrece exponencialmente con la temperatura), del pH (la viscosidad es mínima en el punto isoeléctrico) y de la concentración.

En general, la viscosidad aumenta con la fuerza de gel para un mismo tipo de gelatina. Además, las gelatinas de tipo básico tienen mayor viscosidad que las de tipo ácido (Janssens y Muyldermans, 1994).

2.1.3.3. pH

El pH de la gelatina se mide en una disolución al 1% a una temperatura de 45°C, usando un electrodo de vidrio estándar.

2.1.3.4. Punto isoeléctrico (PI)

El punto isoeléctrico se define como el pH en que la carga neta en la molécula es cero. Depende de la proporción de grupos carboxílicos amidados presentes. Por ejemplo, el colágeno es una proteína básica con un PI de 9.4. El PI de la gelatina depende del tipo de tratamiento aplicado para su obtención. Para la gelatina tipo B es de 4.8-5.0 y para el tipo A es de 6.5-9.0. Esta última tiene un PI similar al colágeno debido a que sufre un tratamiento menos severo y se mantienen amidados la mayor parte de los grupos carboxílicos, mientras que en las gelatinas de tipo B se produce una hidrólisis total de los grupos amidados de la asparagina y glutamina, dando lugar a los ácidos correspondientes (Johnston-Banks, 1990).

2.1.3.5. Punto de fusión

Corresponde al punto de transición de la forma gel a la forma sol. Según la norma BS 757 (BSI, 1975), el punto de fusión corresponde a la temperatura a la cual el gel de gelatina se ablanda lo suficiente como para permitir que una gota de tetracloruro de carbono se hunda en él. En general, el punto de fusión depende del tiempo de maduración, de la concentración (aumenta al aumentar la concentración de gelatina) y de la presencia de sales (por ejemplo, el cloruro sódico hace disminuir el punto de fusión) (Poppe, 1997).

2.1.3.6. Punto de gelificación

El punto de gelificación depende de la historia mecánica y térmica de la disolución de gelatina. Cuando el enfriamiento es lento, la temperatura de solidificación es más alta que cuando se realiza un enfriamiento rápido. Al igual que el parámetro anterior, depende de la concentración y de la presencia de sales, entre otros factores.

2.1.4. Aplicaciones de la gelatina en la industria alimentaria

La gelatina se utiliza como ingrediente en la industria alimentaria debido a sus propiedades funcionales. En la figura 2.3 están resumidas las aplicaciones principales de la gelatina en función de sus propiedades (Rother, 1995).

<u>PROPIEDADES</u>	<u>APLICACIONES</u>
Formación de gel Agente espumante Agente protector coloides Espesante Emulsificante Estabilizante Agente adhesivo	Confitería Mousses, soufflés Helados, confitería Puddings, jaleas Cremas Productos lácteos, helados Panadería

Figura 2.3. Aplicaciones de la gelatina según sus propiedades funcionales.

Los sectores de la alimentación donde principalmente se utiliza la gelatina son los siguientes:

- Panadería: normalmente se utiliza en forma de polvo para estabilizar los rellenos de los pasteles, ya que evita que se produzca sinéresis, debido a su capacidad de retención de agua, especialmente cuando se congelan estos productos.

- Productos cárnicos: se utiliza para mantener la estructura de la carne firme incluso a temperatura ambiente. Puede considerarse como un complemento proteico con un aceptable valor nutricional (Krishnakumar y Gordon, 1995).

- Golosinas: es muy utilizada en este sector. Comunica elasticidad, una consistencia deseable, inhibe la recristalización prolongando la vida media del producto y además en el caso de productos aireados, los mantiene estables incluso durante su transporte y almacenamiento.

- Productos lácteos: la compatibilidad de la gelatina con las proteínas de la leche hace que se utilice como ingrediente funcional en la fabricación de una gran gama de productos lácteos. Una de sus principales propiedades que hace posible su utilización en este tipo de productos es su capacidad estabilizante. Además tiene un olor neutro, se dispersa e hidrata fácilmente en agua y es compatible con otros hidrocoloides utilizados en este sector, como por ejemplo, los carragenatos. Sin embargo, prácticamente no hay estudios científicos en los que se describa esta compatibilidad de la gelatina con los sistemas lácteos, aunque sí hay artículos de divulgación donde se exponen las posibles aplicaciones empíricas que puede tener, siendo en muchos casos estas aplicaciones potenciales (Hagerman, 1990; Janssens y Muyldermans, 1994).

En resumen, la gelatina es un ingrediente funcional que tiene una gran potencialidad en la industria alimentaria, y en concreto en los productos lácteos.

2.2. ASPECTOS FUNDAMENTALES DE LA REOLOGÍA

La Reología es la rama de la Física que estudia los fenómenos de deformación y flujo provocados en los materiales bajo la acción de fuerzas mecánicas. Por tanto, las propiedades reológicas de los alimentos son aquellas propiedades funcionales que influyen en el flujo y en la deformación de los mismos, cuando se les aplica la acción de fuerzas externas. Así, el acto habitual de comer puede considerarse como un proceso de deformación y/o rotura del alimento en la boca, por lo que el estudio de las propiedades reológicas de los alimentos cuando son sometidos a determinadas fuerzas está relacionado con la textura, que está considerada como un importante factor de calidad, y con las propiedades organolépticas de los mismos, que son apreciadas de forma subjetiva por el consumidor (Bourne, 1982). La metodología y los equipos desarrollados en la última década basados en la reología dinámica, que se basan en la aplicación de deformaciones pequeñas, permiten conocer aspectos estructurales de los sistemas estudiados.

También, el conocimiento de las propiedades reológicas es primordial en el diseño de procesos de flujo, en control de calidad, en las mediciones de estabilidad en almacenamiento y proceso y en la comprensión y nominación subjetiva de atributos de textura de alimentos (Barbosa-Cánovas y col., 1993).

En general, las propiedades reológicas se estudian en los alimentos fluidos y en los semi-sólidos, los cuales pueden presentar una gran variedad de comportamientos reológicos que van desde el comportamiento ideal o newtoniano hasta la dependencia del tiempo y la viscoelasticidad (Rao, 1992). La mayoría de alimentos se comportan como materiales con propiedades reológicas intermedias entre sólidos ideales y fluidos ideales. A estos alimentos se los denomina viscoelásticos. El conocimiento de las propiedades viscoelásticas es una herramienta muy útil en la interpretación de la relación entre las propiedades reológicas fundamentales de los alimentos y su estructura física interna, basándose para su explicación en modelos mecánicos en los que intervienen dos elementos básicos: un elemento elástico ideal que cumple la ley de Hooke (representado por un muelle, módulo de elasticidad G), y un elemento viscoso ideal regido por la ley de Newton (representado por un amortiguador, viscosidad μ) (Pons, 1995) (figura 2.4).

Los tres modelos más importantes que se aplican a materiales viscoelásticos son el modelo de Maxwell, el de Kelvin-Voigt y el de Burgers, que es una combinación de los dos anteriores.

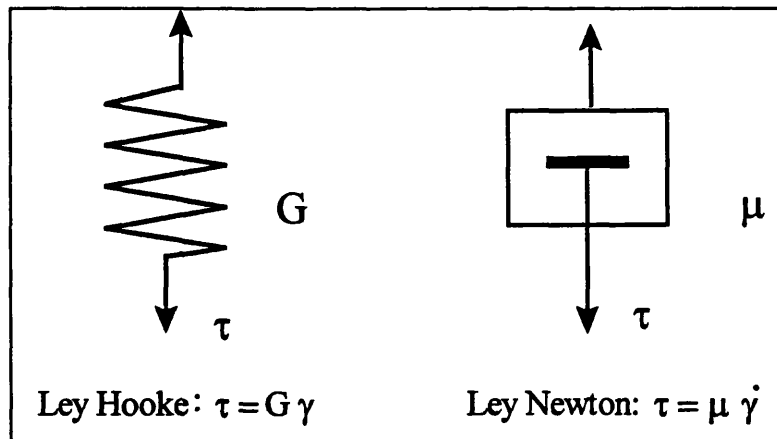


Figura 2.4. Esquema de los dos elementos básicos utilizados en los modelos mecánicos.

2.2.1. Modelos matemáticos que describen el comportamiento viscoelástico de los materiales

2.2.1.1. Modelo de Maxwell

El modelo de Maxwell responde al comportamiento de un líquido viscoelástico y está representado por un muelle y un amortiguador en serie (figura 2.5). Al estar dispuestos de esta manera se cumple que la deformación sufrida por el sistema es la suma de las deformaciones del muelle y el amortiguador ($\gamma = \gamma_G + \gamma_\mu$), mientras que la fuerza aplicada sobre el mismo es igual para todos los elementos ($\tau = \tau_G = \tau_\mu$). Este modelo está caracterizado por el tiempo de relajación de Maxwell, que se expresa como el cociente entre la viscosidad y el módulo G ($\lambda_M = \mu / G$).

La evolución de la fuerza aplicada y la deformación sufrida por el material en función del tiempo está representada en la figura 2.6. Como se puede observar, al aplicar una fuerza sobre un material se produce inicialmente un aumento de la deformación del mismo debido a la respuesta elástica del muelle (I); posteriormente, se produce un flujo newtoniano ya que toda la tensión es absorbida por el elemento viscoso (II) y finalmente, al eliminar la fuerza, la deformación disminuye hasta un valor constante (III). Esta última etapa supone la recuperación del componente elástico, que no es total, llegando hasta un valor de equilibrio τ_e (la tensión nunca desaparece por completo en el material).

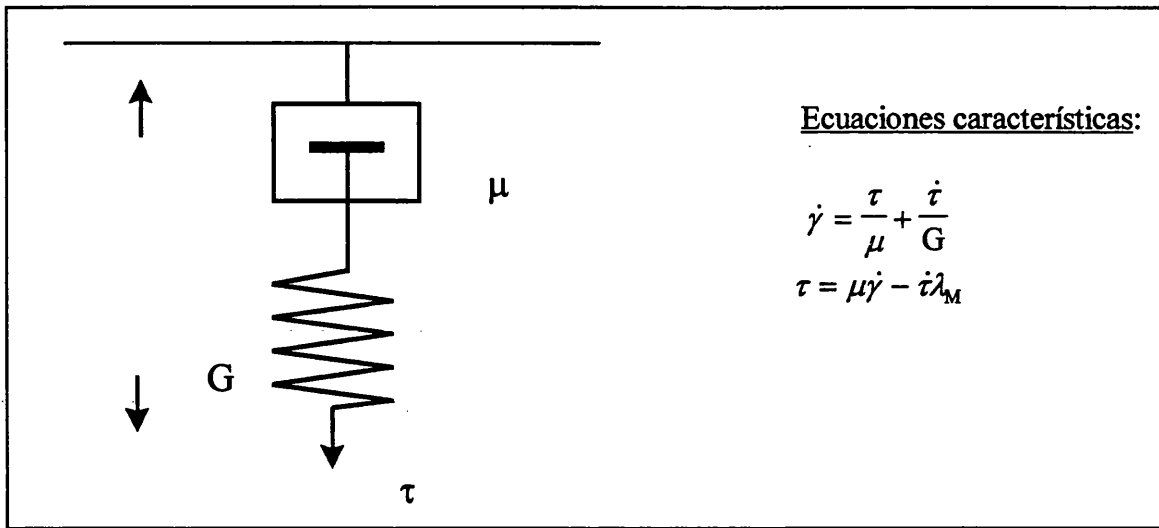


Figura 2.5. Esquema y ecuaciones características del modelo de Maxwell.

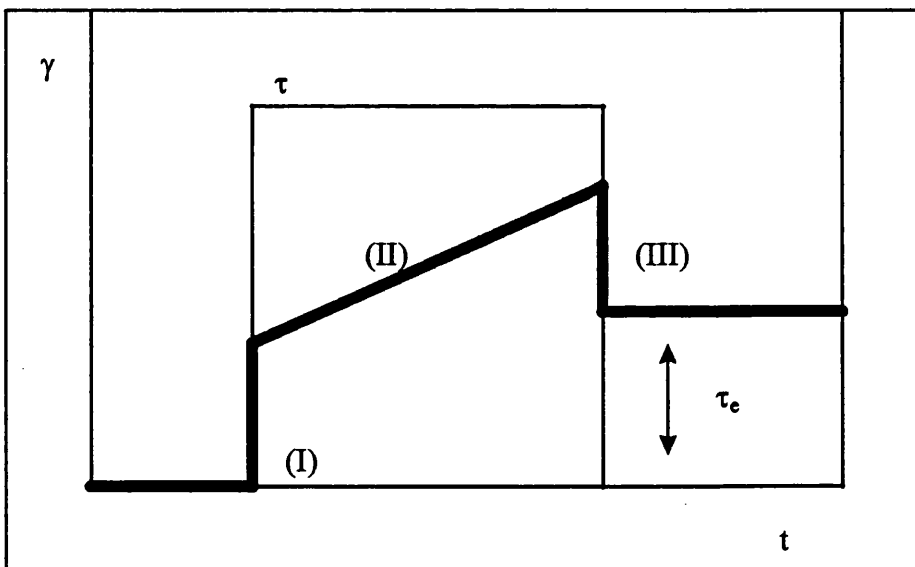


Figura 2.6. Evolución de la deformación sufrida por un material que sigue el modelo de Maxwell al aplicar una fuerza τ .

2.2.1.2. Modelo de Kelvin-Voigt

Este modelo, en el que el muelle y el amortiguador están en paralelo (figura 2.7), representa el caso de un sólido viscoelástico. En este caso se cumple que la deformación sufrida por el sistema es la misma para todos los elementos ($\gamma = \gamma_G = \gamma_\mu$) y la tensión aplicada es la suma de la tensión del muelle y la del amortiguador ($\tau = \tau_G + \tau_\mu$). Está caracterizado por el tiempo de retardo de Kelvin, que se expresa, al igual que en el caso anterior, como el cociente entre la

viscosidad y el módulo G ($\lambda_K = \mu / G$). Un sólido de Kelvin-Voigt posee una elasticidad retardada.

Cualquier fuerza que se aplica sobre el sistema, actúa por igual sobre el muelle y el amortiguador al estar dispuestos en paralelo. Una vez que se aplica la fuerza, la deformación sufrida por el sistema aumenta de manera gradual con el tiempo (figura 2.8, (I)). Al eliminar dicha fuerza, el sistema tiende a recuperarse completamente (figura 2.8. (II)).

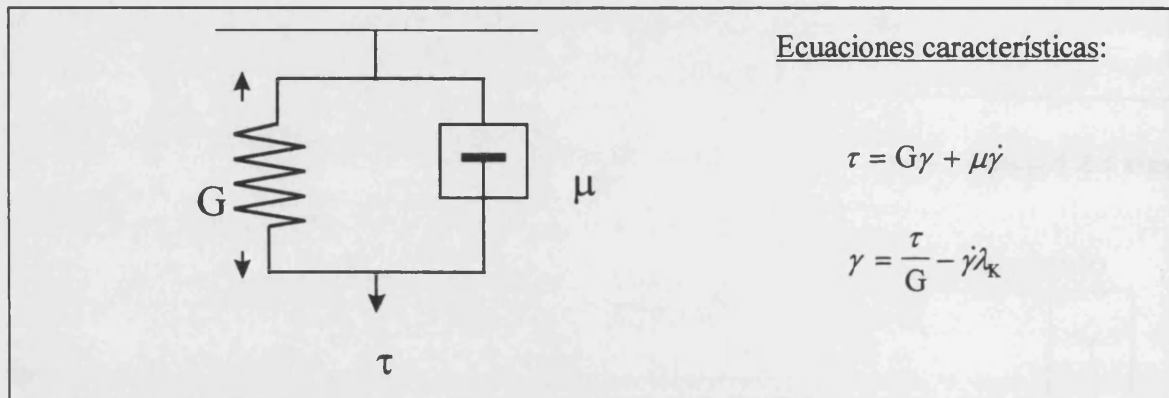


Figura 2.7. Esquema y ecuaciones características del modelo de Kelvin-Voigt.

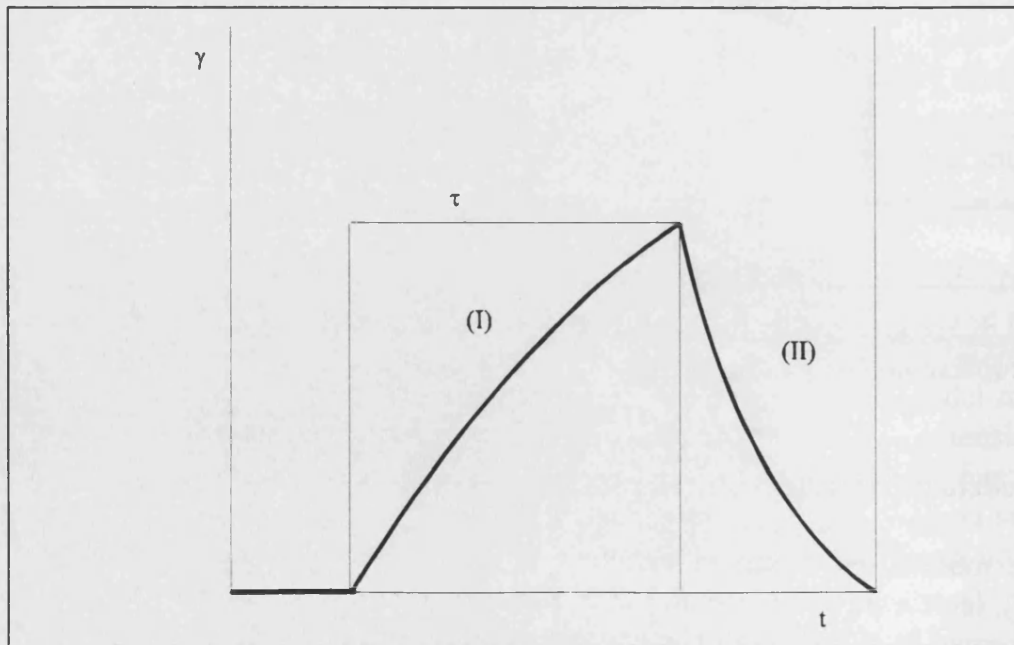


Figura 2.8. Evolución de la deformación sufrida por un sistema que sigue el modelo de Kelvin-Voigt al aplicar una fuerza τ .

2.2.1.3. Modelo de Burgers

El modelo de Burgers representa a un material en el que se produce una respuesta elástica instantánea (G_1), una respuesta elástica retardada (G_2) y una respuesta continua viscosa (μ_1). Este modelo es una combinación entre los modelos de Maxwell y Kelvin-Voigt y, por tanto, está caracterizado por el tiempo de retardo de Kelvin y el de relajación de Maxwell (figura 2.9).

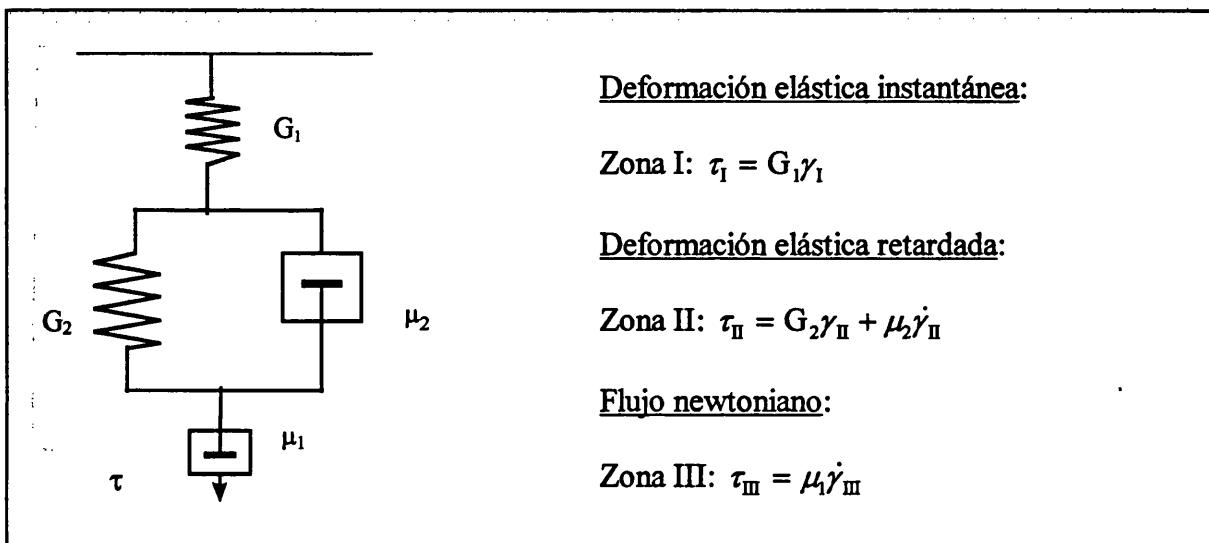


Figura 2.9. Esquema del modelo de Burgers.

Si se representa la evolución de la deformación de un material que sigue el modelo de Burgers, se obtiene una curva donde se puede distinguir claramente los tres tipos de respuesta mencionados (figura 2.10).

Existen modelos mucho más complejos que son los que describen, en realidad, el comportamiento viscoelástico de muchos productos. Los más importantes son el modelo de Maxwell generalizado, que está compuesto por una combinación de muelles y amortiguadores puestos en serie (figura 2.11. A), y el de Kelvin-Voigt generalizado, compuesto por una combinación de muelles y amortiguadores en paralelo (figura 2.11. B).

Por ejemplo, el comportamiento de un gel de gelatina sometido a la acción de una fuerza externa se puede representar mediante el modelo de Kelvin-Voigt generalizado.

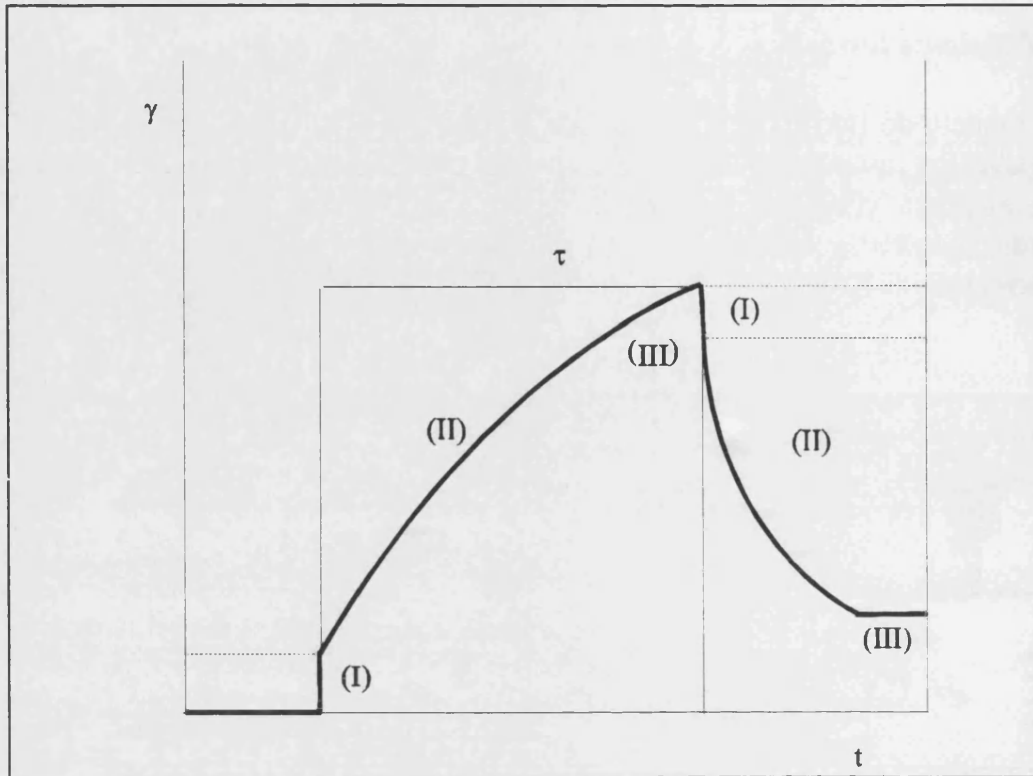


Figura 2.10. Evolución de la deformación que sufre un sistema que sigue el modelo de Burgers al aplicar una fuerza τ .

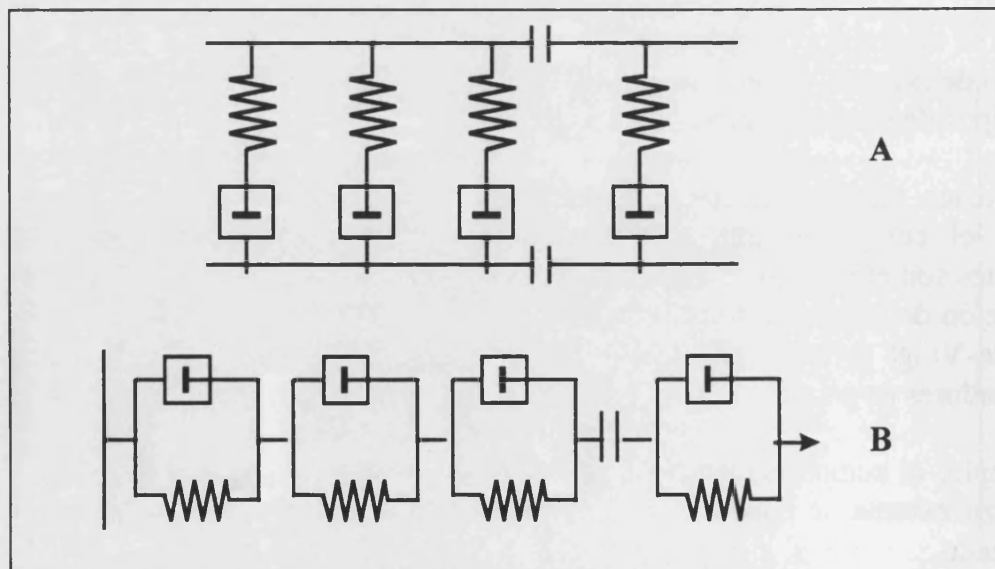


Figura 2.11. Esquema del modelo de Maxwell (A) y Kelvin-Voigt (B) generalizados.

Todos estos modelos mecánicos se emplean para analizar matemáticamente los datos experimentales obtenidos durante los ensayos viscoelásticos, siempre que éstos se realicen dentro del intervalo de viscoelasticidad lineal, que generalmente se define como el intervalo en el cual la respuesta de un material es directamente proporcional al valor de la fuerza aplicada, dependiendo principalmente esta respuesta del tiempo de aplicación de la misma, lo que conlleva el empleo de fuerzas o deformaciones pequeñas sobre el material (Davis, 1973). Por tanto, todos los ensayos viscoelásticos tendrían que realizarse dentro de la zona viscoelástica lineal, ya que fuera de ella se pueden producir cambios estructurales irreversibles en los materiales viscoelásticos, lo que hace muy difícil la interpretación matemática de los resultados.

Estos ensayos, que proporcionan una importante información sobre la estructura original del alimento, pueden ser de dos tipos: estáticos y dinámicos (Shoemaker y col., 1992).

2.2.2. Ensayos estáticos

En los ensayos estáticos de viscoelasticidad se aplica una fuerza constante sobre un alimento y se registra la deformación que sufre éste a lo largo del tiempo. Estos ensayos pueden ser de relajación o de fluencia.

2.2.2.1. Ensayos de relajación

En este tipo de ensayo se fija una deformación constante y se mide la fuerza necesaria para mantener dicha deformación, en función del tiempo. En los materiales elásticos ideales no se observa relajación, mientras que en los viscosos ideales la relajación es instantánea. En el caso de materiales viscoelásticos, la relajación se produce de manera gradual dependiendo, el punto final, de la estructura del material: en los sólidos viscoelásticos la fuerza disminuye hasta un valor de equilibrio ($\sigma_e > 0$), mientras que en los líquidos viscoelásticos la fuerza tiende a cero (figura 2.12).

Las medidas obtenidas con este ensayo se expresan en función del módulo de relajación de la fuerza (G), que es independiente del tiempo en el caso de un material elástico perfecto, y dependiente del tiempo para un material viscoelástico: $G(t) = \tau / \gamma_{cte}$.

Para interpretar los resultados se utiliza, en este caso, el modelo de Maxwell. La ecuación que caracteriza este modelo es la siguiente:

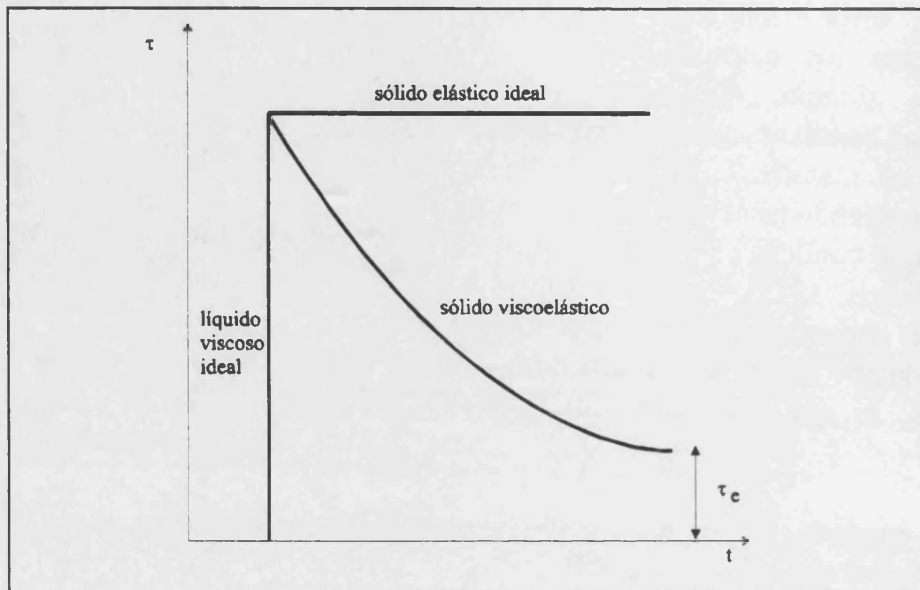


Figura 2.12. Comportamiento de diversos materiales en un ensayo de relajación.

$$\tau = \mu \dot{\gamma} - \dot{\tau} \lambda_M$$

siendo, $\lambda_M = \mu / G$, el tiempo de relajación de Maxwell. Como la deformación es constante, se tiene que: $\dot{\gamma} = 0$. Por tanto, la ecuación anterior queda como sigue:

$$\tau = -\lambda_M \times \frac{d\tau}{dt}$$

Integrando esta ecuación se obtiene la ecuación característica de este modelo:

$$\tau(t) = \tau_0 \times e^{-\frac{t}{\lambda_M}}$$

A partir de ella se puede determinar el tiempo de relajación de Maxwell (λ_M), que es el tiempo necesario para que la fuerza disminuya una cantidad 1/e de su valor original (aproximadamente un 36.8%).

Sin embargo, el modelo expuesto anteriormente no se puede aplicar a muchos materiales viscoelásticos ya que no tiene en cuenta el valor de la fuerza de equilibrio al que tienden la mayoría de los sólidos viscoelásticos. La solución

a este problema consiste en añadir al modelo de Maxwell un muelle en paralelo, que es donde se tiene en cuenta esta fuerza ($\tau_e = \gamma_0 / G_e$) (figura 2.13).

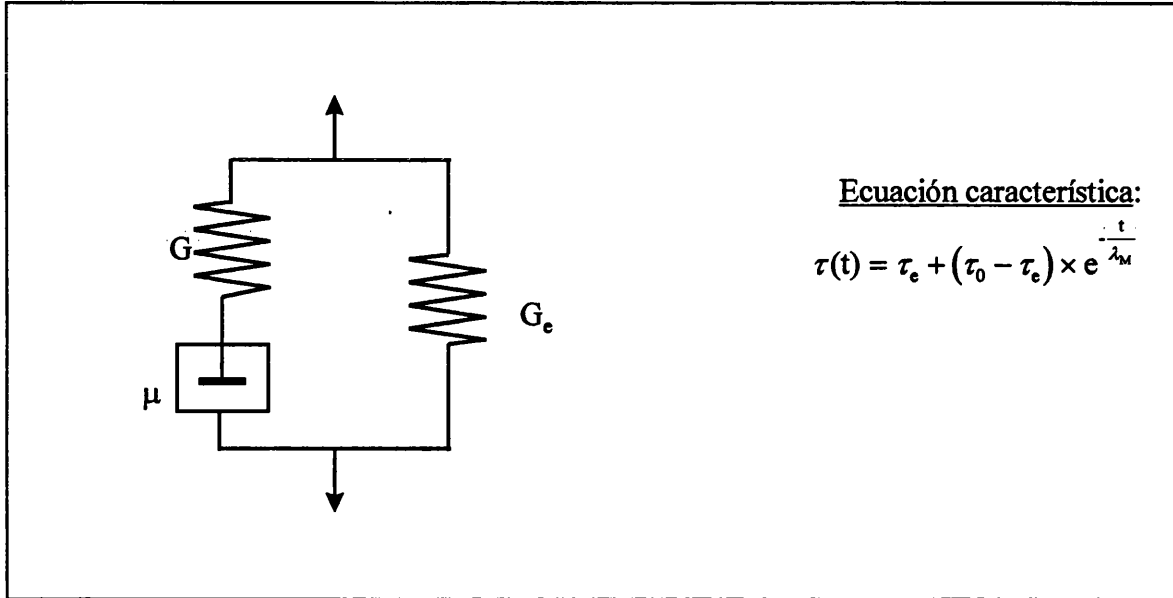


Figura 2.13. Esquema y ecuación del modelo de Maxwell modificado.

Normalmente, en lugar de este modelo, y para ajustar mejor los comportamientos de una amplia variedad de sistemas, se suele utilizar el modelo de Maxwell generalizado, compuesto por varios elementos de Maxwell en paralelo con un muelle independiente (figura 2.14). En este último modelo hay que tener en cuenta que cada elemento de Maxwell tiene un tiempo de relajación diferente

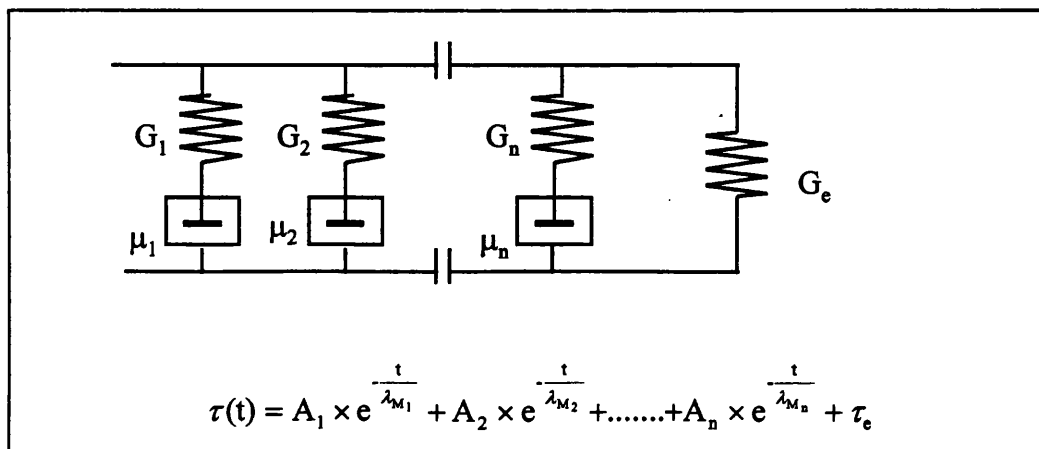


Figura 2.14. Esquema y ecuación del modelo de Maxwell generalizado modificado.

2.2.2.2 Ensayos de fluencia

En este ensayo se aplica una fuerza instantáneamente a $t=0$ y se registra la deformación que sufre el sistema. A un tiempo determinado t , dicha fuerza se elimina también de forma instantánea y se registra entonces la recuperación del sistema.

En el caso de un sólido ideal, al aplicar una fuerza instantánea, la deformación que sufre es constante (ya que no se produce disipación de energía, almacenándola toda el sistema), volviendo a su forma original cuando se elimina la fuerza aplicada (figura 2.15. A). En un líquido ideal se produce una respuesta lineal de la deformación con el tiempo, sin embargo, no se produce una recuperación del sistema después de eliminar la fuerza aplicada, sino que dicha deformación permanece constante hasta el final del ensayo (figura 2.15.B).

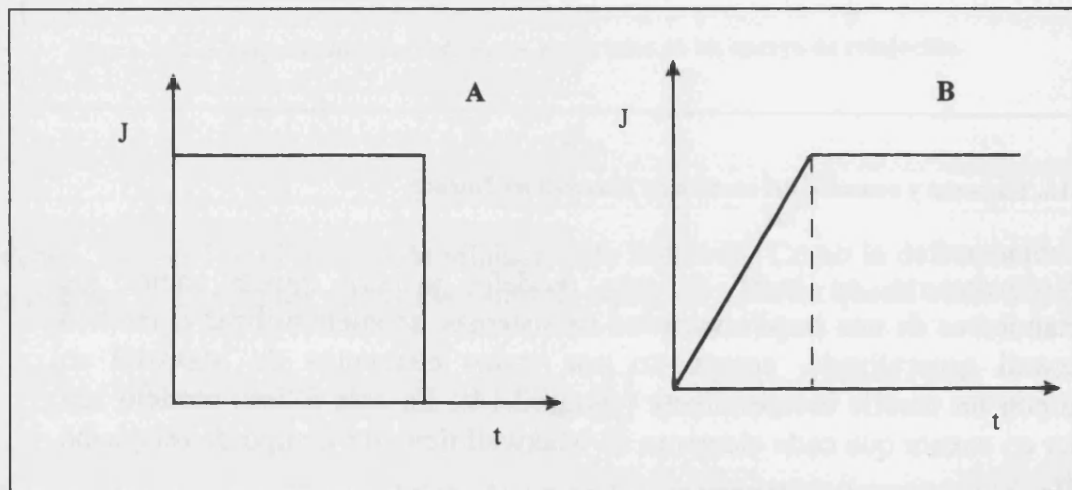


Figura 2.15. Ensayo de fluencia para un sólido ideal (A) y un líquido ideal (B).

Como cabe esperar, la respuesta de los materiales viscoelásticos es intermedia entre el sólido y el líquido, mostrando una respuesta no lineal con respecto a la deformación. Al aplicar una fuerza instantánea, el sistema alcanza una deformación instantánea que va aumentando poco a poco conforme pasa el tiempo. Cuando la fuerza se elimina, se observa una disminución inmediata de la deformación. En el caso de un sólido viscoelástico, el valor final alcanzado es cero ya que no hay flujo neto dentro del sistema (figura 2.16 A); mientras que en el caso de un líquido viscoelástico, sí que se produce un flujo neto una vez se ha eliminado la fuerza aplicada sobre el sistema, por tanto, el valor final de la deformación nunca llega a ser cero, reflejando el flujo irreversible que ha tenido lugar (figura 2.16 B).

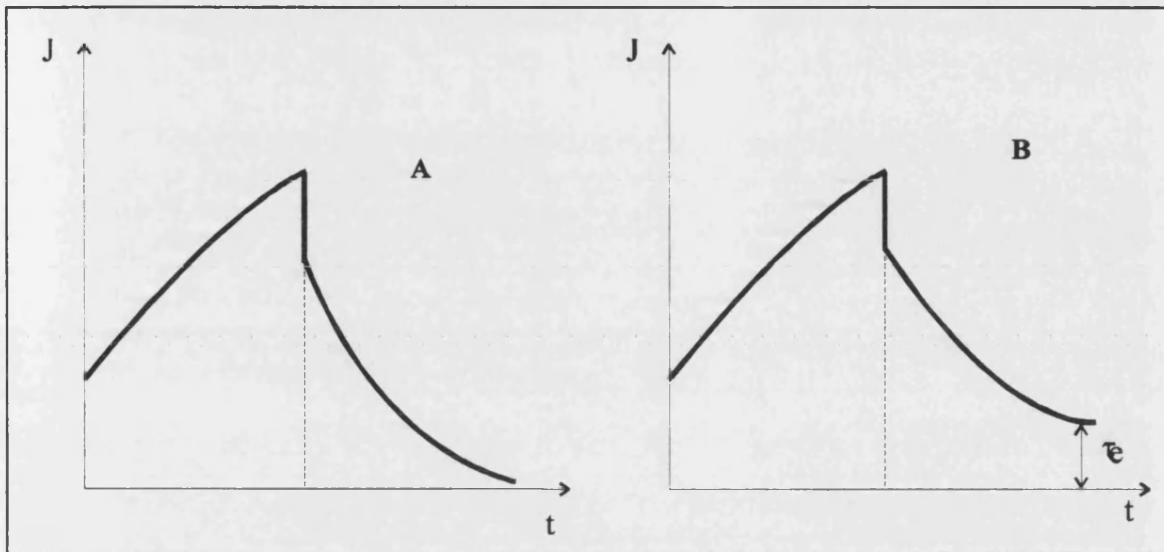


Figura 2.16. Ensayo de fluencia para un sólido viscoelástico (A) y un líquido viscoelástico (B).

Los datos obtenidos en este tipo de ensayos se expresan en función de la capacitancia o "compliance" J : $J(t) = \gamma / \tau_{cte}$.

El modelo de Kelvin-Voigt se suele utilizar para describir el ensayo de fluencia. La ecuación característica que define la fuerza aplicada sobre un sistema es la siguiente:

$$\tau = G\gamma + \mu\dot{\gamma}$$

Diferenciando la ecuación anterior se obtiene:

$$\frac{1}{G} \frac{d\tau}{dt} = \dot{\gamma} + \lambda_k \times \frac{d\dot{\gamma}}{dt}$$

donde, λ_k es el tiempo de retardo de Kelvin.

Como en un ensayo de fluencia, la fuerza aplicada es constante (τ_0), tenemos que:

$\frac{d\tau}{dt} = 0$. Por tanto, la ecuación característica de este modelo es la siguiente:

$$\gamma(t) = \frac{\tau_0}{G} \times \left(1 - e^{-\frac{t}{\lambda_k}} \right)$$

A partir de ésta se puede calcular el tiempo de retardo de Kelvin (τ_K), que es el tiempo necesario para que la deformación alcance el valor de $(e-1)/e$ (aproximadamente un 63.2%) de su valor inicial.

Sin embargo, este modelo no sirve para interpretar la respuesta de muchos materiales biológicos. Por tanto, el modelo que más se suele utilizar es el de Burgers, que es una combinación en serie del modelo de Maxwell y el de Kelvin (figura 2.9). Con este modelo se pueden explicar los comportamientos de materiales que muestren una respuesta elástica inicial seguida de un comportamiento elástico retardado y de un flujo de tipo newtoniano, después de largos períodos de tiempo. La ecuación característica de este modelo es la siguiente:

$$\gamma(t) = \frac{\tau_0}{G_1} + \frac{\tau_0}{G_2} \times \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_K}} \right) + \frac{\tau_0 t}{\mu_1}$$

2.2.3. Ensayos dinámicos

Los ensayos dinámicos constituyen un método cada vez más común para estudiar el comportamiento viscoelástico de los alimentos de consistencia semi-sólida. Estos ensayos se realizan mediante la aplicación de una fuerza o deformación que cambia continuamente de forma sinusoidal con el tiempo, registrándose la respuesta del material a dicha variación. Son útiles para medir, por ejemplo, la fuerza de un gel, la gelatinización del almidón, la coagulación o desnaturalización de las proteínas, el desarrollo de la textura en productos de panadería o la evaluación de la formación del coágulo en quesos, entre otras aplicaciones (Steffe, 1992).

En esta clase de análisis, las dos variables controladas son la frecuencia (ω) y la amplitud máxima de la deformación aplicada (γ_0). La respuesta del material se mide en función de la amplitud máxima de la fuerza desarrollada (τ_0) y la diferencia de fase entre ambas ondas (δ). Se puede realizar también inversamente, es decir, mediante la aplicación de una fuerza sinusoidal, y registro, en este caso, de la deformación provocada (Pons, 1995).

Para poder interpretar los resultados de estos ensayos se utilizan los modelos mecánicos expuestos anteriormente, teniendo en cuenta las variables definidas y que la fuerza y deformación varían sinusoidalmente con el tiempo.

2.2.3.1. Modelo desarrollado para un elemento elástico (muelle)

En este modelo, tanto la fuerza como la deformación son funciones sinusoidales en fase una con la otra (figura 2.17). La expresión de ambas variables en función del tiempo es la siguiente:

$$\begin{aligned}\gamma &= \gamma_0 \text{ sen } (\omega t) \\ \tau &= \tau_0 \text{ sen } (\omega t) = G \gamma_0 \text{ sen } (\omega t)\end{aligned}$$

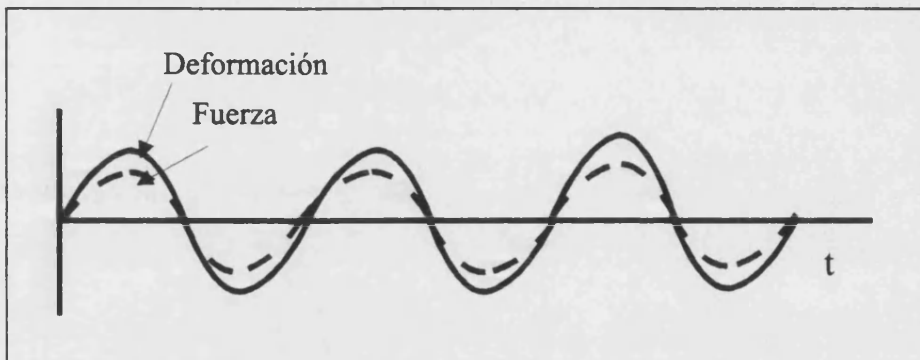


Figura 2.17. Curvas de respuesta de un material elástico obtenidas en un ensayo dinámico.

2.2.3.2. Modelo desarrollado para un elemento viscoso (amortiguador)

En este caso, la fuerza está en un desfase de 90° con respecto a la deformación (figura 2.18). La expresión general de la fuerza aplicada es la siguiente:

$$\begin{aligned}\gamma &= \gamma_0 \text{ sen } (\omega t) \\ \tau &= \mu \omega \gamma_0 \cos (\omega t) = \mu \omega \gamma_0 \text{ sen } (\omega t + \delta)\end{aligned}$$

donde, $\mu = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$, δ = ángulo de desfase y γ_0 = amplitud máxima de la deformación.

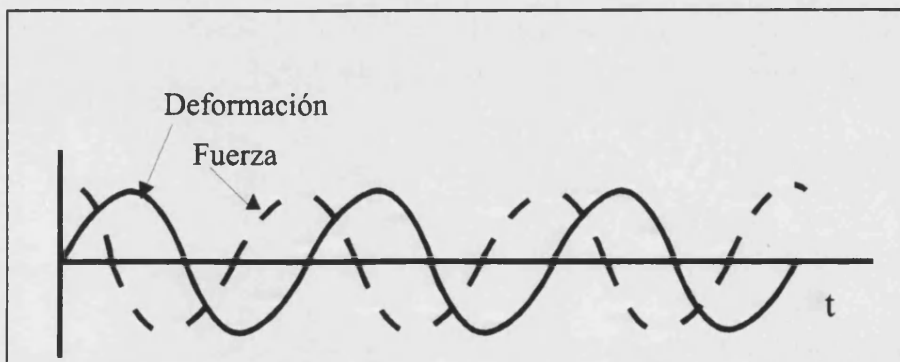


Figura 2.18. Curvas de respuesta de un material viscoso obtenidas en un ensayo dinámico.

Cuando el ángulo de desfase entre las dos ondas es de 0° se trata de un sistema elástico; si es de 90° el sistema es viscoso; y cuando se encuentra entre ambos valores ($0 < \delta < 90$), el sistema es viscoelástico.

2.2.3.3. Modelo de Maxwell

Las ecuaciones correspondientes a este modelo son las mismas que las desarrolladas anteriormente, pero teniendo en cuenta que la deformación es una función sinusoidal con el tiempo: $\gamma = \gamma_0 \text{sen}(\omega t)$. Por tanto:

$$\frac{1}{G} \dot{\tau} + \frac{\tau}{\mu} = \omega \gamma_0 \cos(\omega t)$$

Y resolviendo esta ecuación diferencial se obtiene la ecuación correspondiente a la fuerza de cizallamiento:

$$\tau = \left[\frac{G \lambda_M^2 \omega^2}{1 + \lambda_M^2 \omega^2} \right] \text{sen}(\omega t) + \left[\frac{G \lambda_M \omega}{1 + \lambda_M^2 \omega^2} \right] \cos(\omega t)$$

2.2.3.4. Modelo de Kelvin-Voigt

La ecuación característica para este modelo de la fuerza de cizallamiento aplicada, teniendo en cuenta la variación sinusoidal de la deformación con el tiempo, como en el modelo de Maxwell, es la siguiente:

$$\tau = G \gamma_0 \text{sen}(\omega t) + \mu \omega \gamma_0 \cos(\omega t)$$

2.2.3.5. Modelo desarrollado para muestras reales viscoelásticas

Las muestras reales viscoelásticas tienen un comportamiento más complejo que no se puede explicar con los modelos expuestos anteriormente. Estos materiales presentan un desfase entre la fuerza aplicada y la deformación sufrida situado entre 0° y 90° , y tanto una, como la otra dependen de la frecuencia de oscilación de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \gamma &= \gamma_0 \text{sen}(\omega t) \\ \tau &= \tau_0 \text{sen}(\omega t + \delta) \end{aligned}$$

siendo, γ_0 y τ_0 la amplitud de la deformación y de la fuerza.

Para el estudio de los ensayos dinámicos se introduce un nuevo parámetro llamado módulo complejo, G^* , que se define como el cociente entre la amplitud de la fuerza y la amplitud de deformación ($G^* = \tau_0 / \gamma_0$) y representa la resistencia total de un material contra la deformación aplicada (Schramm, 1994). Hay que destacar que en los materiales viscoelásticos este módulo G^* también depende de la frecuencia de la oscilación. Se puede descomponer en dos partes, una real y otra imaginaria ya que para definirlo se utiliza la notación de números complejos:

$$G^* = G' + iG'' = |G| \cos \delta + i|G| \sin \delta$$

$$|G| = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2}$$

$$\text{siendo, } G' = G^* \cos \delta = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cos \delta \text{ y } G'' = G^* \sin \delta = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \sin \delta$$

Al parámetro G' se lo llama módulo de elasticidad o de almacenamiento, y representa la energía almacenada por el sistema de forma temporal que posteriormente puede recuperar. Al parámetro G'' se lo llama módulo de viscosidad o módulo de pérdida, y representa la energía que el sistema utiliza en el flujo inicial perdiéndose irreversiblemente en forma de calor.

En el caso de un material puramente elástico, la respuesta a una deformación dinámica, como ya se dijo, no muestra diferencia de fase, es decir, $\delta=0$, por lo que la relación entre la fuerza y la amplitud en su amplitud máxima es la siguiente: $\tau_0 = G' \gamma_0$. Por el contrario, un fluido puramente viscoso presenta una diferencia de fase de 90° , siendo la relación entre la fuerza y la deformación la siguiente: $\tau_0 = G'' \gamma_0$.

Los materiales viscoelásticos, que poseen propiedades tanto elásticas como viscosas presentan un valor de δ entre 0° y 90° y la expresión general de la fuerza en función de la deformación es la siguiente:

$$\tau = G' \gamma_0 \sin(\omega t) + G'' \gamma_0 \cos(\omega t)$$

donde, γ_0 representa la amplitud máxima de deformación dinámica.

Por otro lado, los módulos G' y G'' se pueden relacionar dando lugar a otro parámetro muy importante que es un índice directo del desfase entre la fuerza y la deformación: $\tan \delta = G'' / G'$. Este parámetro que indica la relación existente entre el módulo de pérdida y el de almacenamiento, es una medida de la proporción entre las propiedades viscosas y elásticas de un material viscoelástico. Por tanto, si G' es mucho mayor que G'' , dicho material tendrá un comportamiento similar a un sólido, es decir, las deformaciones aplicadas serán

elásticas y recuperables. Sin embargo, si G'' es mucho mayor que G' , la energía empleada en deformar el material se disipará y no se recuperará.

Los métodos reológicos dinámicos son técnicas importantes que están directamente relacionadas con las interacciones moleculares y la estructura del sistema a estudiar. Los ensayos dinámicos se están utilizando cada vez con mayor frecuencia ya que son cortos y además no destructivos debido a que utilizan amplitudes de deformación pequeñas. Para una completa caracterización de un sistema se tiene que estudiar su evolución con el tiempo y con la frecuencia, lo que describe su comportamiento viscoelástico. En función de la dependencia del módulo de elasticidad (G') y del módulo de pérdida (G'') con la frecuencia se pueden describir tres tipos de sistemas: soluciones macromoleculares ($G'' < G'$, en las que los dos parámetros dependen altamente de la frecuencia), geles débiles ($G' < 10 G''$, en los que ambos también dependen de la frecuencia) y geles fuertes ($G' > 10 G''$, en los que G' es independiente de la frecuencia). Al estudiar la evolución de los dos parámetros anteriores con el tiempo, se puede determinar la cinética de formación de un sistema. En el caso de geles de gelatina, se puede determinar la cinética de maduración del gel formado con el tiempo.

También con las medidas dinámicas se puede determinar el punto de gelificación como el momento en el que G' iguala a G'' , en sistemas que se forman por enfriamiento. En ese instante, el sistema pasa de ser un fluido viscoelástico a un sólido viscoelástico (Doublier y Cuvelier, 1996).

2.2.3.6. Realización de los ensayos dinámicos

Con reómetros rotacionales que emplean como variable controlada el gradiente de velocidad y se registra la resistencia o fuerza que el material opone a la velocidad de deformación impuesta, se puede estudiar el carácter viscoso de los materiales. Sin embargo, no proporcionan una buena información sobre la deformación elástica que sufren los mismos. Esto se debe a que se fuerza a la muestra a moverse a una velocidad predeterminada que, con mucha frecuencia, puede provocar alguna alteración e incluso rotura de la estructura interna del material.

Para los ensayos dinámicos oscilatorios se utilizan equipos relativamente recientes en los que la fuerza es la variable controlada y se pueden aplicar magnitudes pequeñas no destructivas que permiten obtener información sobre las propiedades elásticas y la relación de éstas con la estructura original del material. En este caso, se aplica una fuerza y es la deformación o la velocidad de deformación del material lo que se mide (Shoemaker y col., 1992; Pons, 1995).

Los experimentos oscilatorios pueden llevarse a cabo con tres geometrías diferentes: platos paralelos, cono-plato y cilindros concéntricos. La elección de una geometría u otra depende de las características del material a medir.

a) Platos paralelos

Este sistema se emplea para medir muestras sólidas o dispersiones de partículas grandes que presenten baja susceptibilidad a posibles errores en el *gap* (distancia existente entre los platos). Cuando uno de los platos rota a una velocidad angular ω , la velocidad de deformación varía desde cero, situado en el centro del plato, a una máximo, situado en el borde del mismo (figura 2.19), según la siguiente ecuación:

$$\dot{\gamma} = \frac{R\omega}{h}$$

siendo, h el *gap*, y R el radio de los platos.

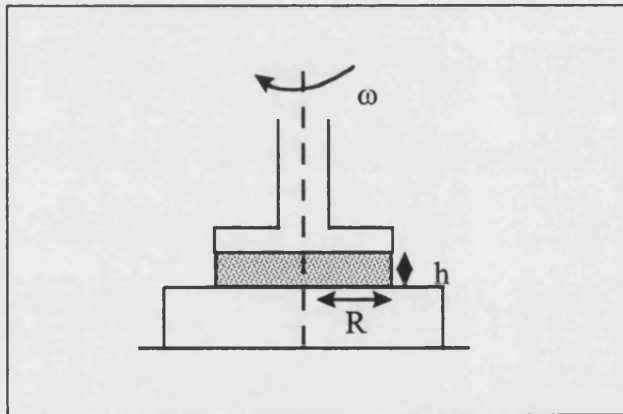


Figura 2.19. Esquema de la geometría de platos paralelos.

La fuerza de cizallamiento depende del torque aplicado (T) y de la velocidad de deformación, de la siguiente manera:

$$\tau = \frac{3T}{2\pi R^3} \left(1 + \frac{1}{3} \frac{d \ln T}{d \ln \dot{\gamma}} \right)$$

Esta geometría se ha utilizado para estudiar, por ejemplo, mantequillas Davis (1973) y quesos (Ma y col., 1996 y 1997).

b) Cono-plato

Esta geometría es la más usada y como su nombre indica consta de un plato circular y un cono. El ángulo del cono suele ser de 3° o inferior, ya que cuando es superior a 3° , los efectos debido a los bordes pueden distorsionar el campo del flujo (Rao, 1995). En estos sistemas el cono es el elemento que gira y el plato el elemento fijo (figura 2.20).

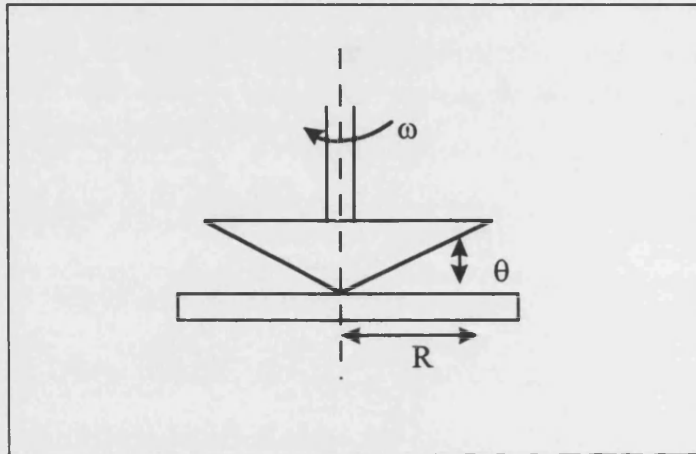


Figura 2.20. Esquema de la geometría cono-plato.

La velocidad de deformación puede considerarse sólo dependiente de la velocidad angular cuando el ángulo del cono es pequeño:

$$\dot{\gamma} = \frac{\omega}{\theta}$$

siendo, θ el ángulo del cono.

La fuerza de cizallamiento se puede obtener a partir del torque aplicado:

$$\tau = \frac{3T}{2\pi R^3}$$

siendo, T el torque aplicado y R el radio del plato.

La mayor ventaja de utilizar esta geometría es que la velocidad de deformación es constante para ángulos pequeños de cono. Los ensayos de relajación y barridos de amplitudes son adecuados para realizarlos con cono-plato.

Otra de las ventajas es que se necesita poca cantidad de muestra y la limpieza al final del ensayo es sencilla. En general, se utiliza para dispersiones de pequeño tamaño de partícula y viscosidad medio-alta, como se ha dicho anteriormente, sin embargo, no es útil para dispersiones de partículas grandes, como por ejemplo, pastas de tomate (Xu y col., 1986). Las partículas más grandes tienen que ser al menos 10 veces más pequeñas que la mínima distancia existente entre el cono y el plato para poder medir una muestra con este sistema. Esta geometría se ha utilizado mucho para estudiar emulsiones, salsas (Davis, 1973 y Elliot y Ganz, 1977) y soluciones de macromoléculas (Fernandes y col., 1992).

c) Cilindros concéntricos

Esta geometría se utiliza para fluidos homogéneos de viscosidad media-baja. La velocidad de deformación viene dada en función de los radios de los cilindros (figura 2.21):

$$\dot{\gamma} = \frac{R_a \omega}{R_o - R_i}$$

siendo, R_o el radio del cilindro exterior, R_i el radio del cilindro interior y R_a la media de los radios.

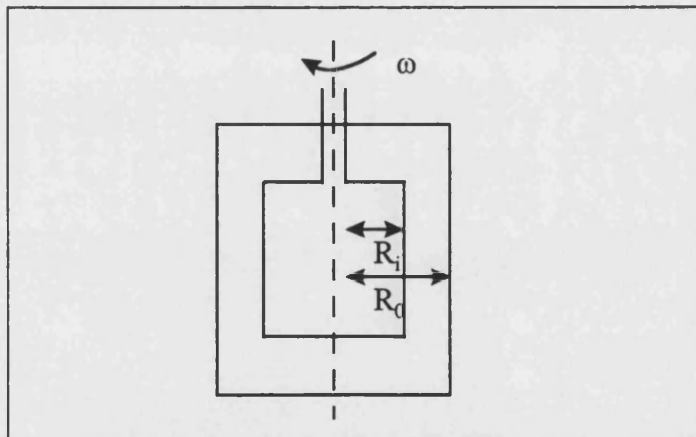


Figura 2.21. Esquema de la geometría de cilindros concéntricos.

La ecuación característica de la fuerza aplicada sobre un material es la siguiente:

$$\tau = \frac{T}{2\pi R_i^2 h}$$

siendo, T el torque aplicado y h la altura del cilindro interior.

Los *gaps* (en este caso, distancia entre cilindros) pequeños son adecuados para fluidos homogéneos y suspensiones de partículas finas, tales como emulsiones o cultivos de fermentación (Bongenaar y col., 1973; Roels y col., 1974 y Rao, 1975). pero no para suspensiones de partículas grandes.

Una de las desventajas que posee este sistema es que tiene una inercia alta y además los cilindros son más difíciles de limpiar al final del ensayo.

CAPÍTULO 3

OBTENCIÓN DE GELES DE GELATINA EN LECHE MEDIANTE ACIDIFICACIÓN DIRECTA

100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110

111

112
113
114
115
116
117

118
119
120
121

122
123
124

125
126

3.1. INTRODUCCIÓN

El impacto producido por la gran demanda de nuevos alimentos es un factor importante que se debe tener en cuenta en la moderna industria alimentaria. En la actualidad, el mercado de los productos elaborados con leche está en alza constante. Los consumidores piden cada vez más que haya diversidad de elección. Algunos de los retos que deben afrontar los productores en el desarrollo de nuevas formulaciones son la búsqueda de nuevos modos de presentación, de nuevos sabores, la posibilidad de elección del nivel calórico o la introducción de cultivos no tradicionales, en el caso de productos fermentados, que implican beneficios para la salud. Uno de los principales desafíos lo constituye el desarrollo de nuevas texturas.

3.1.1. Descripción y características de la leche como sistema susceptible de gelificación

La leche es uno de los productos alimenticios más antiguos que existen y además se puede considerar como un alimento que cubre todas las necesidades nutritivas del ser humano. Contiene todos los nutrientes y biocatalizadores necesarios para mantener y desarrollar los procesos vitales (hidratos de carbono, grasas, proteínas, sales minerales, vitaminas y enzimas). Un dato especialmente importante es que el valor proteico de la leche de vaca, es decir, la proporción en porcentaje de energía del valor energético total que aportan las proteínas, es un 20% más favorable que en cualquier alimento (con excepción de la leche de mujer).

La leche es un líquido blanco y opaco, aunque puede presentar también una tonalidad ligeramente amarillenta, sobre todo cuando las vacas se alimentan de pastos. Debe tener un sabor característico, fresco y ligeramente dulzón, así como un olor igualmente característico y puro. Debe tener también una consistencia homogénea y carecer de grumos o copos (Spreer, 1991).

Desde un punto de vista físico-químico, la leche puede describirse como una dispersión coloidal. Las partículas dispersas, micelas de caseína, son agregados de fosfoproteínas ligados a fosfocaseinato cálcico que se mantienen unidas por la acción de fuerzas secundarias (Horne y Leaver, 1995). Los componentes fundamentales de la leche se muestran en la figura 3.1.

El agua es el componente principal de la leche y su función esencial es la de actuar como vehículo de los demás componentes. Sin embargo, en algunos derivados lácteos como la mantequilla, el queso o la leche en polvo puede estar como agua ligada químicamente, por ejemplo, ligada en forma de agua de hidratación a las proteínas o a los cristales de lactosa, y también como agua libre.

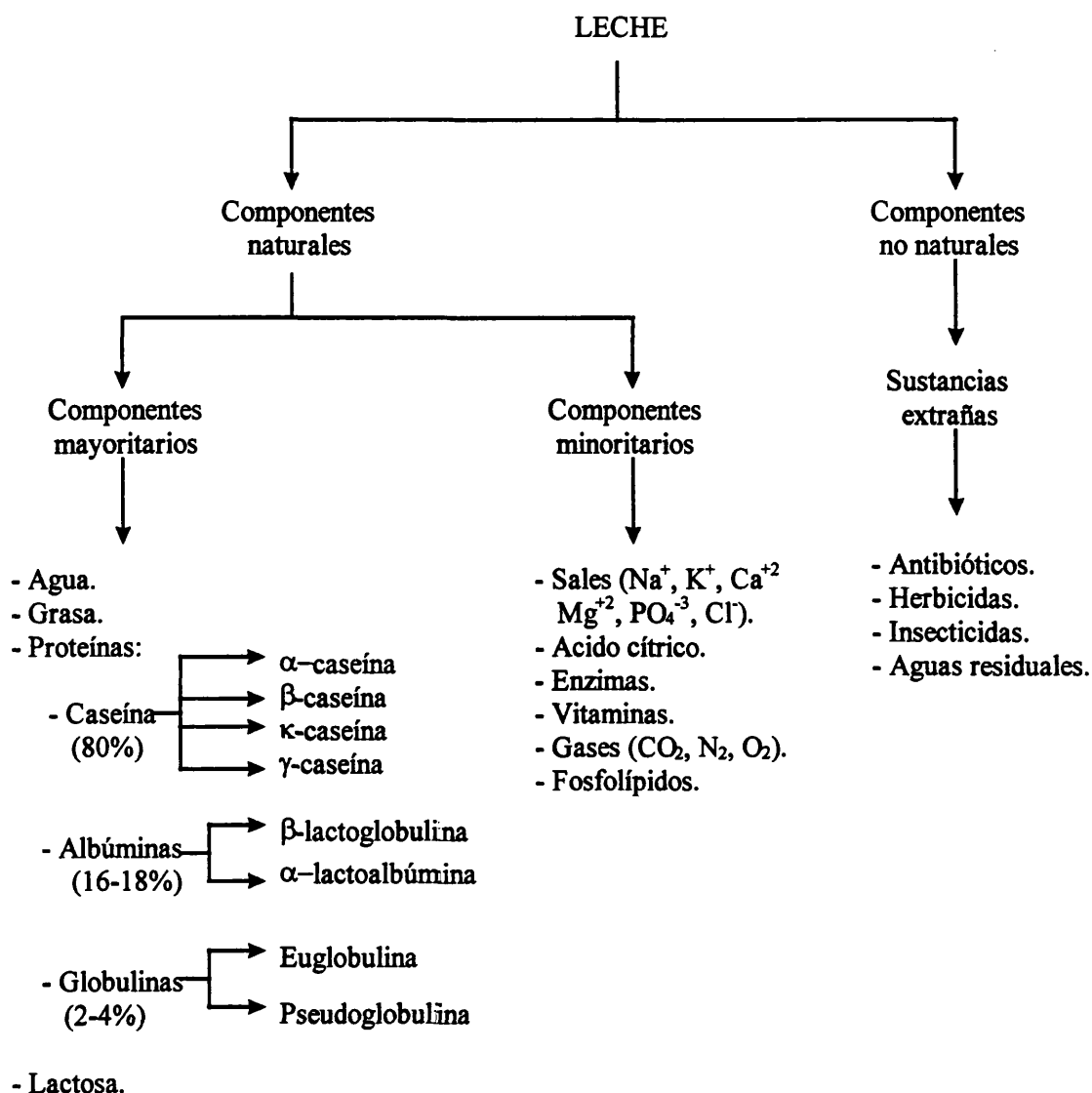


Figura 3.1. Esquema de las sustancias presentes en la leche (Spreer, 1991).

Las grasas se encuentran en la leche en una proporción que oscila entre el 3.2 y el 6%. Se encuentran como glóbulos grasos de forma esférica, que constan de núcleo y envoltura. El núcleo está compuesto por triglicéridos formados por un éster de un alcohol trivalente, como el glicerol o propanotriol y ácidos grasos monocarboxílicos. La envoltura, llamada también membrana, es una formación compleja formada por varias capas. La capa que envuelve directamente el núcleo del glóbulo está formada por triglicéridos de alto punto de fusión que penetran en la capa de fosfolípidos, que es la siguiente. Los fosfolípidos constan fundamentalmente de lecitina y cefalina. Esta capa está envuelta a su vez por otra formada por proteínas de membrana, cuya estructura es similar a la de las globulinas y que ocasionalmente contiene euglobulina.

El contenido de proteínas presentes en la leche oscila entre el 3 y el 3.6%. Los componentes estructurales básicos de las proteínas son los aminoácidos; éstos forman, por uniones de distintos tipos (enlaces peptídicos, puentes disulfuro, puentes de hidrógeno o enlaces iónicos) determinadas estructuras polipeptídicas, que a su vez se unen entre sí formando las proteínas. Éstas se clasifican en base a los componentes obtenidos por el método de separación fraccionada en tres tipos: caseínas, albúminas y globulinas. Las caseínas constituyen un 80% de las proteínas presentes en la leche. Se pueden clasificar en cuatro tipos, α , β , γ y κ que se diferencian en la secuencia y proporción de residuos de fosfoserina que poseen. Esto hace que la sensibilidad de cada una de ellas respecto al Ca presente, sea diferente. Las tres primeras precipitan en presencia de iones calcio, mientras que la κ -caseína es la única que no precipita, por eso es la que se encuentra principalmente en la parte externa de la micela formando una capa protectora (Horne y Leaver, 1995). Por otro lado, el enzima activo presente en el cuajo, utilizado en la fabricación del queso, es muy específico y actúa solamente con la κ -caseína. Esta reacción permite la desestabilización de las micelas seguida de su posterior agregación, y se favorece por la localización de la κ -caseína en la superficie de la micela, fácilmente accesible al enzima y en una posición importante para favorecer la estabilidad micelar.

Las albúminas y globulinas se llaman también proteínas séricas o del lactosuero. La más interesante desde el punto de vista tecnológico es la β -lactoglobulina, que a $T > 74^{\circ}\text{C}$ se desnaturaliza, forma grumos y libera grupos sulfhidrilo, que son los responsables del sabor a cocido que a veces presenta la leche.

Por último, la lactosa juega un importante papel tecnológico en todos los procesos de acidificación de la leche, ya que representa el sustrato nutritivo para las bacterias lácticas.

3.1.2. Obtención de productos lácteos gelificados

Un grupo de reacciones importantes de las proteínas de la leche son aquellas que implican la desestabilización de las micelas de caseína. Estas reacciones ocurren cuando el pH de la leche se reduce. Inicialmente, el fosfato cálcico se solubiliza y, como consecuencia, la estructura micelar nativa se desintegra. A un pH de 4.6, que es el punto isoeléctrico de las caseínas, se produce la precipitación de las mismas. Aunque esta reacción puede considerarse reversible aumentando el pH de la leche a su valor original (6.7, aproximadamente), nunca se vuelve a recuperar la forma original de las micelas. Por tanto, se considera que la acidificación es la base para la formación de muchos productos fermentados gelificados, entre los que se encuentra el yogur como principal producto (Muir, 1998).

Para obtener productos gelificados a partir de leche se pueden señalar tres procesos: la fermentación de la leche por medio de bacterias acidolácticas (método

que posteriormente será tratado con mayor extensión), la acción enzimática del cuajo y la acidificación directa por medio de un ácido alimentario o una lactona.

3.1.2.1. Acidificación enzimática

Este método consiste en la hidrólisis de los enlaces peptídicos específicos de las caseínas provocada por los enzimas proteolíticos característicos del cuajo y se utiliza principalmente en la fabricación del queso (Dejmek, 1987 y Zoon y col., 1990). Sin embargo, también se puede utilizar para la fabricación de productos tales como yogur o cuajada combinándolo con la acidificación de la leche. Esta acidificación puede realizarse de diferentes maneras. Roefs y col. (1990) realizaron la acidificación de la leche a 0-2°C con HCl 3N hasta obtener valores de pH situados en el intervalo 4.4-5.8. A pH 5.15, encontraron un cambio brusco en las características del gel obtenido. Por debajo de este valor, el gel era similar a los geles ácidos de leche, mientras que a pH superiores, los geles presentaban iguales características que los geles obtenidos con cuajo sin acidificar. Esto es debido a que el tipo de fuerzas de interacción es diferente en cada caso. En este último, las principales interacciones electrostáticas de atracción se deben al fosfato cálcico micelar, mientras que en el primer caso, el fosfato cálcico se disuelve y las fuerzas electrostáticas se atribuirían a otro tipo de componentes.

Lucey y col. (1996), al igual que Roefs, realizaron la acidificación con HCl, pero luego neutralizaron la leche con NaOH. Los geles formados con este método presentaban mejores propiedades que las de los geles hechos sin neutralizar la leche. Posiblemente, esto se debe a un aumento de la actividad de los iones calcio. El Ca^{+2} tiene un papel importante en la reducción de la repulsión existente entre las caseínas cargadas negativamente a pH 6.7, ya que se produce un aumento en el índice de agregación durante la coagulación de la leche. Sin embargo, el sistema micelar no recupera totalmente su estructura al neutralizar la disolución acidificada, aunque sí se pueden formar micelas de caseína artificiales con la adición de Ca, Mg, fosfato o citrato con características similares a las micelas iniciales.

Otro método para efectuar la acidificación de la leche es la utilización de ácido láctico en lugar de HCl (Tobitani y col., 1995) o la combinación de un cultivo estárter con la adición de cuajo (Bohlin y col., 1984).

3.1.2.2. Acidificación directa

La acidificación directa de productos lácteos empezó a realizarse a escala comercial en el año 1962. El primer producto que se fabricó utilizando esta método fue la crema agria. Los cambios químicos y físicos que se producen al pasar de una crema fluida, al pH natural de la leche, a un gel tixotrópico, a pH 4.4-4.5, tiene lugar

en pocos minutos, frente a las 12-16 h que lleva una fermentación tradicional. Otro producto que también se empezó a producir comercialmente es el queso tipo holandés. El agente acidificante más adecuado para este producto es la glucono- δ -lactona (GDL). Cuando ésta se disuelve en la leche, se hidroliza a ácido glucónico dando lugar a un descenso del pH hasta llegar a la cercanía del punto isoeléctrico de la caseína, proceso similar al que se produce en la formación de ácido láctico en la fermentación tradicional. Esto da lugar a una coagulación lenta y gradual de la leche (Little, 1967).

Harwalkar y col. (1977) en un primer trabajo de una serie que publicaron a lo largo de 4 años propusieron el uso de GDL para la preparación de geles ácidos de leche. Compararon la firmeza de geles preparados con bacterias acidolácticas con la de geles obtenidos mediante la adición de GDL a temperaturas elevadas (90°C). En el caso del yogur (fermentación tradicional) los preparados con leche precalentada tenían doble firmeza que los hechos con leche sin precalentar. También compararon la firmeza de los geles preparados con leche precalentada o sin precalentar cuando se adicionó la GDL a 44°C y no aparecieron diferencias. Por otro lado, si la GDL se adiciona a 90°C la firmeza de los geles obtenidos era considerablemente superior a la de los yogures o a la de los geles preparados con GDL adicionada a 44°C. Esta diferencia se debe al rápido desarrollo del ácido glucónico a 90°C, que es la temperatura a la que se produce la gelificación, en contraposición al lento desarrollo del ácido láctico a 44°C, que es la temperatura de incubación del fermento. Esto último se debe a que las fuerzas que unen las micelas de caseína dentro de la red que se forma, parecen más fuertes cuando se combina el efecto de disminución de pH y alta temperatura.

Posteriormente, Harwalkar y Kalab (1980) estudiaron la influencia de diversos factores tales como el pH, sólidos totales presentes, precalentamiento de la leche y temperatura de gelificación sobre el comportamiento reológico de geles de leche acidificados con GDL. Al variar el pH se observaron diferencias en la microestructura de las muestras. Los geles formados a pH bajos estaban constituidos por micelas de caseína más grandes y más unidas entre sí que los obtenidos a valores de pH altos. A un mismo valor de pH pero diferente porcentaje de sólidos totales se observó que la firmeza aumentaba al aumentar el porcentaje de sólidos mientras que la sinéresis disminuía. Este factor fue estudiado con más detalle en un trabajo anterior (Kalab y Harwalkar, 1974) donde se observó que al pasar de 40% a 60% de sólidos totales aparecían diferencias en la disposición de las micelas. Con un 40%, las micelas aparecían bien definidas dentro de la estructura de la red. Sin embargo, al aumentar el contenido de sólidos al 60%, sólo unas pocas micelas mantenían su individualidad y el resto estaba formando una estructura más compacta que podría ofrecer una mayor resistencia a la penetración en ensayos de firmeza. Respecto del precalentamiento de la leche y temperatura de gelificación se llegó a la misma conclusión que en el estudio anterior. Los geles obtenidos sin precalentamiento de la leche presentaron menor firmeza y más susceptibilidad a la sinéresis que los

preparados con precalentamiento. Esto es debido a la agregación de las micelas de caseína en aglomerados (*clusters*) en los primeros, en lugar de disponerse en forma de cadenas mediante enlaces hidrofóbicos que se fortalecen al aumentar la temperatura. Por tanto, concluyeron que la relación existente entre el comportamiento reológico y la microestructura de las muestras estudiadas era más dependiente de la distribución y estructura de las micelas de caseína que de su tamaño o forma.

Banon y Hardy (1991 y 1992) utilizaron GDL como agente acidificante para estudiar las diferentes etapas de la coagulación ácida de la leche mediante técnicas turbidimétricas. El primer paso supone el colapso de la capa exterior de las micelas, que es la responsable de las propiedades dinámicas y electrocinéticas de las mismas. Se produce un descenso en la viscosidad hidrodinámica que ocurre tanto a temperaturas bajas (15-20°C) como a temperaturas más altas (30-42°C). Posteriormente, pero sólo a temperaturas de 15-20°C, se produce un descenso de la turbidez a la vez que un aumento de la viscosidad hidrodinámica debido a la solubilización de las micelas de caseína. Esta solubilización está relacionada con la falta de interacciones hidrofóbicas, que son las que evitan la disociación de las partículas de caseína. Por último, las partículas de caseína se agregan y se produce la gelificación. Un aumento de la turbidez, de la viscosidad hidrodinámica y del tamaño de partícula junto con una disminución de las proteínas solubles en condiciones similares de pH y temperatura, son algunos de los índices que indican esta agregación de las micelas de caseína.

La posibilidad de poder controlar la firmeza y la acidez de estos productos por la cantidad de GDL adicionada, hace que sea un método útil para obtener una gran variedad de productos de diferente textura.

Por otro lado, como ya se ha dicho anteriormente, el proceso de hidrólisis de la GDL en ácido glucónico se acelera mediante calentamiento (Hashizume y Sato, 1988). Estos autores estudiaron la gelificación de la leche a diferentes temperaturas. Los geles obtenidos mediante un precalentamiento de la leche inferior a 70°C eran más débiles y presentaban mayor sinéresis que los preparados con un precalentamiento a 80°C.

En un trabajo más reciente (Amice-Quemeneur y col., 1995) se comparó la acidificación directa, mediante el uso de GDL, con la fermentación tradicional, para aplicación en bebidas lácteas acidificadas preparadas con pectinas. Los autores concluyeron que la acidificación química de la leche con GDL puede ser utilizada para producir geles lácteos ácidos con una textura poco firme y similar a los productos preparados por fermentación tradicional pero señalaron que es necesario un precalentamiento (90°C) de la leche para obtener buenas propiedades texturales en los geles finales. El calentamiento de la leche a temperaturas superiores a 80°C da lugar a la formación de un complejo entre la β -lactoglobulina desnaturalizada y la κ -caseína (Kim y Kinsella, 1989). Esto provoca cambios complejos en la

estructura de las micelas de caseína que pueden facilitar la formación de la red. A su vez, estos cambios producidos dependen de la temperatura. En este mismo trabajo se estudió el proceso de gelificación de leche acidificada con GDL a diferentes temperaturas. Adicionaron GDL a leche a 35, 40, 45, 50 y 55°C y observaron que la gelificación se producía a las 3 h, 128 min, 68 min, 33 min y 16 min, respectivamente. Por tanto, la hidrólisis de la GDL a ácido glucónico es más rápida al aumentar la temperatura. A altas temperaturas se acelera el proceso de agregación de las micelas de caseína para formar la estructura tridimensional de la red, mientras que a bajas temperaturas aumenta el impedimento estérico de la β -caseína presente en la micela, impidiendo su agregación. Además, como ya se mencionó, un precalentamiento de la leche a 90°C durante 5 min acelera el proceso de gelificación de la leche y facilita la formación de la red proteica.

Según lo expuesto, puede verse que el calentamiento es uno de los pasos fundamentales en la preparación de productos lácteos gelificados. Kalab y col. (1971) afirmaron que los geles de leche inducidos por calor constituyen una posible base potencial para el desarrollo de nuevos productos y que las medidas de firmeza de estos geles permiten estudiar sus características texturales.

En un trabajo posterior, Kalab y col. (1973) estudiaron la firmeza de geles de leche inducidos con calor en presencia de varios aditivos, tales como el agar, gelatina y almidón, entre otros, y la compararon con la de otros productos comunes como queso, salchichas, hamburguesas y geles de proteínas de suero y de soja. En general, la presencia de aditivos modificó la firmeza de los geles de leche, y para todos la firmeza se ve afectada por la temperatura en el intervalo entre 10°C y 60°C. En cuanto a los productos estudiados, la dependencia de la firmeza con el calor fue variable.

Haciendo un resumen, se puede afirmar que la firmeza de los geles de leche inducidos por calor aumenta cuando se aumenta el porcentaje de sólidos totales, cuando se precalienta la leche a 90°C o cuando se añade GDL a altas temperaturas. Combinando los efectos del precalentamiento de la leche a 90°C y la acidificación, se podrían desarrollar nuevos productos lácteos gelificados dentro del intervalo de pH 5.0-5.7 (Goddard y Augustin, 1995).

En los últimos años han aparecido en el mercado productos lácteos que no poseen un sabor tan ácido como los yogures tradicionales, ni tienen una textura tan débil y cremosa. Hoy en día existe un gran abanico de texturas diferentes de la del yogur, con lo que se ha creado el interés en el estudio de los métodos de elaboración y estabilización de este nuevo tipo de productos gelificados. Para ello, se necesitan ingredientes funcionales que sean capaces de estabilizar o aportar textura. En este sentido, muchos hidrocoloides están encontrando cada vez mayor utilidad en esta área. Llama la atención que se encuentren relativamente pocos trabajos que traten sobre la formación de geles de hidrocoloides en leche (Grindrod y Nickerson, 1968 y

Xu y col., 1992). Se ha descrito que el carragenato y las gomas de guar y garrofin desarrollan mayores viscosidades en leche que en agua (Schmidt y Smith, 1992) y que el carragenato puede formar también geles con leche, debido a la conocida reactividad entre ambos, atribuida a la interacción electrostática altamente específica de los grupos sulfato del carragenato, cargados negativamente, con la κ -caseína (Lynch y Mulvihill, 1994). De hecho muchos productos del mercado como la cuajada, el *quark* y las *mousses*, entre otros, utilizan carragenato como estabilizante. También se han estudiado las pectinas por su capacidad de desarrollo de buenas texturas en un amplio intervalo de productos ácidos de leche desde postres hasta quesos cremosos (Amice-Quemeneur y col., 1995 y Macfadyen, 1992).

3.1.3. La gelatina como ingrediente en los productos lácteos

Las propiedades funcionales de la gelatina la dotan para encontrar una amplia aplicación en la industria alimentaria en la que se utiliza como gelificante, espesante y estabilizante. Estas propiedades se pueden resumir en su capacidad para formar geles sola o en combinación con otros hidrocoloides, su propiedad emulsionante, su capacidad de formación de espuma, de prevención de la sinéresis y de mejora de la consistencia. La gelatina también se ha utilizado como estabilizante en diversas formulaciones, en particular, en emulsiones (Chesworth y col., 1985; Castle y col., 1988; Chen y Dickinson, 1995 y Galazka y Dickinson, 1995); en mantequillas bajas en calorías (Janssens y Muyldermans, 1994) y en mayonesas y salsas (Hagerman, 1990), pero no se tiene referencia de su uso en la elaboración de geles en leche.

Debido a que es una proteína, constituye un ingrediente nutritivo que no tiene el status legal de aditivo. La compatibilidad de la gelatina con las proteínas de la leche la haría útil como ingrediente funcional (Rother, 1993; Krishnakumar y Gordon, 1995; Rother, 1995 y Poppe, 1997). Cuando la gelatina se calienta para su disolución en leche y luego se enfría, se obtiene un gel de textura delicada. La gelatina hace una aportación importante a la textura del producto y a su palatabilidad, debido a su propiedad única de fundir a la temperatura de la boca confiriendo una percepción parecida a la de las grasas y además tiene un sabor neutro. Otra característica importante que además afecta a la calidad del producto terminado es su capacidad para inhibir la sinéresis que puede sufrir dicho producto durante el proceso o el almacenamiento, debido a que las moléculas de gelatina forman una red que mantiene retenida el agua en su interior (Walstra y col., 1985). Por tanto, el uso de la gelatina puede también ayudar a prolongar la vida media de este tipo de productos.

El objetivo de esta parte del trabajo es analizar el uso potencial de la gelatina para la producción de geles de leche, tanto acidificados como al pH natural de la leche, de texturas muy diferentes, mediante el estudio del comportamiento reológico y textura final de los mismos.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Materia prima

Para la preparación de los geles de leche en el presente estudio, se emplearon los siguientes productos: leche en polvo desnatada (Nestlé, Boué, Francia); gelatina obtenida a partir de piel de cerdo mediante una extracción ácida (tipo A, pH 5.40 y viscosidad 26 mp) y gelatina obtenida a partir de piel bovina mediante una extracción con álcali (tipo B, pH 5.90 y viscosidad 31 mp), ambas con una fuerza nominal de 230°Bloom (SBI- Systems Bio-Industries, Baupre, Francia) y glucono- δ -lactona (GDL) (Merck, Darmstadt, Alemania) como agente acidificante.

3.2.2. Reconstitución de la leche

La leche reconstituida se preparó a partir de leche en polvo desnatada a una concentración de 10% (p/p) de sólidos en agua destilada. La disolución así obtenida tuvo un pH 6.8 a 10°C.

3.2.3. Preparación de geles de leche en frío

3.2.3.1. Preparación de la leche acidificada

Para la obtención de la leche acidificada se utilizó GDL como agente acidificante. Debido a que la cantidad de GDL adicionada controla la acidez final de las muestras, que también depende de la temperatura, se efectuó un estudio preliminar para determinar el pH de coagulación de la leche a 40°C (temperatura a la que hay que calentar la leche para disolver la gelatina). Se encontró que a esta temperatura la leche coagulaba por debajo de pH 5.2. Por tanto, los valores de pH seleccionados para efectuar esta parte del estudio fueron 5.8 y 5.3, además del pH inicial de la leche. Se añadieron las cantidades necesarias de GDL para obtener dichos valores de pH a las muestras de leche reconstituida, se agitaron rápidamente y se mantuvieron 24 h a 10°C.

3.2.3.2. Preparación de los geles en agua y en leche

Se utilizaron dos clases de gelatina, gelatina tipo A y B. Se adicionaron ambos tipos de gelatina a cuatro concentraciones diferentes (1.50, 3.00, 4.50 y 6.67%) a muestras de leche acidificada y sin acidificar, y a agua destilada, con el fin de obtener geles con texturas muy variadas. Se dejó reposar durante 1h para

que la gelatina se hinche a temperatura ambiente. En esta etapa, la gelatina puede absorber hasta 10 veces su propio peso de agua. La concentración de 6.67% es la concentración necesaria para determinar la fuerza Bloom (parámetro característico de la gelatina) (Johnston-Banks, 1990; Rother, 1993).

A continuación, las muestras se calentaron a 40°C hasta disolución total de la gelatina. La espuma que se pudiera haber formado en este proceso se retiró de la superficie de las soluciones. Posteriormente, se vertió la muestra en los recipientes adecuados para posteriores determinaciones y se almacenaron durante 17 h a 10°C.

El esquema del procedimiento empleado para la preparación de los geles a 10°C está resumido en la figura 3.2.

3.2.4. Preparación de geles de leche en caliente

3.2.4.1. Preparación de las disoluciones de gelatina

Para la preparación de las disoluciones se adicionó la gelatina a las concentraciones necesarias, a agua destilada y se procedió igual que en el apartado 3.2.3.2 excepto el almacenamiento en frío.

3.2.4.2. Preparación de los geles

Se mezcló la leche reconstituida y las disoluciones de gelatina preparadas en las concentraciones adecuadas para realizar su mezcla en la proporción 1:1 y cada mezcla resultante se vertió en recipientes de vidrio resistentes al calor. Se efectuó un calentamiento a 90°C durante 5 minutos y se añadió la cantidad de GDL necesaria para obtener los valores de pH de 5.8, 5.3 y 4.8. Este último no se podía alcanzar para los geles descritos en el apartado 3.2.3.2. ya que este valor se encuentra por debajo del punto de coagulación de la leche (5.2 a 40°C).

En este caso, la gelificación se produce al añadir GDL a las muestras ya calentadas a 90°C y mantenerlas a esa temperatura durante 10 minutos. Una vez formados los geles, se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente, para mantenerlos después durante 17 h a 10°C.

También se preparó una serie de geles, sin adicionar gelatina, a cada uno de los pH mencionados.

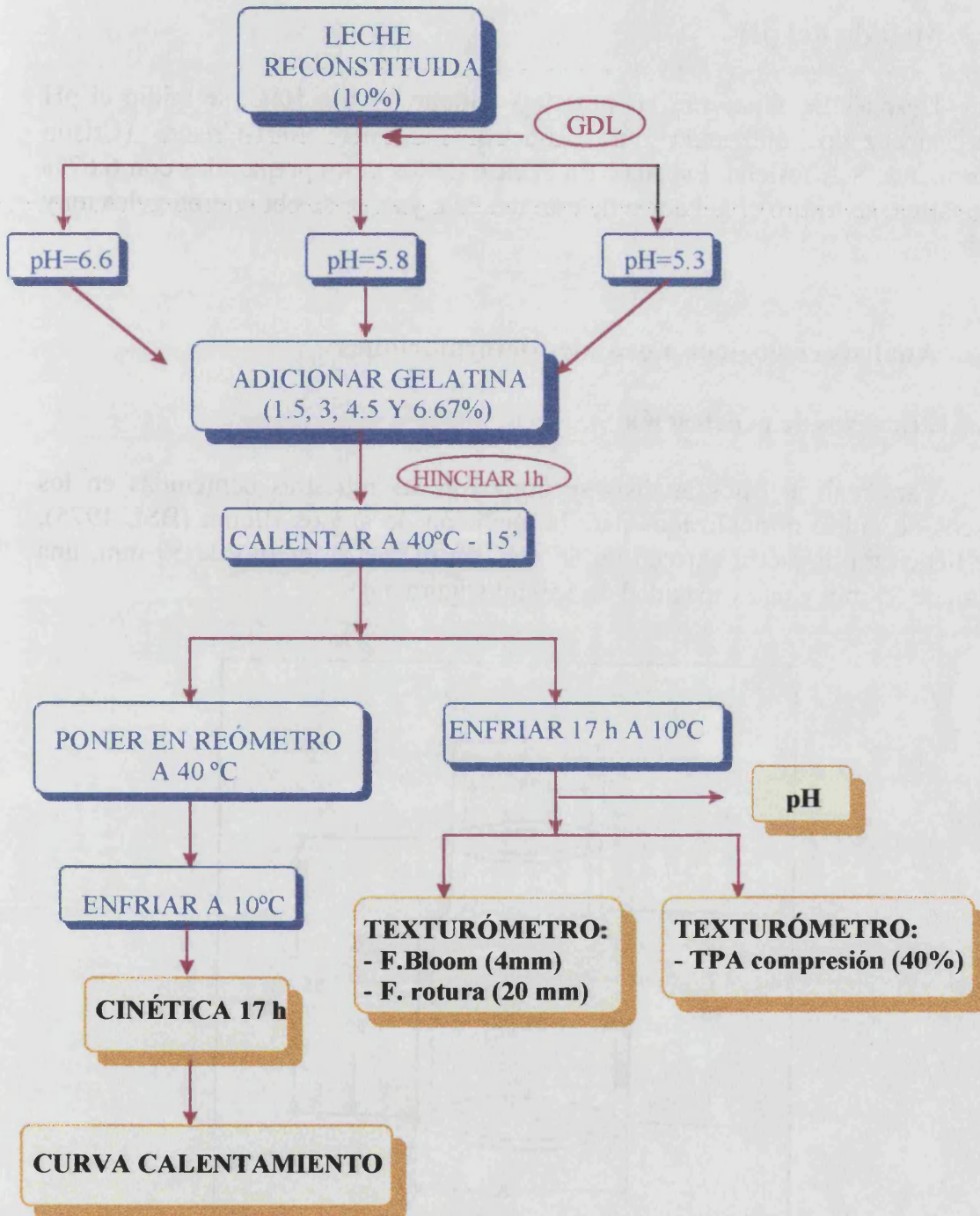


Figura 3.2 Esquema de preparación y determinaciones de los geles de gelatina en leche a 10°C.

El esquema del procedimiento empleado para la preparación de los geles a 90°C está resumido en la figura 3.3.

3.2.5. Medida del pH

Después de almacenar las muestras durante 17 h a 10°C, se midió el pH final alcanzado utilizando un pHmetro micropH 2001-Crison (Crison Instruments, S.A., Alella, España). En el caso de los geles preparados con 6.67% de gelatina, se trituro el gel antes de esta medida, ya que se obtuvieron geles muy duros.

3.2.6. Análisis reológicos a grandes deformaciones

3.2.6.1. Ensayos de penetración

Para realizar estos análisis se utilizaron las muestras contenidas en los frascos de vidrio normalizados para la medición de grados Bloom (BSI, 1975), que tienen un diámetro externo de 66 mm, un diámetro interno de 59 mm, una altura de 85 mm y una capacidad de 150 ml (figura 3.4).

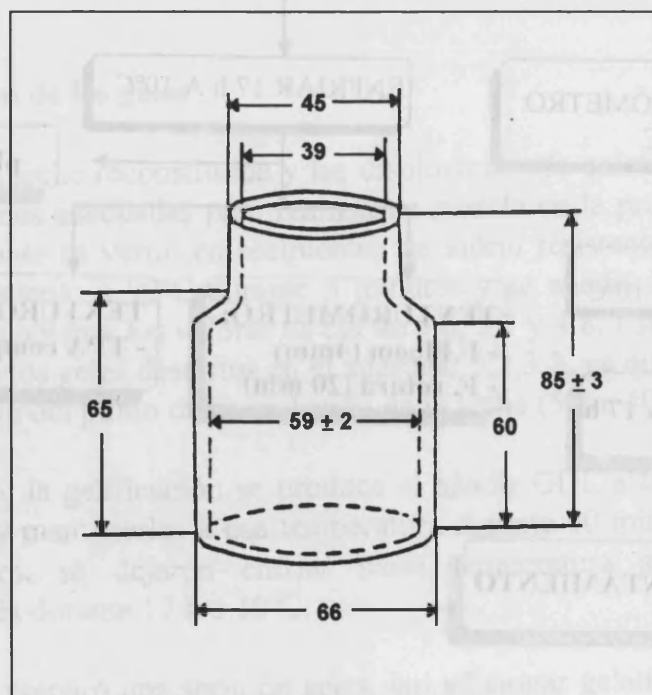


Figura 3.4. Esquema del frasco para determinar los grados Bloom de las gelatinas.

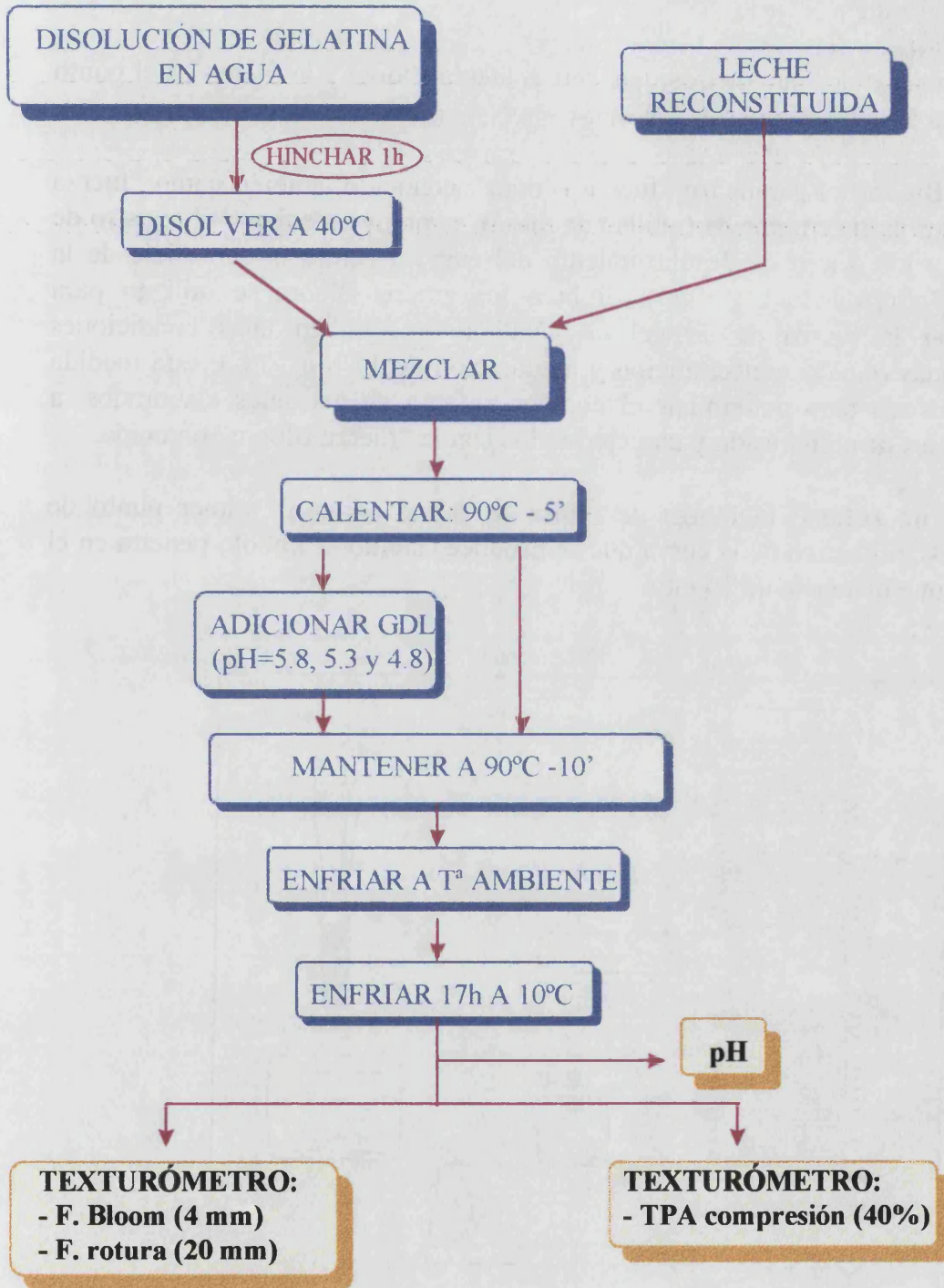


Figura 3.3. Esquema de preparación y determinaciones de los geles de gelatina en leche a 90°C.

Estos ensayos se realizaron utilizando un texturómetro TA-XT2 (Stable Micro Systems, Godalming, U.K.) con un émbolo cilíndrico de base plana de 12.7 mm de diámetro (A.O.A.C., 1980) (figura 3.5) y con una velocidad de cabezal de 1 mm/s.

Se determinaron dos parámetros, que son la fuerza Bloom y la fuerza en el punto de rotura, a la temperatura de 10°C.

- **Fuerza Bloom:** el parámetro “fuerza Bloom”, conocido también como “fuerza de gel”, expresada en gramos (unidad de masa), se obtuvo mediante el registro de la fuerza a los 4 mm de desplazamiento del émbolo contra la superficie de la muestra (Johnston-Banks, 1990). Si bien los grados Bloom se utilizan para caracterizar la fuerza de un gel de gelatina en agua en unas condiciones determinadas (6.67% concentración y maduración de 17 h a 10°C), esta medida se ha utilizado para determinar el comportamiento de los geles elaborados, a bajos niveles de compresión y caracterizarlos con la “fuerza Bloom” obtenida.

- **Fuerza de rotura:** la fuerza de rotura se define como el primer punto de inflexión significativo de la curva que se produce cuando el émbolo penetra en el gel hasta una distancia de 20 mm.

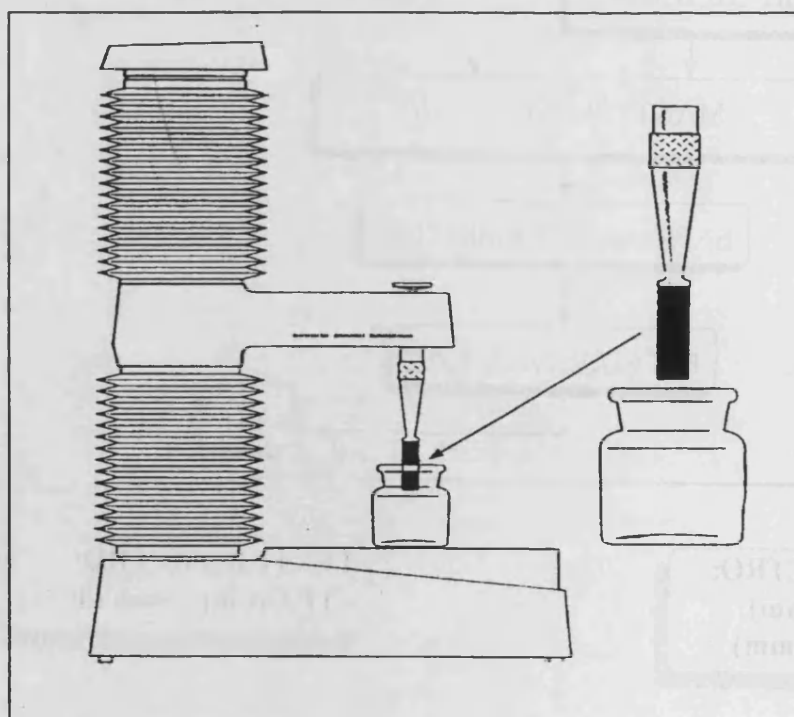


Figura 3.5. Esquema del texturómetro utilizado en los ensayos de penetración.

3.2.6.2. Ensayos de compresión: Análisis de perfil de textura instrumental

Para realizar el perfil de textura instrumental, TPA, después de desmoldarla, se cortaron las muestras contenidas en cristalizadores en cilindros de 17 mm de diámetro usando un sacabocados de acero inoxidable. Las muestras así obtenidas se colocaron en un anillo de acero de 17 mm de altura y bases paralelas y se cortaron ambas bases con una cuchilla fina. De esta forma se obtienen geles cilíndricos de 17 x 17 mm (Fizman y col., 1986).

Este ensayo se realizó con un émbolo de 75 mm de diámetro. Se realizaron dos ciclos consecutivos de compresión de 40% de deformación respecto de la altura inicial de la muestra para obtener un TPA (figura 3.6). Se dejó transcurrir un tiempo de 5 segundos entre ambos ciclos. Previamente se comprobó que este grado de compresión no producía la rotura de ninguna de las muestras.

Se registraron los siguientes parámetros primarios:

- Dureza: definida como la fuerza necesaria para alcanzar una deformación determinada (H, de la figura 3.6).
- Elasticidad recuperable retardada: definida como la relación entre la distancia recorrida durante la segunda compresión y la recorrida durante la primera compresión (b/a, de la figura 3.6) (Pons y Fizman, 1996; Fizman y col., 1998).
- Cohesividad: definida como la relación entre el área debajo de la segunda curva registrada y el área debajo de la primera (área2/área1, de la figura 3.6).

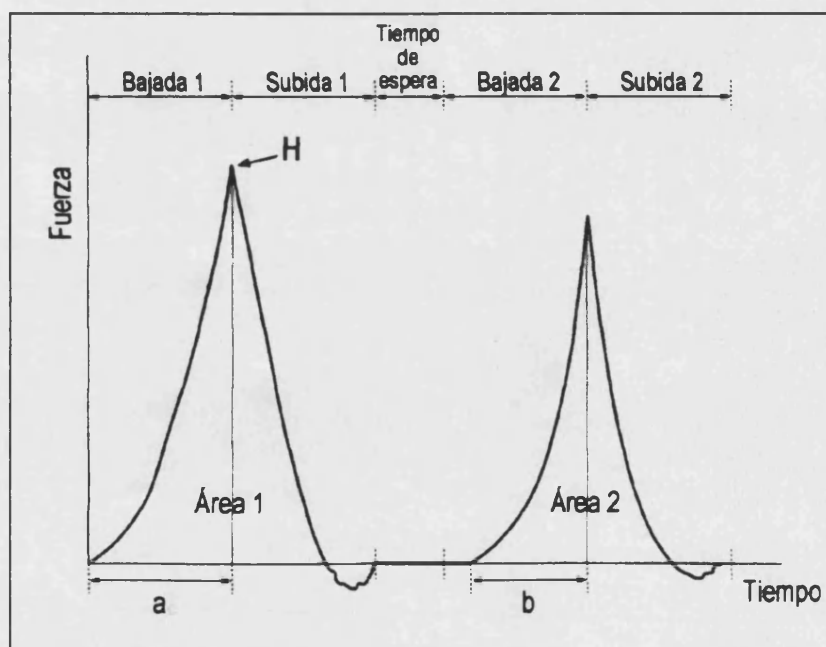


Figura 3.6. Esquema de un perfil de textura típico de un gel de gelatina.

3.2.7. Análisis reológicos a pequeñas deformaciones

Para todos los ensayos se utilizó un reómetro Physica Rheolab MC120 equipado con un sistema de medida cono-plato de 2° y 5 cm de diámetro (figura 3.7). Se efectuaron las medidas dinámicas oscilatorias poniendo alícuotas de las muestras aún líquidas (40°C) sobre el plato inferior de dicho reómetro.

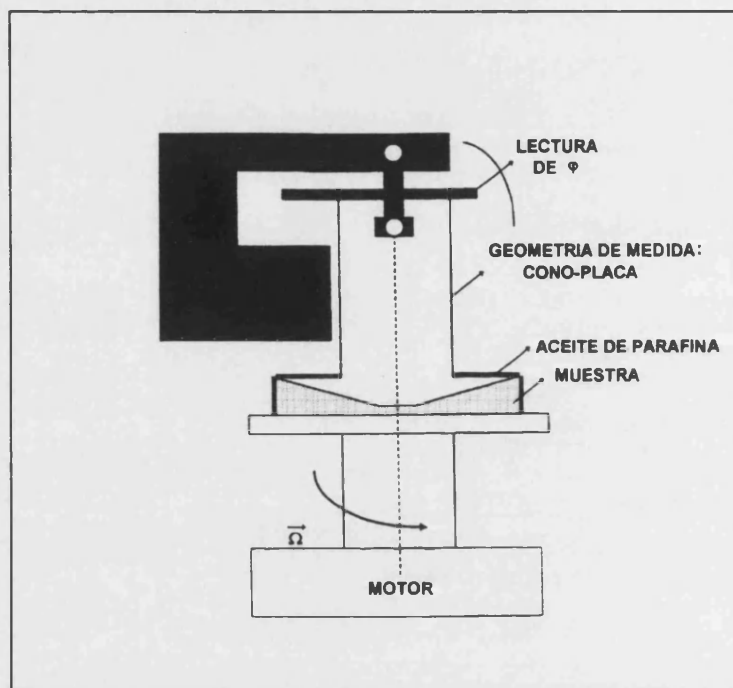


Figura 3.7. Esquema de la geometría cono-placa utilizada en los ensayos dinámicos.

Para proteger la muestra de la deshidratación por evaporación durante los ensayos, se aplicó parafina líquida a las superficies expuestas de la misma. Se disminuyó la temperatura a una velocidad constante de 1°C por minuto hasta 10°C, permitiendo así la formación del gel.

Todos los ensayos oscilatorios de esta parte del estudio se efectuaron a una frecuencia fija de 1Hz y a una amplitud de deformación del 10%. Se eligió esta frecuencia ya que de este modo se evitan problemas debido a la influencia del momento de inercia (si se trabaja a altas frecuencias) o a la duración de la medida (si se trabaja a muy bajas frecuencias).

3.2.7.1. Determinación de la región viscoelástica lineal

Para determinar la zona de viscoelasticidad lineal se realizó un barrido de amplitudes de deformación, fijando el valor de la frecuencia (1 Hz). El intervalo lineal se limita al correspondiente a amplitudes donde G' no varía en función de la amplitud de deformación. Los ensayos realizados fuera de la zona viscoelástica lineal pueden producir roturas de la estructura interna de la muestra, y como consecuencia, una pérdida irreversible de la energía interna (Schramm, 1994).

Los ensayos preliminares que se efectuaron en los geles de gelatina en leche mostraron que G' fue prácticamente constante en un amplio intervalo de amplitudes, como se observa en la figura 3.8; mientras que G'' presentó alguna variación a bajas deformaciones. A la vista de los resultados, se eligió una amplitud de deformación del 10% para todos los ensayos dinámicos, asegurando que se está dentro de la zona lineal viscoelástica.

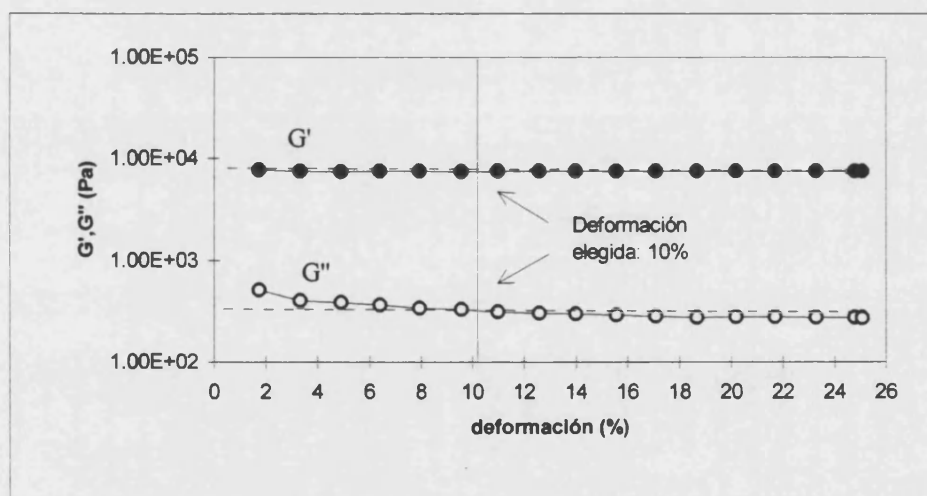


Figura 3.8. Determinación de la zona viscoelástica lineal para un gel de gelatina en leche.

3.2.7.2. Ensayo de cinética de maduración

Para estudiar la cinética de maduración, se realizó un ensayo de barrido de tiempo a 10°C durante 17 h, que es el tiempo necesario para que se forme un gel de gelatina estable. Se ha seleccionado este período de tiempo porque es el mismo que se utiliza para el almacenamiento de las muestras previo a las medidas de la fuerza Bloom.

3.2.7.3. Ensayo de barrido de temperaturas: determinación de la temperatura de fusión.

Después de haber madurado los geles durante 17 h a 10°C y medir su cinética, se efectuó un barrido de temperaturas calentando las muestras desde 10°C hasta 60°C a una velocidad de 1°C por minuto. Las temperaturas de fusión se pueden determinar a partir del punto en que G' y G'' se cruzan (punto de transición gel-sol) (Doublier y Cuvelier, 1996 y Fernández, 1998).

3.2.8. Análisis estadístico

Se elaboraron tres preparaciones de cada composición. Para el estudio de los efectos del pH y de la concentración de gelatina en la medida de la textura de los geles, se ha utilizado la técnica del Análisis de la Varianza (ANOVA), con un nivel de significación del 95%, usando el programa Statgraphics Plus para Windows versión 2.1.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Geles ácidos obtenidos en frío

Banon y Hardy (1991 y 1992) determinaron que el valor de pH al que tiene lugar el punto de coagulación de la leche inducida por ácido, se incrementa con la temperatura. Mediante técnicas turbidimétricas estudiaron que a 30°C la coagulación de la leche se producía a pH 5.35 y a 42°C se producía a pH 5.5. En otro estudio, Kim y Kinsella (1989) encontraron que, si la cantidad de GDL adicionada era suficiente para alcanzar el valor de pH 5.1, la gelificación de la leche comenzaba después de mantener la leche 2 horas a 40°C. De lo que puede deducirse que la gelificación es un proceso gobernado por el pH, por el tiempo y por la temperatura.

En el presente estudio, las muestras se calentaron a 40°C durante 15 minutos para que se disolviese la gelatina adicionada. Con el fin de averiguar cuál era el mínimo valor de pH que podía ser alcanzado por adición de GDL sin provocar la coagulación de la leche cuando luego ésta se calentaba en esas condiciones de tiempo y temperatura, se adicionaron distintas cantidades de GDL. Se determinó que ese mínimo valor de pH fue de 5.3 y se obtuvo con un 0.8% de GDL.

También se verificó que a ese valor de pH no ocurría una coagulación de las muestras, inducida por ácido, aun durante un almacenamiento de 48 h a 10°C. Por lo tanto, en el presente estudio se podría asegurar que la gelatina fue la responsable de la formación de la red y de la estructura de los geles finales. Los tres valores de pH seleccionados fueron 5.3, 5.8 y 6.6 (pH sin modificar de la leche reconstituida). Se seleccionaron cuatro niveles de concentración de gelatina: 1.5, 3.0, 4.5 y 6.67% (p/p) con el fin de obtener una gama de texturas muy amplia. El valor 6.67% corresponde a la concentración de gelatina del método oficial de medida de fuerza de gel o grados Bloom (BSI, 1975). Se estudió dos tipos de gelatina comercial: tipo A y tipo B.

En primer lugar se analizó si la adición de gelatina influía en el pH final de las muestras que, en principio, se pretendía alcanzar mediante la adición de GDL. Los valores de pH finales de los geles obtenidos con la adición de distintas cantidades de gelatina tipo A y B a las muestras de leche reconstituida neutra y acidificada se dan en la tabla 3.1.

Con la adición de gelatina tipo A se obtuvieron valores de pH algo menores, aunque no siempre significativos, que los de las respectivas muestras de leche. Estas disminuciones fueron del orden de una a dos décimas respecto de los correspondientes valores iniciales y aún menores, y no significativos en prácticamente todos los casos, cuando se adicionó la gelatina tipo B. Estos cambios en el valor de pH, si bien pequeños, deben considerarse al ajustar los correspondientes valores de los productos finales.

Tabla 3.1. Efecto de la adición de dos tipos de gelatina, a cuatro concentraciones, sobre el pH de geles de leche preparados a concentraciones de GDL diferentes¹.

GDL	GELATINA TIPO A				GELATINA TIPO B			
	1.50%	3.00%	4.50%	6.67%	1.50%	3.00%	4.50%	6.67%
0.0%	6.68a (0.04)	6.52a (0.01)	6.51a (0.03)	6.53a (0.01)	6.73a (0.07)	6.69a (0.04)	6.69a (0.04)	6.55a (0.05)
	6.78 ¹ a (0.02)	6.75 ¹ b (0.03)	6.76 ¹ b (0.06)	6.82 ¹ b (0.05)	6.82 ¹ a (0.08)	6.77 ¹ a (0.06)	6.74 ¹ a (0.01)	6.74 ¹ b (0.01)
0.4%	5.83a (0.01)	5.81a (0.01)	5.72a (0.01)	5.64a (0.06)	5.85a (0.02)	5.85a (0.03)	5.87a (0.05)	5.86a (0.01)
	5.88 ¹ a (0.01)	5.88 ¹ b (0.01)	5.89 ¹ b (0.01)	5.82 ¹ b (0.05)	5.89 ¹ a (0.01)	5.85 ¹ a (0.01)	5.90 ¹ a (0.03)	5.90 ¹ a (0.01)
0.8%	5.22a (0.03)	5.24a (0.05)	5.26a (0.16)	5.17a (0.13)	5.31a (0.02)	5.36a (0.04)	5.35a (0.07)	5.39a (0.01)
	5.33 ¹ a (0.04)	5.35 ¹ a (0.07)	5.38 ¹ a (0.12)	5.41 ¹ a (0.16)	5.37 ¹ a (0.01)	5.43 ¹ a (0.02)	5.42 ¹ a (0.07)	5.43 ¹ a (0.05)

¹Los valores entre paréntesis son las desviaciones estándar.

¹Valores de pH iniciales de las muestras de leche.

En la misma columna, y para cada concentración de GDL, valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) según el test LSD.

3.3.1.1. Análisis del comportamiento de los geles mediante ensayos reológicos a grandes deformaciones

3.3.1.1.1. Determinación de la fuerza Bloom y de la fuerza en el punto de rotura

Influencia del medio de gelificación

La comparación entre los valores de fuerza Bloom de los geles en agua y en leche sin acidificar mostraron que los correspondientes a agua son sólo ligeramente mayores, aunque significativos en algunos de los casos, que los de leche para todas las concentraciones de gelatina consideradas (tabla 3.2).

Esta pérdida de rigidez del gel puede atribuirse a la presencia de los componentes de la leche en el medio solvente. El efecto de estos componentes podría analizarse teniendo en cuenta los cambios de movilidad que producen las moléculas de agua en el medio (Ledward, 1992) aunque los parámetros mecánicos analizados dan una información macroestructural de los sistemas estudiados, y es difícil abordar una interpretación de su variación a partir de interacciones fisicoquímicas entre los componentes de las muestras.

La fuerza de rotura por penetración mostró una pauta similar al parámetro fuerza Bloom cuando se compararon los valores en agua y en leche (tabla 3.2). Además se puede señalar que, en la mayoría de los casos, el valor del desplazamiento del émbolo en el que tuvo lugar la rotura, fue significativamente mayor en geles de agua que en leche lo que reveló que los primeros tuvieron una mayor resistencia mecánica (Fizman y Durán, 1992). El análisis efectuado es válido tanto para la gelatina A como para la tipo B.

Tabla 3.2. Valores de la fuerza Bloom, fuerza de rotura y desplazamiento hasta rotura para geles de dos tipos de gelatina obtenidos en agua y en leche reconstituida sin acidificar*.

TIPO DE GELATINA	GELATINA	FUERZA BLOOM (g)		FUERZA ROTURA (N)		DESPLAZAMIENTO (mm)	
		LECHE	AGUA	LECHE	AGUA	LECHE	AGUA
A	1.50%	17a (1)	19a (1)	0.75a (0.03)	0.96a (0.14)	16.2a (0.7)	17.5a (1.2)
	3.00%	67a (4)	78b (6)	3.88a (0.30)	5.08a (0.16)	16.1a (0.9)	17.6a (0.1)
	4.50%	128a (1)	152b (7)	7.05a (0.13)	9.07a (0.61)	16.6a (0.5)	17.7b (0.5)
	6.67%	300a (4)	309a (5)	12.89a (0.09)	16.82b (0.83)	16.0a (0.9)	18.1b (0.6)
B	1.50%	14a (1)	16b (1)	0.56a (0.04)	0.57a (0.02)	15.3a (0.2)	16.3a (1.2)
	3.00%	57a (4)	61a (1)	2.96a (0.16)	3.23a (0.09)	16.6a (1.4)	17.1a (0.2)
	4.50%	123a (9)	133b (1)	5.42a (0.35)	7.84b (0.05)	15.8a (0.8)	18.7b (0.6)
	6.67%	242a (7)	257a (4)	10.71a (0.72)	16.82b (0.86)	15.4a (0.3)	20.0b (0.8)

*Los valores entre paréntesis son las desviaciones estándar.

En la misma fila, y para cada parámetro, valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) según el test LSD.

Influencia del pH, tipo y concentración de gelatina

La figura 3.9 muestra un perfil obtenido por penetrometría de un gel de gelatina en leche. Se obtuvieron curvas de forma similar para todo el intervalo de concentraciones analizado. Las curvas presentaron un pico neto de rotura, lo que indica la formación de un gel firme aun en el caso de la menor concentración de gelatina considerado en el presente capítulo (1.5%). Los valores de fuerza de rotura obtenidos para geles de 1.5% de gelatina son comparables a los encontrados por

Halwalkar y col. (1977) para geles de leche inducidos por adición de ácido, a pesar de que las condiciones experimentales de determinación de la firmeza no son exactamente las mismas. Por tanto, es posible crear geles de características texturales similares sin tener que efectuar un calentamiento de la leche. Concentraciones mayores de gelatina produjeron geles más firmes.

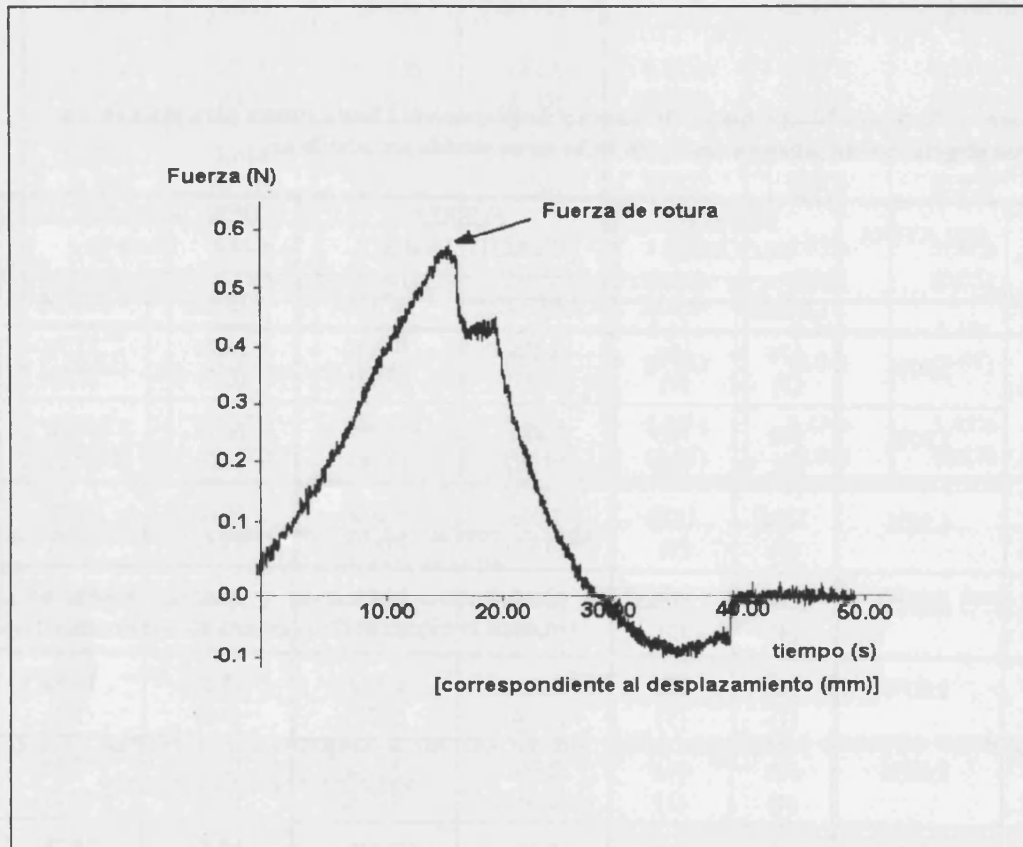


Figura 3.9. Perfil típico de fuerza de penetración hasta rotura obtenido para un gel de gelatina en leche (1.5% gelatina tipo A, pH 6.6).

Tanto los valores de la fuerza Bloom como los de fuerza en el punto de rotura se incrementaron, como cabía esperar, con la concentración de gelatina (tabla 3.3). En cuanto a la influencia del tipo de gelatina, se puede ver que los geles de gelatina tipo B mostraron valores significativamente menores para la fuerza de rotura, mientras que en el caso de la fuerza Bloom estas diferencias no fueron significativas en muchos casos.

Las principales diferencias entre las gelatinas tipo A y B son bien conocidas, especialmente en términos de algunas de sus propiedades físicas como su punto isoeléctrico y la viscosidad de sus soluciones, a igual fuerza nominal de gel (Poppe, 1997). Sin embargo, desde un punto de vista estructural, no es fácil analizar

cómo factores tan complejos como la distribución de peso molecular, la composición o secuencia de aminoácidos puede afectar su comportamiento (Ledward, 1986). De todos modos, a partir de los resultados obtenidos, se deduce que se debe tener en cuenta las posibles diferencias de comportamiento de ambos tipos de gelatina cuando se desarrollan nuevos productos.

Tabla 3.3. Valores de fuerza Bloom, fuerza de rotura y desplazamiento hasta rotura para dos tipos de geles de gelatina en leche preparados a cuatro concentraciones y a tres valores de pH diferentes*.

pH	CONCENT. GELATINA	FUERZA BLOOM (g)		FUERZA ROTURA (N)		DESPLAZAMIENTO (mm)	
		TIPO A	TIPO B	TIPO A	TIPO B	TIPO A	TIPO B
	1.50%	17a (1)	14a (1)	0.75a (0.03)	0.56b (0.04)	16.2a (0.7)	15.3a (0.2)
6.6	3.00%	67a (4)	57a (4)	3.88a (0.30)	2.96b (0.16)	16.1a (0.9)	16.6a (1.4)
	4.50%	128a (1)	123a (9)	7.05a (0.13)	5.42b (0.35)	16.6a (0.5)	15.8a (0.8)
	6.67%	300a (4)	242a (7)	12.89a (0.09)	10.71b (0.72)	16.0a (0.9)	15.4a (0.3)
	1.50%	15a (1)	15a (1)	0.83a (0.02)	0.71b (0.05)	16.9a (1.4)	17.0a (1.7)
5.8	3.00%	63a (7)	53a (5)	3.51a (0.21)	2.71b (0.32)	15.8a (1.1)	16.1a (1.2)
	4.50%	137a (14)	118a (10)	7.61a (0.41)	5.18b (0.57)	16.5a (0.3)	14.9a (0.6)
	6.67%	302a (3)	259b (1)	11.62a (0.97)	10.05b (0.17)	15.2a (0.4)	15.6a (0.6)
	1.50%	18a (1)	15b (1)	0.97a (0.01)	0.55b (0.04)	15.6a (1.0)	14.8a (1.2)
5.3	3.00%	74a (5)	54a (5)	3.64a (0.16)	2.05b (0.17)	14.9a (0.6)	13.4a (1.2)
	4.50%	147a (11)	118a (3)	7.09a (0.50)	4.94b (0.38)	14.9a (1.3)	14.2a (0.8)
	6.67%	298a (6)	234b (6)	13.3a (0.93)	9.57b (0.73)	14.4a (1.2)	14.4a (0.8)

*Los valores entre paréntesis son las desviaciones estándar.

En la misma fila, y para cada parámetro, valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) según el test LSD.

Con respecto a la variación del pH, en la mayoría de los casos no se encontraron diferencias significativas para este factor (tabla 3.4). Teniendo en cuenta que las zonas de unión de las cadenas de proteínas en los geles de gelatina son de naturaleza relativamente no polar (Ledward, 1986), el efecto de cambios pequeños de pH, y consecuentemente, sobre las cargas de la proteína, no debería ser muy marcado.

Una característica importante que tuvieron los geles obtenidos es que no presentaron sinéresis. Este hecho debe tomarse como una gran ventaja frente a la gama de geles lácteos inducidos por ácido sin adición de gelatina que, dependiendo de las condiciones de formación, tratamiento térmico durante el proceso, pH final o concentración de sólidos lácteos presentan en general un alto grado de sinéresis que representa una importante pérdida de calidad en el producto final (Kalab y col., 1976, Harwalkar y col., 1977, Harwalkar y Kalab, 1980 y Roefs y col., 1990).

3.3.1.1.2. Análisis de perfil de textura instrumental (TPA)

Debido a que el TPA instrumental es una técnica empírica, los resultados que se obtienen son comparativos si las condiciones de los ensayos están cuidadosamente normalizadas (Dannenbergh y Kessler, 1988, Pons y Fiszman, 1996). Por lo tanto, se efectuaron ensayos preliminares con el objetivo de seleccionar la magnitud de la deformación que sería impuesta a todas las muestras. Para esto, se cortaron pequeños cilindros (17 x 17 mm) de las muestras de geles y se sometieron a compresión uniaxial hasta su rotura. Los geles correspondientes a 1.5% de gelatina no se pudieron medir ya que por su debilidad no fue posible sacarlos de dentro del molde sin romperlos.

En una revisión reciente sobre este tema, se ha destacado que en sistemas gelificados comúnmente se aplican grados de deformación entre 20 y 50% (Pons y Fiszman, 1996). A estos niveles de compresión, se puede obtener una valiosa información sobre la evolución de parámetros como dureza, elasticidad y cohesividad. Normalmente a mayores deformaciones la muestra de gel se rompe completamente durante el primer "mordisco", produciendo porciones o pequeños trozos de la muestra inicial y de esta forma, pierde sentido físico la medición de los valores de elasticidad y de cohesividad que tienen en cuenta el segundo ciclo de compresión.

Se efectuó un ensayo preliminar de compresión para determinar a qué nivel de deformación se rompían las muestras. Los valores de la deformación en la rotura obtenidos variaron dentro de un intervalo que fue desde el 50%, medido respecto de la altura inicial de la muestra, para los geles en leche del 3% de gelatina tipo B hasta 72% de deformación para los geles en leche del 6.67% de gelatina tipo A, ambos sin adición de GDL. Teniendo en cuenta estos resultados, se eligió una deformación de 40% para ser aplicada a todas las muestras y evitar su rotura durante el ensayo.

Tabla 3.4. Valores de fuerza Bloom, fuerza de rotura y desplazamiento hasta rotura para dos tipos de geles de gelatina en leche preparados a tres valores de pH diferentes. Comparación entre los tres valores de pH*.

TIPO GELAT.	CONCENT. GELATINA	FUERZA BLOOM (g)			FUERZA ROTURA (N)			DESPLAZAMIENTO (mm)		
		pH 6.6	pH 5.8	pH 5.3	pH 6.6	pH 5.8	pH 5.3	pH 6.6	pH 5.8	pH 5.3
A	1.50%	17a (1)	15b (1)	18a (1)	0.75a (0.03)	0.83b (0.02)	0.97c (0.01)	16.2a (0.7)	16.9a (1.4)	15.6a (1.0)
	3.00%	67a (4)	63a (7)	74a (5)	3.88a (0.30)	3.51a (0.21)	3.64a (0.16)	16.1a (0.9)	15.8a (1.1)	14.9a (0.6)
	4.50%	128a (1)	137a (14)	147a (11)	7.05a (0.13)	7.61a (0.41)	7.09a (0.50)	16.6a (0.5)	16.5a (0.3)	14.9a (1.3)
	6.67%	300a (4)	302a (3)	298a (6)	12.89a (0.09)	11.62b (0.97)	13.30a (0.93)	16.0a (0.9)	15.2a (0.4)	14.4a (1.2)
B	1.50%	14a (1)	15a (1)	15a (1)	0.56a (0.04)	0.71b (0.05)	0.55c (0.04)	15.3a (0.2)	17.0a (1.7)	14.8a (1.2)
	3.00%	57a (4)	53a (5)	54a (5)	2.96a (0.16)	2.71b (0.32)	2.05c (0.17)	16.6a (1.4)	16.1a (1.2)	13.4b (1.2)
	4.50%	123a (9)	118b (10)	118b (3)	5.42a (0.35)	5.18 ^a (0.57)	4.94a (0.38)	15.8a (0.8)	14.9a (0.6)	14.2b (0.8)
	6.67%	242a (7)	259a (1)	234a (6)	10.71a (0.72)	10.05 ^a (0.17)	9.57a (0.73)	15.4a (0.3)	15.6a (0.6)	14.4b (0.8)

*Los valores entre paréntesis son las desviaciones estándar.

En la misma fila, y para cada parámetro, valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) según el test LSD.

Obtención de geles de gelatina en leche mediante acidificación directa

Influencia del medio de gelificación

La comparación entre los valores de los parámetros obtenidos con el TPA (dureza, elasticidad y cohesividad) de los geles preparados en agua y en leche sin acidificar mostró que, a diferencia con la fuerza Bloom y con la fuerza de rotura, prácticamente en todos los casos, no hubo diferencias significativas entre ellos (tabla 3.5).

Para la gelatina tipo A, no hubo diferencias significativas para los valores de los tres parámetros estudiados obtenidos entre los geles en agua y en leche. Sin embargo, para la gelatina tipo B, el parámetro dureza sí que presentó alguna diferencia entre ambos medios de gelificación a las más altas concentraciones de gelatina.

Como se dijo en el apartado anterior, es difícil explicar el diferente comportamiento debido al tipo de gelatina presente en el gel, debido a su compleja composición.

Tabla 3.5. Valores de dureza, elasticidad y cohesividad obtenidos a partir del TPA (compresión del 40%) para dos tipos de geles de gelatina obtenidos en agua y en leche reconstituida sin acidificar*.

TIPO GELATINA	CONCENT. GELATINA	DUREZA (N)		ELASTICIDAD		COHESIVIDAD	
		LECHE	AGUA	LECHE	AGUA	LECHE	AGUA
A	3.00%	0.94a (0.07)	0.94a (0.02)	0.96a (0.01)	0.98a (0.02)	0.90a (0.04)	0.83a (0.02)
	4.50%	1.76a (0.09)	1.60a (0.06)	0.94a (0.02)	0.95a (0.02)	0.87a (0.06)	0.85a (0.02)
	6.67%	2.75a (0.17)	2.73a (0.12)	0.94a (0.01)	0.94a (0.03)	0.88a (0.03)	0.85a (0.05)
B	3.00%	0.74a (0.06)	0.76a (0.02)	0.95a (0.01)	0.95a (0.01)	0.92a (0.03)	0.90a (0.02)
	4.50%	1.16a (0.09)	1.43b (0.07)	0.94a (0.03)	0.98a (0.02)	0.88a (0.01)	0.90a (0.01)
	6.67%	2.43a (0.09)	2.64b (0.04)	0.95a (0.03)	0.96a (0.01)	0.98a (0.04)	0.89a (0.01)

*Los valores entre paréntesis son las desviaciones estándar. En la misma fila, y para cada parámetro, valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) según el test LSD.

Influencia del pH, tipo y concentración de gelatina

Los valores de dureza mostraron una pauta de evolución similar a la de la fuerza de penetración. Dichos valores resultaron eminentemente dependientes de la concentración de gelatina, es decir, a medida que la concentración de gelatina aumentó, el valor de la dureza fue mayor. Nuevamente, la gelatina tipo B demostró que confiere a los geles una menor resistencia mecánica que la tipo A y estas diferencias fueron aun mayores conforme disminuyó el pH (tabla 3.6).

Tabla 3.6. Valores de dureza para dos tipos de geles de gelatina en leche preparados a tres valores de pH diferentes*.

PH	CONCENT. GELATINA	DUREZA (N)	
		TIPO A	TIPO B
6.6	3.00%	0.94a (0.07)	0.74b (0.06)
	4.50%	1.76a (0.09)	1.16b (0.09)
	6.67%	2.75a (0.17)	2.43b (0.09)
5.8	3.00%	0.72a (0.03)	0.68b (0.08)
	4.50%	1.80a (0.04)	1.06b (0.05)
	6.67%	2.46a (0.16)	2.46a (0.17)
5.3	3.00%	1.04a (0.03)	0.57b (0.02)
	4.50%	1.64a (0.08)	1.21b (0.02)
	6.67%	2.98a (0.12)	1.99b (0.07)

*Los valores entre paréntesis son las desviaciones estándar.

En la misma fila, valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) según el test LSD.

La elasticidad recuperable retardada mostró valores muy altos en todos los casos. Éstos variaron entre 0.87 y 0.98, lo que significa que las muestras recuperaron prácticamente toda su altura inicial antes de que se inicie la segunda compresión. Los valores de cohesividad siguieron la misma pauta, los valores son altos para todas las muestras y fueron desde 0.83 a 0.90. No se encontraron patrones significativos en la evolución de ninguno de ambos parámetros respecto de ninguna de las variables de composición analizadas (tabla 3.7), indicando un componente de recuperación importante en la estructura de la red de los geles con uniones estables que confieren unidad a la masa, independientemente del intervalo de pH analizado en este estudio, del tipo y concentración de gelatina.

Tabla 3.7. Valores de dureza, elasticidad y cohesividad para dos tipos de geles de gelatina en leche preparados a tres valores de pH diferentes*.

TIPO	CONCENT. GELATINA	ELASTICIDAD			COHESIVIDAD		
		pH 6.6	pH 5.8	pH 5.3	pH 6.6	pH 5.8	pH 5.3
A	3.00%	0.96a (0.01)	0.92a (0.07)	0.94a (0.02)	0.90a (0.04)	0.87a (0.04)	0.88a (0.01)
	4.50%	0.94a (0.02)	0.955a (0.004)	0.936a (0.004)	0.87a (0.06)	0.89a (0.03)	0.88a (0.01)
	6.67%	0.94a (0.01)	0.94a (0.01)	0.90a (0.02)	0.89a (0.03)	0.87a (0.03)	0.88a (0.02)
B	3.00%	0.95a (0.01)	0.95a (0.06)	0.89a (0.04)	0.92a (0.03)	0.94a (0.01)	0.80b (0.08)
	4.50%	0.94a (0.03)	0.90a (0.01)	0.91a (0.06)	0.88a (0.01)	0.86a (0.01)	0.88a (0.01)
	6.67%	0.95a (0.03)	0.96a (0.02)	0.93a (0.01)	0.90a (0.04)	0.87a (0.04)	0.85a (0.08)

*Los valores entre paréntesis son las desviaciones estándar.

En la misma fila, y para cada parámetro, valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) según el test LSD.

3.3.1.2. Análisis del comportamiento de los geles mediante ensayos reológicos a pequeñas deformaciones

3.3.1.2.1. Estudio de la cinética de maduración

La evolución del módulo de elasticidad (G') con el tiempo desde el momento de la formación del gel, da una idea de su proceso de maduración. Se ha registrado esta evolución una vez que las muestras hubieron alcanzado los 10°C, para los dos tipos de gelatina (A y B).

La cinética de maduración de los geles de gelatina mostró una fuerte subida de G' en el comienzo de los ensayos (figuras 3.10 y 3.11). A medida que el tiempo de maduración fue mayor, la pendiente disminuyó alcanzando un valor más estable al final del ensayo (17 h). Atendiendo al proceso de gelificación, la forma de las curvas se puede interpretar como dos fases. En la primera fase, en que las cadenas de gelatina son aún móviles dentro de una estructura todavía no completamente formada, continuamente se están creando uniones entre ellas, con lo que se incrementa el carácter sólido de los sistemas a mayor velocidad. Posteriormente, en

una segunda fase, las cadenas se incorporan más lentamente a una estructura más rígida. Sin embargo la pendiente a las 17 h no llega a ser cero, por lo que puede suponerse un estado de maduración en evolución constante aunque muy lenta. (Normand, 1995).

Evidentemente, el carácter sólido de las muestras se hace mayor a medida que se incrementa la concentración de gelatina.

La evolución de G' con el tiempo fue similar para los dos tipos de gelatina, siendo los valores obtenidos para los geles de gelatina A ligeramente superiores a los que contienen gelatina B. Estas diferencias aumentaron a medida que el tiempo de maduración fue mayor.

Este comportamiento es consistente con los valores obtenidos en los ensayos mecánicos de textura, en los que los geles preparados con gelatina A mostraron mayor resistencia mecánica que los de la gelatina B.

Influencia del medio de gelificación

La comparación entre las muestras de agua y leche sin acidificar reveló que los geles de leche presentaron valores de G' mayores que los de agua (figura 3.12) para los dos tipos de gelatina.

Este tipo de comportamiento se debe a una probable estabilización de la red atribuible a cambios en las uniones por puente de hidrógeno. Este cambio podría operar de modo que las moléculas de agua se distribuirían de manera diferente en la estructura final de la red de gelatina como lo harían cuando no hay leche presente en el medio. Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que las diferencias son porcentualmente mayores en los geles más débiles (menores concentraciones de gelatina), donde las fuerzas electrostáticas tienen mayor importancia en la conexión de las cadenas más móviles.

3.3.1.2.2. Influencia del pH, tipo y concentración de gelatina. Mecanismo de maduración

Ya que no se advirtieron diferencias en el mecanismo de maduración debidas al pH ni al tipo de gelatina para cada una de las concentraciones de gelatina estudiadas, a partir de las curvas de cinética de maduración de todas las muestras de modo conjunto, se calculó el parámetro "a" definido como $\Delta G'/\Delta \log \text{ tiempo}$ (Normand 1995).

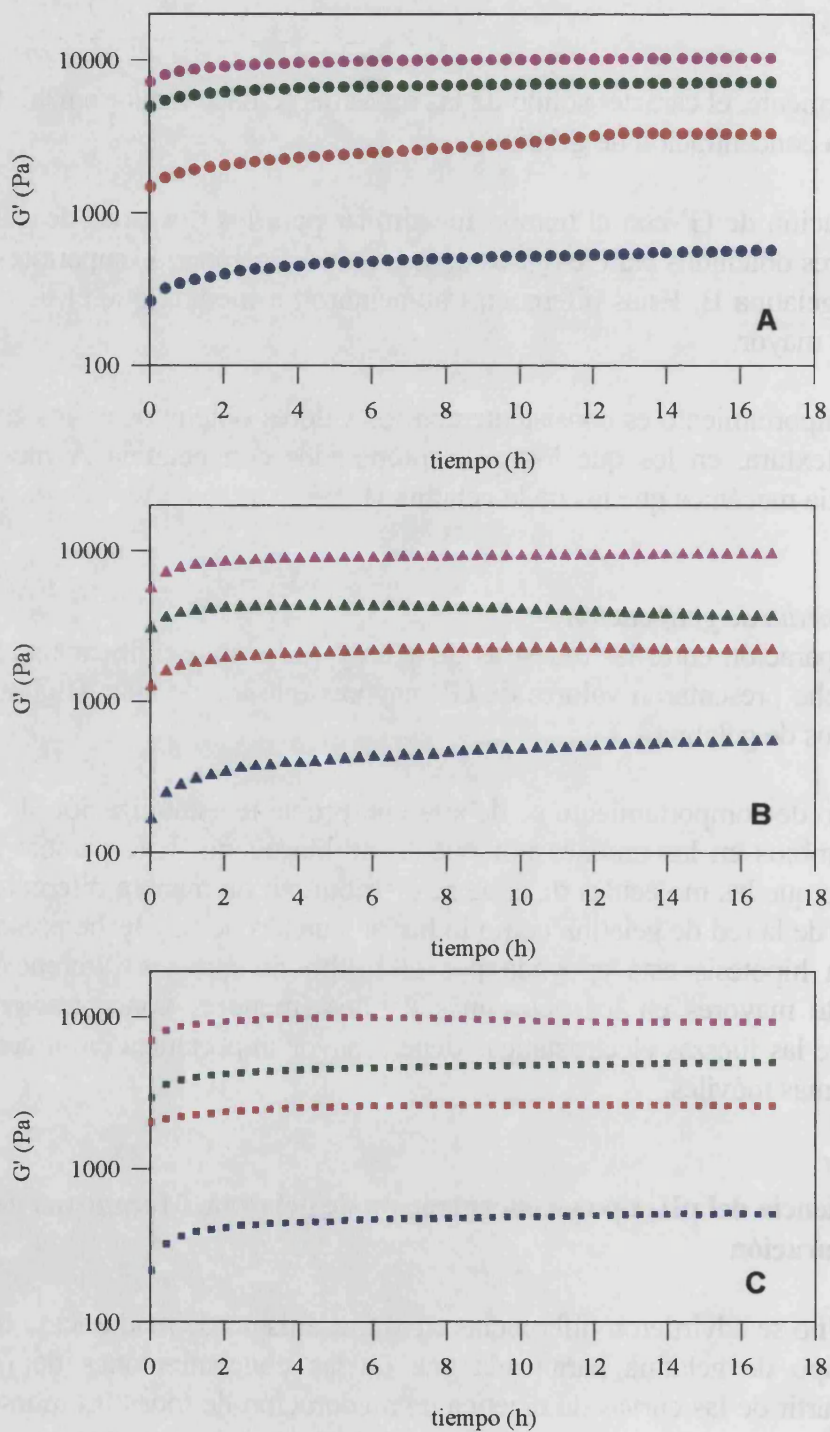


Figura 3.10. Cinética de maduración de geles de gelatina A a 10°C a diferentes concentraciones (1.5% azul, 3% rojo, 4.5% verde y 6.67% fucsia) en leche. (A): pH 6.6, (B): pH 5.8 y (C): pH 5.3.

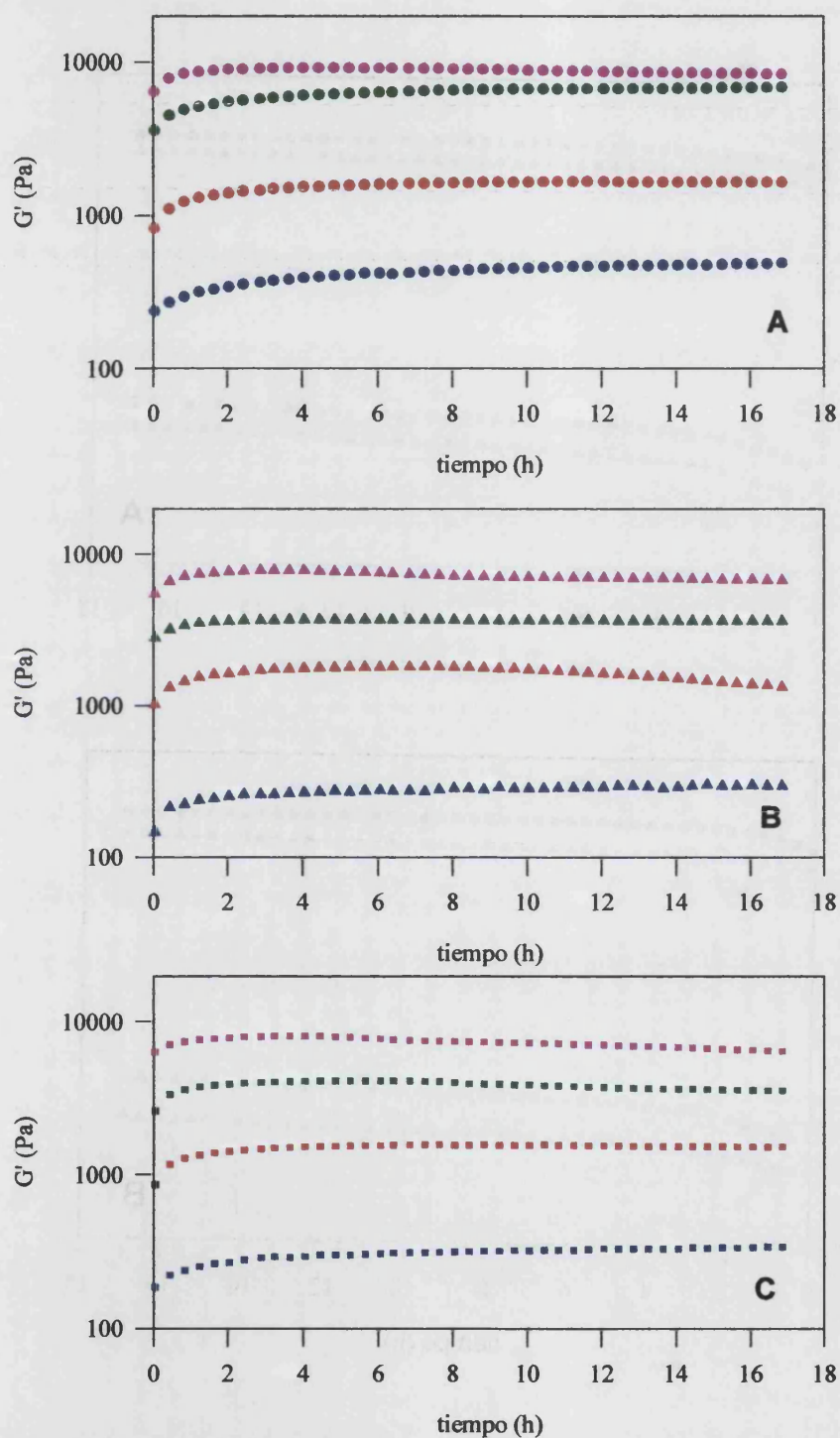


Figura 3.11. Cinética de maduración de geles de gelatina B a 10°C a diferentes concentraciones (1.5% azul, 3% rojo, 4.5% verde y 6.67% fucsia) en leche. (A): pH 6.6, (B): pH 5.8 y (C): pH 5.3.



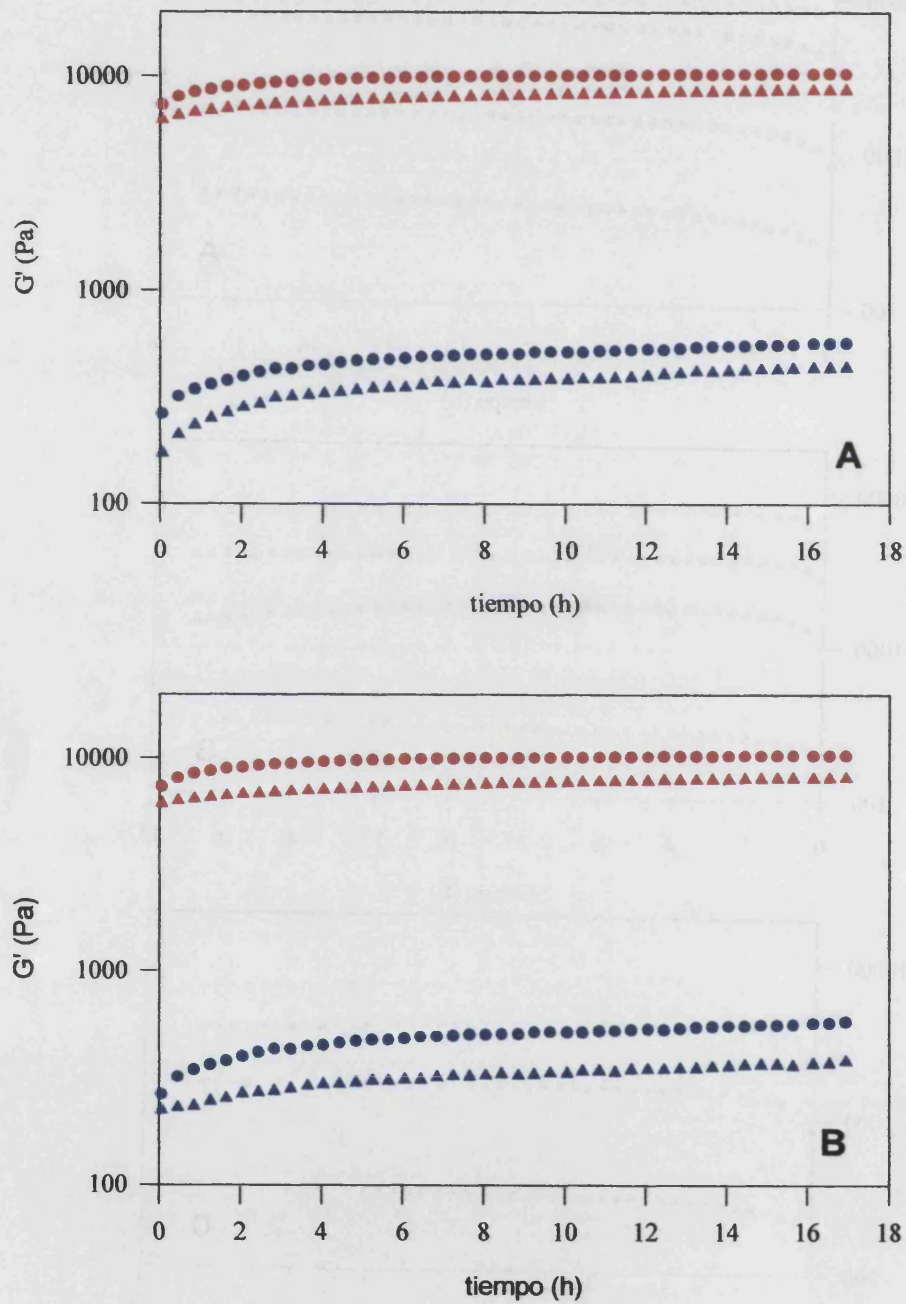


Figura 3.12. Cinética de maduración de muestras de gelatina ácida (figura A) y básica (figura B) en leche (símbolos redondos) y en agua (símbolos triangulares) a 10°C a concentraciones extremas de gelatina: 1.5% (azul) y 6.67% (rojo).

Al representar este parámetro "a" en función de los valores correspondientes de G' a 17 h para todas las muestras, es decir, para los dos tipos y las cuatro concentraciones de gelatina y para los tres valores de pH en leche y en agua y ajustar todos los valores mediante una regresión lineal se obtuvo un alto coeficiente de correlación ($r = 0.9383$) (figura 3.13).

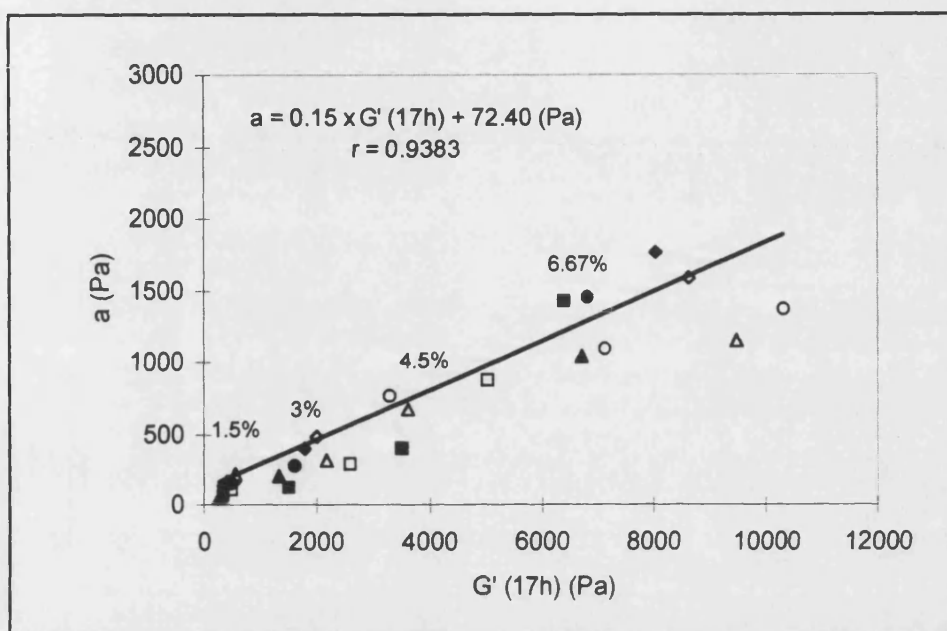


Figura 3.13. Correlación lineal entre el parámetro "a" ($\Delta G'/\Delta \log$ tiempo) y G' (17 h). Los símbolos blancos corresponden a gelatina tipo A y los símbolos negros a gelatina tipo B. Los símbolos para los valores de pH de los geles de leche son: pH 6.6 (círculos), pH 5.8 (triángulos), pH 5.3 (cuadrados) y para los geles de agua (rombos).

A la vista de este resultado, se puede concluir que el mecanismo de maduración de los geles de gelatina es independiente del tipo y concentración de gelatina, del pH y del medio utilizado para preparar el gel (agua o leche) dentro de los intervalos experimentales estudiados.

3.3.1.2.3. Predicción del comportamiento de los geles después del período de maduración

Un dato muy importante del proceso de maduración analizado, sobre todo desde el punto de vista industrial, es conocer la relación existente entre los valores de G' a 1 h (inicio de la maduración) y a 17 h (tiempo en el que se alcanzó el equilibrio en la maduración del gel de gelatina). En la figura 3.14 se puede observar la relación entre estos dos parámetros para todas las muestras preparadas, el coeficiente de correlación obtenido para la regresión lineal fue muy alto ($r = 0.9754$). De esta

forma, a partir del valor de G' después de sólo 1 h se puede prever de manera sencilla el valor de G' una vez que el gel ha llegado a un equilibrio (17 h). La importancia de este resultado radica en que, para este tipo de geles, no haría falta realizar el ensayo de cinética de forma completa sino que bastaría con hacerlo después de una hora de formado el gel y así se evitaría tener que realizar ensayos largos.

Este método fue propuesto por Normand (1995) para probar la linealidad de G' durante un período de maduración de 20 h para seis diferentes extractos de gelatina a diversas concentraciones entre 1 y 10%. En el presente caso se ha demostrado su validez para geles de dos tipos de gelatina (ácida y básica) en leche a tres pH diferentes (6.6, 5.8 y 5.3) y a cuatro concentraciones de gelatina (1.5, 3, 4.5 y 6.67%).

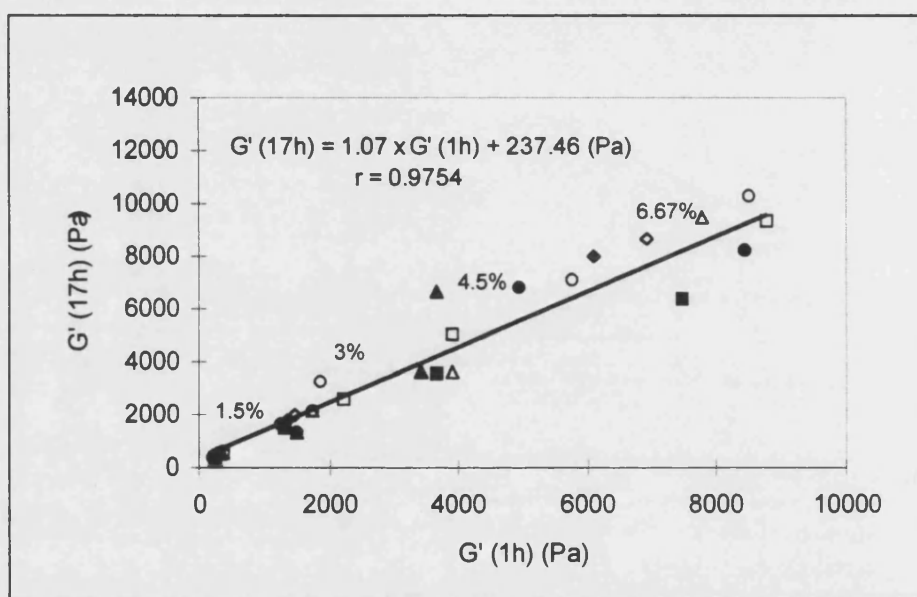


Figura 3.14. Correlación lineal entre el G' (1 h) y G' (17 h). Los símbolos blancos corresponden a gelatina tipo A y los símbolos negros a gelatina tipo B. Los símbolos para los valores de pH de los geles de leche son: pH 6.6 (círculos), pH 5.8 (triángulos), pH 5.3 (cuadrados) y para los geles de agua (rombos).

3.3.1.2.4. Dependencia del módulo de elasticidad con la concentración de gelatina

Varios autores estudiaron la dependencia del valor de G' con la concentración en geles de gelatina en agua. Se indicó que es proporcional al cuadrado de la concentración ($G'_{(17h)} \propto c^2$), en un intervalo de concentraciones de gelatina entre 2-6% (Nijenhuis, 1981; Clark, 1990; Ledward, 1986 y 1992; Normand, 1995). Sin embargo, Robinson y col., (1975), encontró que esta relación no es única y en sus ensayos variaban entre 1.266 y 1.985 en función del tipo de gelatina.

En el estudio teórico de modelización del fenómeno de gelificación, desarrollado por Clark (1990), se mostró que la concentración es el factor más importante. En las figuras 3.10 y 3.11 se puede observar que la evolución de G' con el tiempo aumenta con la concentración, aunque no de modo lineal.

Al representar los valores de G' (17 h), correspondientes a los geles elaborados en leche a los tres valores de pH y los dos tipos de gelatina y cuatro concentraciones, en función de la concentración (figura 3.15), se puede observar que, en este caso, también se obtiene una dependencia cuadrática con la concentración para los dos tipos de gelatina y todos los valores de pH (esta dependencia varió entre 1.86 y 2.13). Este resultado está de acuerdo con la teoría desarrollada por Clark (1990) citada anteriormente y que se aplicaría también a los geles en un medio diferente al agua.

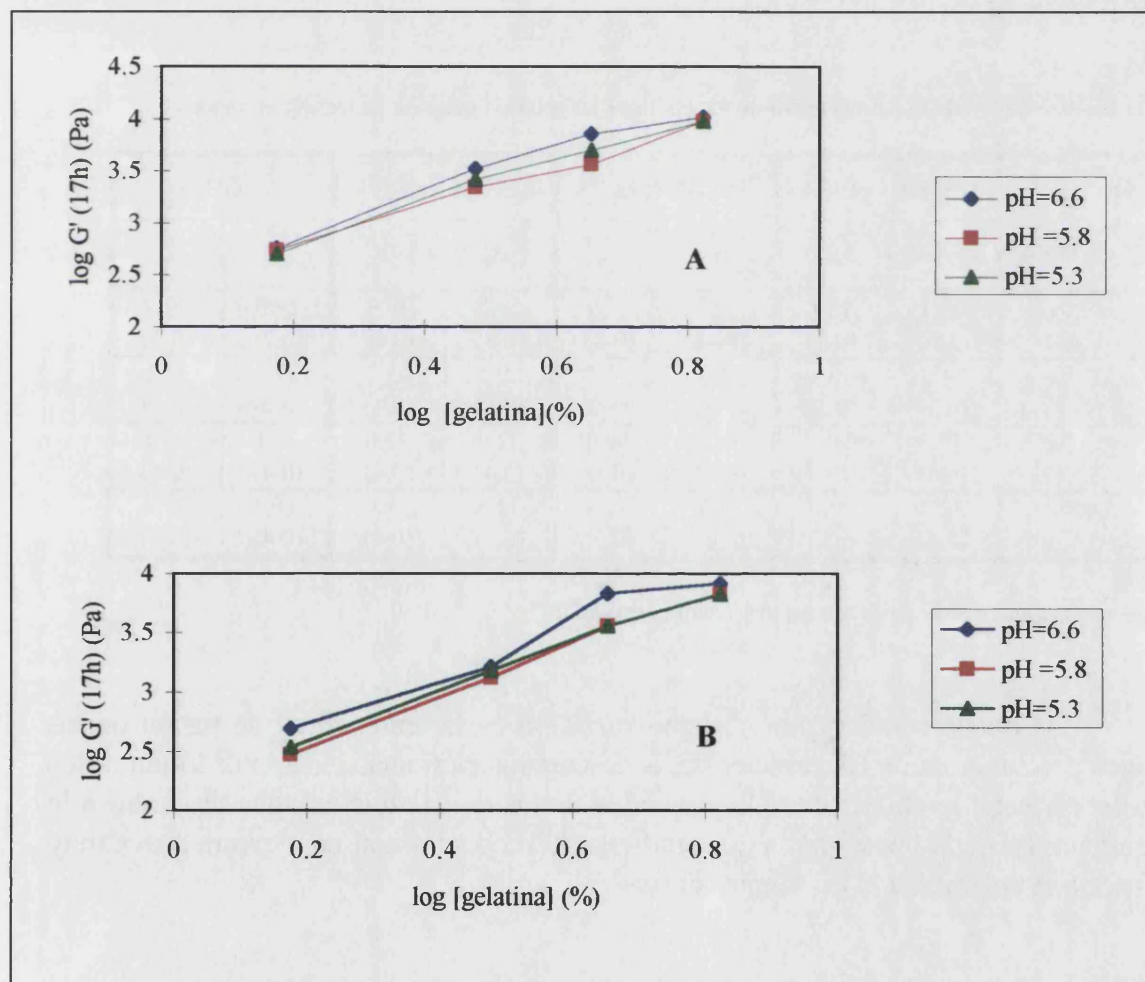


Figura 3.15. Estudio de la dependencia del valor del módulo de elasticidad a las 17 h de maduración con la concentración de gelatina para los dos tipos estudiados (A: gelatina ácida y B: gelatina básica).

3.3.1.2.5. Determinación de la temperatura de fusión

Las temperaturas de fusión de los geles se determinaron mediante el registro del punto de cruce entre las curvas de G' y G'' en función de la temperatura (Doublier y Cuvelier, 1996). Este punto de entrecruzamiento se puede determinar a partir de las curvas de calentamiento de los geles registradas para ambos parámetros entre 10°C y 60°C (1°C/minuto) (Fernandes, 1998).

No se encontraron diferencias significativas de los valores de punto de fusión entre los geles hechos en agua o en leche para las mismas concentraciones de gelatina. Tampoco se encontró una pauta de variación significativa de los valores de la temperatura de fusión con el pH ni con el tipo de gelatina, aunque sí se observó que las mayores concentraciones de gelatina registraron mayores temperaturas de fusión (tabla 3.8).

Tabla 3.8. Valores de la temperatura de fusión para los geles de gelatina en leche y en agua.

CONCENT. GELATINA	LECHE - pH 6.6		LECHE - pH 5.8		LECHE - pH 5.3		AGUA	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1.50%	30.2 (1.5)	28.1 (0.4)	29.5 (0.4)	25.5 (0.8)	29.3 (0.1)	28.9 (0.6)	27.0 (0.7)	29.9 (0.3)
3.00%	31.2 (0.6)	30.4 (0.4)	31.8 (0.4)	29.7 (0.5)	30.5 (0.3)	33.1 (0.4)	29.9 (0.6)	31.1 (0.4)
4.50%	31.6 (0.1)	30.6 (0.2)	32.0 (0.5)	31.0 (0.3)	32.0 (0.4)	32.0 (0.3)	28.1 (0.4)	28.4 (0.5)
6.67%	32.2 (0.8)	31.7 (0.6)	31.7 (0.6)	31.8 (0.5)	33.5 (0.6)	31.9 (0.6)	31.4 (0.4)	31.4 (0.5)

Los valores entre paréntesis son las desviaciones estándar.

Se puede concluir que no hubo variación en la temperatura de fusión de los geles con ninguna de las características de composición analizadas. Por lo tanto, los geles en leche también tienen la propiedad de los de gelatina en agua de fundir a la temperatura de la boca, con lo que confieren al producto final una textura suave muy apreciada y similar a la de algunas grasas.

3.3.2. Geles ácidos obtenidos en caliente

La gelificación de las muestras preparadas en esta parte del estudio, a diferencia de las del capítulo anterior, se debe a dos factores diferentes que se superponen. Por una parte, las proteínas de la leche gelifican por la acción combinada de la acidez y de la alta temperatura, y por otra parte, si se adiciona gelatina, se produce la gelificación de la misma en el medio lácteo.

Tanto las concentraciones de gelatina (1.5, 3, 4.5 y 6.67%) como los valores de pH finales (5.8 y 5.3) preseleccionados fueron los mismos que en el capítulo anterior, con el fin de poder comparar la textura de los geles obtenidos. En este caso, se eligió un tercer valor de pH final (4.8). De este modo, se obtuvieron geles a valores de pH similares a los que se producen por fermentación de la leche en la elaboración del yogur.

3.3.2.1. Análisis del comportamiento de los geles mediante ensayos reológicos a grandes deformaciones

3.3.2.1.1. Determinación de la fuerza Bloom y de la fuerza en el punto de rotura

Influencia del pH y de la concentración de gelatina en la firmeza de los geles

Se estudió la fuerza Bloom y la fuerza en el punto de rotura de los geles, así como el valor del desplazamiento del émbolo hasta que se produce esta rotura (tabla 3.9).

Los geles preparados sin adición de gelatina presentaron un aspecto muy tierno y con un alto grado de sinéresis. Como se puede observar en la figura 3.16 presentaron un perfil muy dependiente del valor de pH final. Mientras que a pH 5.8 el gel formado fue muy débil, a pH 5.3 la curva correspondiente ya presentó un hombro en su comienzo, indicando una resistencia inicial a la penetración, y a un valor de 4.8, la fuerza alcanzó un valor de más del doble y la curva presentó una meseta estable durante la penetración, lo que indica la formación de un gel que aunque tierno, con cierto grado de firmeza. De esto se puede deducir que es muy importante la evaluación de la curva para registrar los valores de los parámetros de textura con propiedad. Para el gel de pH 5.8, la fuerza a los 20 mm de desplazamiento del émbolo representa la máxima resistencia, ya que no se encuentra un punto de rotura. En cambio, para los geles de pH 5.3 y 4.8, los valores de la fuerza correspondiente al hombro descrito, o al comienzo de la meseta, son los que deben registrarse como fuerza de rotura o resistencia a la penetración.

En los geles preparados con gelatina el comportamiento mecánico fue diferente, ya que aumentó la firmeza. Además, debido a su capacidad de retención de agua los geles estuvieron libres de sinéresis. Se obtuvieron geles de muy variada textura, apariencia homogénea y aspecto agradable sin observar ningún tipo de incompatibilidad.

Tabla 3.9. Valores de fuerza Bloom y de fuerza de rotura de los geles de leche inducidos por ácido y por calentamiento a 90°C*.

[GELATINA] (%)	pH	FUERZA BLOOM (g)	FUERZA ROTURA (N)	DESPLAZAMIENTO (mm)
0.00	5.8	5.4a (0.4)	0.22a (0.04)	18.7a (0.5)
	5.3	13.3b (0.7)	0.21a (0.04)	7.5b (0.9)
	4.8	32.5c (3.0)	0.47b (0.04)	7.6b (1.2)
1.50	5.8	40.7a (1.8)	1.56a (0.03)	13.6a (0.5)
	5.3	42.0a (1.3)	1.51a (0.05)	12.3a (0.4)
	4.8	82.7b (2.8)	1.04b (0.04)	6.8b (1.1)
3.00	5.8	107.6a (4.8)	4.58a (0.40)	15.5a (0.4)
	5.3	109.0a (1.4)	4.71a (0.15)	14.8a (0.3)
	4.8	154.8b (5.1)	5.08a (0.15)	12.6b (0.4)
4.50	5.8	209.8a (5.2)	10.05a (0.08)	15.9a (0.3)
	5.3	207.7a (3.0)	9.71a (0.32)	16.4a (0.8)
	4.8	265.8b (5.5)	9.23a (0.50)	12.9b (0.4)
6.67	5.8	392.2a (10.3)	16.41a (0.32)	16.7a (0.1)
	5.3	384.3a (2.6)	17.30a (0.80)	16.5a (0.5)
	4.8	437.1b (15.1)	16.43a (0.54)	14.0b (0.3)

*Los valores entre paréntesis son las desviaciones estándar.

En la misma columna, y para cada concentración de gelatina, valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) según el test LSD.

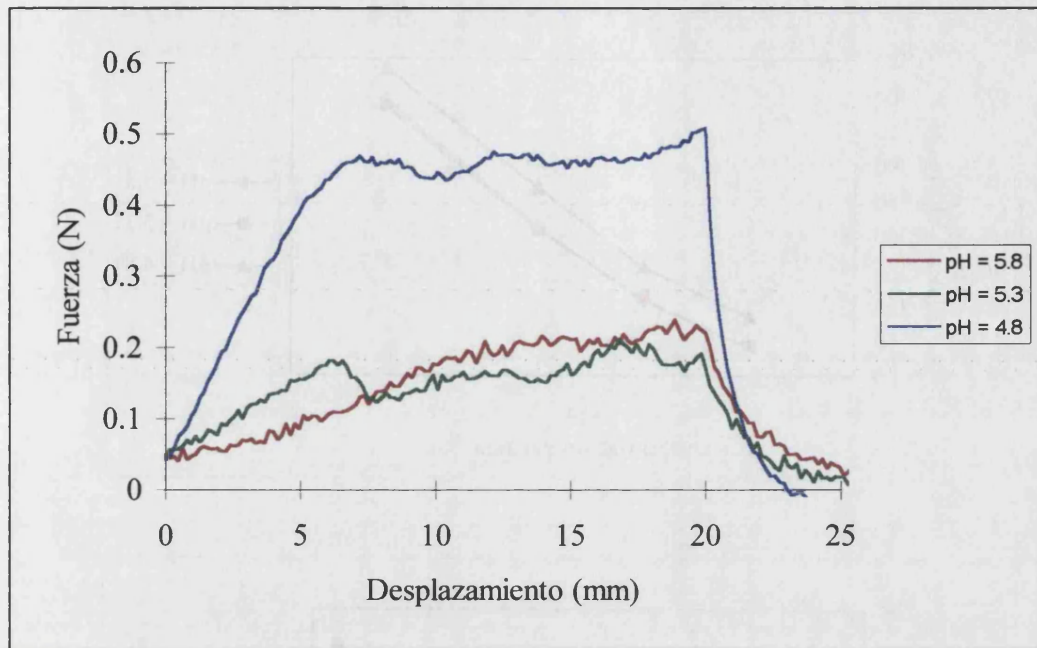


Figura 3.16. Perfil de la curva de textura obtenido con los geles preparados con ácido y con calentamiento de la leche a 90°C sin adición de gelatina.

El principal factor de incremento de los valores de la fuerza Bloom y de la fuerza de rotura fue la concentración de gelatina a todos los pH (figura 3.17).

Al analizar la variación de la textura con respecto al pH, se observó que a pH 5.8 y 5.3 (correspondientes aproximadamente a 0.4% y 0.8% GDL), no hay diferencias significativas ni respecto de la fuerza Bloom ni de la fuerza de rotura. Sin embargo, la fuerza Bloom de todos los geles preparados a pH 4.8 (\cong 1.2% GDL) mostraron valores significativamente mayores a los anteriores para todas las concentraciones de gelatina.

Algunos estudios hechos en geles de gelatina en agua demuestran que la fuerza del gel varía ligeramente con el pH en el intervalo 4-10, descendiendo drásticamente fuera de estos límites (Johnston-Banks, 1990). Esto se debe a que a valores extremos de pH, las cadenas de proteína tienen una carga neta fuertemente positiva o negativa y las fuerzas electrostáticas de repulsión inhiben la formación de uniones entre ellas. Estas zonas de unión son relativamente no polares en medios de pH intermedios y, por tanto, el efecto de pequeños cambios en el pH, no debería ser muy marcado (Ledward, 1992). En el presente estudio se registró una influencia del pH en la fuerza del gel sólo en las muestras más débiles, es decir, de baja concentración de gelatina, lo que reflejaría el hecho de que las fuerzas electrostáticas juegan un papel importante en la agregación de las cadenas con mayor movilidad de las proteínas presentes en estos sistemas.

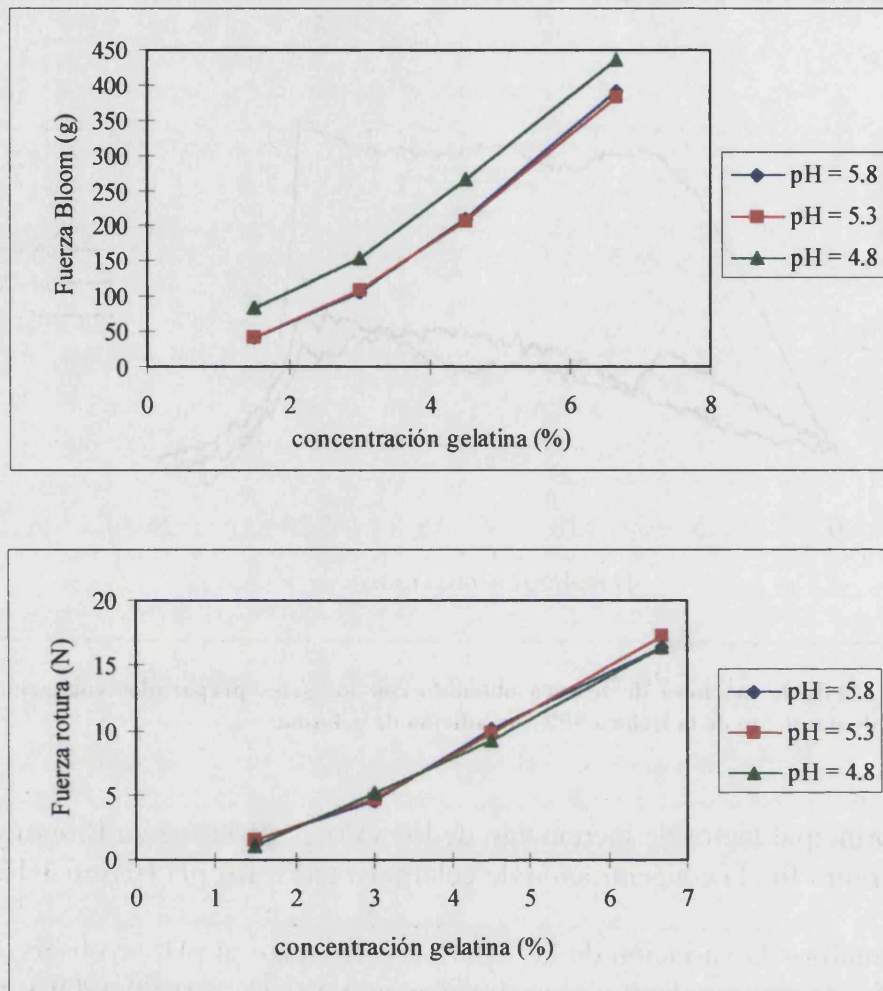


Figura 3.17. Influencia de la concentración de gelatina en la fuerza Bloom y en la fuerza de rotura en geles preparados con GDL a 90°C.

3.3.2.1.2. Análisis de perfil de textura instrumental (TPA)

El análisis de perfil de textura se usa como método objetivo de determinación de textura de alimentos. Se realizó con todos los geles excepto los preparados sin gelatina que fueron muy débiles y no se pudieron desmoldar sin romper. Para poder efectuar un estudio comparativo entre muestras, se utilizó la misma deformación fijada en el capítulo anterior (40%).

El parámetro dureza siguió una evolución similar a la fuerza Bloom y la fuerza de rotura con respecto a la concentración de gelatina. A medida que la concentración de gelatina aumentó, el valor de la dureza fue mayor (figura 3.18). Respecto del pH se encontró que, en general, la dureza aumentaba significativamente a medida que el valor de pH disminuía (tabla 3.10).

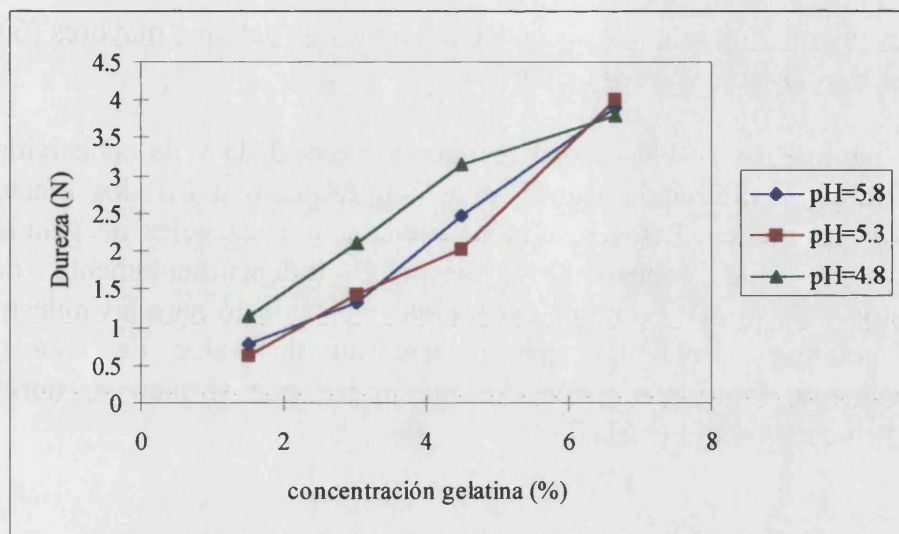


Figura 3.18. Influencia de la concentración de gelatina en la dureza de geles preparados con GDL a 90°C.

Tabla 3.10.- Valores del TPA de los geles de leche preparados con calentamiento a 90°C.

[GELATINA] (%)	pH	DUREZA (N)	ELASTICIDAD	COHESIVIDAD
1.50	5.8	0.77a (0.01)	0.97a (0.03)	0.80a (0.02)
	5.3	0.62b (0.07)	0.98a (0.03)	0.71a (0.04)
	4.8	1.15c (0.08)	0.93a (0.04)	0.59b (0.08)
3.00	5.8	1.34a (0.05)	0.97a (0.02)	0.83a (0.05)
	5.3	1.44a (0.12)	0.98a (0.01)	0.77a (0.01)
	4.8	2.10b (0.06)	0.97a (0.02)	0.76a (0.02)
4.50	5.8	2.48a (0.06)	0.97a (0.02)	0.83a (0.02)
	5.3	2.04b (0.05)	0.97a (0.03)	0.79a (0.004)
	4.8	3.15c (0.12)	0.96a (0.02)	0.83a (0.05)
6.67	5.8	3.91a (0.20)	0.94a (0.05)	0.85a (0.02)
	5.3	4.00a (0.20)	0.97a (0.003)	0.82a (0.007)
	4.8	3.79a (0.14)	0.97a (0.02)	0.83a (0.04)

*Los valores entre paréntesis son las desviaciones estándar.

En la misma columna, y para cada concentración de gelatina, valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) según el test LSD.

Nuevamente, los geles de las concentraciones de gelatina mayores (6.67%) presentaron los mayores valores de dureza.

Los parámetros de elasticidad recuperable retardada y de cohesividad no mostraron ninguna diferencia significativa con respecto a los dos efectos de composición estudiados. Estos resultados indican que los geles de gelatina en leche son altamente cohesivos y elásticos, independientemente de su concentración y de su pH. La única excepción se estableció para las muestras de 1.5% de gelatina y pH 4.8 que presentaron un valor de cohesividad significativamente inferior al resto, lo que indica que si bien su dureza se incrementó, fue más frágil (tabla 3.10).

CAPÍTULO 4

OBTENCIÓN DE GELES DE GELATINA EN LECHE MEDIANTE FERMENTACIÓN LÁCTICA

4.1. INTRODUCCIÓN

La acidificación de la leche por fermentación es uno de los métodos más antiguos utilizados para su conservación, por el que además se le imparte buenas cualidades organolépticas. Hay muchas maneras diferentes de llevar a cabo fermentaciones; dependiendo del país origen se da lugar a una amplia gama de productos lácteos fermentados, entre los que se encuentran el kumiss, el kefir y el yogur, entre otros.

En la fabricación de estos productos lácteos, la adición de cultivos de bacterias termófilas a la leche da lugar a un descenso progresivo del pH, el cual produce cambios en la estructura de la caseína. Cerca del punto isoeléctrico, las micelas de caseína comienzan a ser inestables, flocculan y forman un entramado. Desde el punto de vista estructural, los geles ácidos de leche, y en particular los yogures representan estos geles particulados. Los glóbulos grasos de leche presentes actúan como relleno interactuando con la matriz de proteínas (Rohm y Kovac, 1994; Prentice, 1997).

El yogur ocupa un lugar importante entre los productos lácteos fermentados desde el punto de vista nutricional (Ramaswamy y Basak, 1992; Yadav y col., 1994). Aunque existe alguna controversia con respecto a la definición del yogur en base a su composición química y al tipo de microorganismo estárter, Tamime y Deeth (1980), coincidiendo con la opinión más generalizada, lo definen como el producto resultante de la fermentación de la leche mediante una mezcla de fermento estárter compuesta sólo por *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. En España se entiende por yogur el producto de leche coagulada obtenido por fermentación láctica mediante la acción de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* a partir de leche pasteurizada, leche concentrada pasteurizada, leche total o parcialmente desnatada pasteurizada, leche concentrada pasteurizada total o parcialmente desnatada, con o sin adición de nata pasteurizada, leche en polvo entera, semidesnatada o desnatada, suero en polvo, proteínas de leche y/o otros productos procedentes del fraccionamiento de la leche (Ministerio de la Presidencia, 1987).

En los últimos 20 años se ha producido un gran aumento en su consumo, probablemente relacionado con la diversificación en la oferta de otros productos basados en yogur entre los que figuran los yogures batidos, yogures bebibles, mousse de yogur, helado de yogur, etc. Todos estos productos también poseen un importante reclamo nutritivo y asociado con la buena salud (Martinou-Voulasiki y Zerfiridis, 1990; Khedkar y col, 1996).

4.1.1. Etapas fundamentales en la fabricación del yogur

Homogeneización

Consiste en la formación de una emulsión homogénea de las dos fases líquidas inmiscibles de la leche, en este caso del tipo aceite en agua. Esta etapa es una de las más importantes en la fabricación del yogur, sobre todo si se añaden sólidos lácteos para fortificar la leche, ya que la grasa presenta una clara tendencia a separarse formando una capa superficial (figura 4.1).

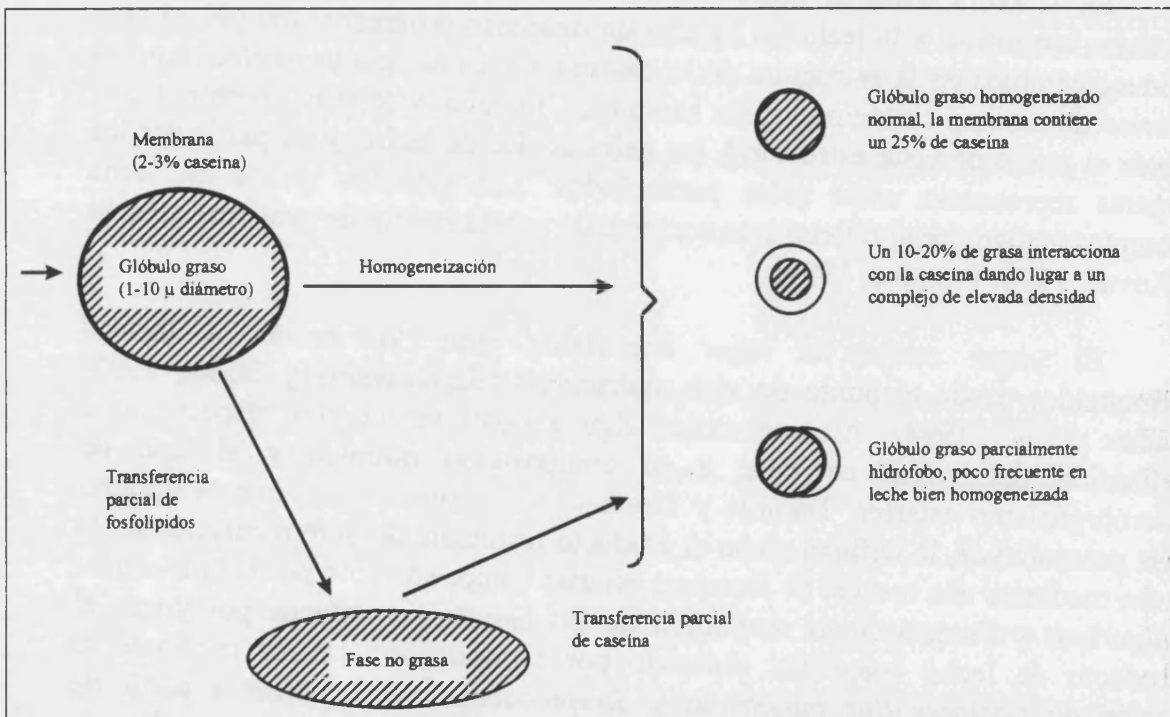


Figura 4.1. Estructura del glóbulo de grasa, composición y representación esquemática del efecto de la homogeneización sobre el tamaño de los mismos (Tamime y Robinson, 1991).

Las modificaciones físico-químicas más importantes que sufre la disolución de leche debido a la homogeneización se pueden resumir en las siguientes:

- Disminución del tamaño de los glóbulos grasos. Con esto se evita la formación de nata en el yogur, sobre todo durante la incubación.
- Aumento de la viscosidad, debido a la reducción del tamaño de los glóbulos grasos y al aumento de la adsorción sobre las micelas de caseína.
- Color más blanco, debido a que el aumento de número de glóbulos grasos hace que aumente la reflexión y dispersión de luz.
- Mezcla correcta, especialmente si la leche se enriquece con leche en polvo.

- e) Aumento del contenido en fosfolípidos en la leche desnatada, debido a que se aprecia un mayor grado de transferencia de material de membrana a la leche desnatada y mejora la capacidad de retención de agua del coágulo.
- f) Aumento de la formación de espuma, debido a la mayor concentración de fosfolípidos en la fase no grasa de la leche.
- g) Disminución de la estabilidad de las proteínas. Se observan cambios en las interacciones proteína-proteína debido, en parte, a cierto grado de desnaturalización y a las modificaciones del equilibrio salino.
- h) Disminución de la caseína presente en la fase no grasa. Se observa una transferencia parcial desde la fase no grasa formando una nueva membrana alrededor de los pequeños glóbulos grasos aparecidos.
- i) Disminución de la sinéresis, ya que aumenta la hidrofobicidad y la capacidad de retención de agua debido a las caseínas que forman parte de la membrana del glóbulo graso y a otras interacciones proteína-proteína (Tamime y Robinson, 1991).

Tratamiento térmico

Antes de la incubación se procede a precalentar la leche. Las combinaciones temperatura-tiempo necesarias para efectuar el tratamiento térmico pueden variar, siendo las más adecuadas 85°C-30 min ó 90°C-10 min. Los efectos producidos por el tratamiento térmico se pueden resumir en tres:

- a) Destrucción y/o eliminación de microorganismos patógenos y otros microorganismos indeseables.
- b) Producción de factores estimulantes de los cultivos estárter del yogur.
- c) Cambios en las propiedades físico-químicas de los componentes de la leche que favorecen la gelificación posterior.

Kalab y col. (1976) estudiaron mediante microscopía electrónica la estructura de los yogures con y sin precalentamiento de la leche. Mediante separación ultracentrífuga vieron que las proteínas de la red que forma el yogur preparado sin precalentamiento de la leche, estaban mucho menos hidratadas, por tanto, llegaron a la conclusión de que el estado de solvatación de las micelas de caseína y la naturaleza de las proteínas de suero desnaturalizadas por el calentamiento son responsables de las estructuras específicas desarrolladas en el yogur.

Como resultado del tratamiento térmico, se forma un complejo entre la α -lactoglobulina y la β -lactoalbúmina. Además, los grupos -SH de esta última se activan y se forman dos tipos de agregados: unos agregados pequeños de β -lactoalbúmina con los grupos -SH libres y otros agregados de mayor tamaño en los que hay un número importante de puentes disulfuro. Estos agregados participan activamente en la formación del gel durante la fermentación.

Fermentación

La fermentación se realiza a temperaturas de 40-45°C, que es la condición óptima de crecimiento de los cultivos.

Las modificaciones físico-químicas sufridas por la leche durante la formación del gel en esta etapa son las siguientes:

- a) El estárter del yogur metaboliza la lactosa de la leche dando lugar a la formación de ácido láctico.
- b) La producción de ácido láctico desestabiliza los complejos de caseína-proteínas del lactosuero desnaturalizadas, debido a la solubilización del fosfato cálcico y de los citratos.
- c) Los agregados de micelas de caseína se van asociando y coalescen parcialmente a medida que el pH se aproxima a su punto isoeléctrico, que es 4.6-4.7.
- d) La interacción del complejo α -lactoalbúmina / β -lactoglobulina con la κ -caseína a través de los grupos -SH con la correspondiente formación de puentes disulfuro, protege parcialmente a las micelas frente a una compleja desestabilización o ruptura, por lo que la red del gel se queda formada por una estructura regular que atrapa en su interior al resto de los componentes de la mezcla base, incluyendo la fase acuosa (Tamime y Robinson, 1991).

Enfriamiento

Como la elaboración del yogur es un proceso biológico, el enfriamiento es uno de los métodos tradicionales más empleados para interrumpir la actividad metabólica de los cultivos estárter y sus enzimas, así como la propia acidez que va adquiriendo el yogur. El enfriamiento del coágulo debe comenzar inmediatamente después de que la muestra haya alcanzado la acidez óptima, es decir, un valor de pH de 4.5-4.6 o un valor de 85°Dornic, que corresponde a un 0.9% de ácido láctico en el medio.

Debido a la escasa actividad de los microorganismos del yogur a una temperatura de 10°C, el objetivo básico del enfriamiento es disminuir la temperatura del coágulo de 40-45°C a menos de 10°C tan rápidamente como sea posible, para poder controlar la acidez final del producto. Hay que señalar que la velocidad de enfriamiento también determina la acidez final del yogur.

4.1.2. La consistencia como parámetro de calidad en el yogur

La consistencia es un atributo muy importante en la evaluación de la calidad del yogur ya que determina en parte su aceptabilidad. El método de medida de este parámetro no está estandarizado y aunque es una técnica muy

valorada en las industrias para el control de calidad de los productos finales, los resultados solamente pueden ser útiles y comparables si las condiciones de ensayo están normalizadas. Además, es necesario analizar con propiedad la forma de las curvas obtenidas y el significado físico de los parámetros. En la tabla 4.1. se resumen las condiciones experimentales utilizadas por diferentes autores para la medición empírica de la firmeza de muestras de yogur. Como se puede observar, los investigadores han utilizado métodos de distinta naturaleza y aparatos en condiciones experimentales muy variadas tanto en las dimensiones y forma del émbolo, como en la velocidad de bajada del mismo, con gran dispersión en el modo de registrar y de expresar los resultados.


Por ejemplo, la firmeza se define de diferente manera según autores. Harwalkar y col. (1977), Kalab y col. (1975) y Dannenberg y Kessler (1988), la definen como el valor de la fuerza media obtenida durante la penetración fijada; Becker y Puhan (1989) y Martinou-Voulasiki y Zerfiridis (1990) la definen como los milímetros que penetra una célula de determinada forma y peso en la muestra, a un tiempo determinado; Collins y col. (1991), la definen como el área de la curva obtenida y Rohm y Kovac (1994) como la pendiente inicial calculada a partir de la curva fuerza-penetración. De esto se deduce que es difícil comparar valores de firmeza de yogur, ya que depende de las condiciones experimentales fijadas. Por otro lado, hay muchos factores que afectan la consistencia, entre ellos están la composición química de la leche, la homogeneización de la leche, el tratamiento térmico, el uso de estabilizantes, el tipo de cultivo, la acidez, el contenido proteico y graso y el manejo mecánico del coágulo (Parnell-Cluines y col., 1986 y 1987).

Una de las variables importantes en la firmeza del yogur, como ya se ha dicho, es el precalentamiento de la leche. Se ha demostrado que los efectos de un calentamiento adecuado, provoca una mejora en la consistencia del yogur dando lugar a un gel firme y con baja tendencia a la sinéresis (Davies y col., 1978). Grigorov (1966) demostró que el calentamiento a 85°C durante 30 minutos es el que da lugar a la menor sinéresis en el yogur cuando se compara con otras condiciones de tiempo y temperatura.

4.1.3. Uso de agentes texturizantes en el yogur

En general, los agentes espesantes se usan para mejorar la textura, aumentar la firmeza y prevenir la sinéresis de los yogures. Con la incorporación de estos aditivos al yogur se intenta mantener las propiedades texturales durante el proceso de fabricación, transporte y almacenamiento (Kalab y col., 1975; Teggatz y Morris, 1990). Los yogures aromatizados, por ejemplo, se preparan añadiendo concentrados de frutas o jarabes con aromas a la leche inoculada antes o después del proceso de incubación. Estos aromas añadidos tienden a disminuir

Tabla 4.1. Condiciones experimentales utilizadas por diversos autores para la medida de la firmeza de yogur.

Referencia	Texturómetro	Célula de medida	Condiciones ensayo	Parámetro registrado
Kalab y col., 1975	Penetrómetro con transductor de medida de esfuerzo	 12.4 mm	velocidad: 28 mm/min	firmeza: fuerza media del plateau (g)
Harwalkar y col., 1977	Penetrómetro con transductor de medida de esfuerzo		-----	firmeza: fuerza media del plateau (g)
Dannenbergh y Kessler, 1988	LFRA-Texture Analyzer	cilindro plexiglas diámetro: 25.4 mm largo: 35 mm	velocidad: 0.5 mm/s distancia: 35 mm	resistencia a la penetración: fuerza requerida para alcanzar la distancia de penetración (N)
Becker y Puhan, 1989	Penetrómetro SUR	cono diámetro: 16 mm altura: 8 mm peso: 45.9 g	tiempo: 20 s	firmeza: distancia de penetración (mm)
Martinou-Voulasiki y Zerfiridis, 1990	Penetrómetro SUR	cilindro de extremo cónico peso: 117.5 g	tiempo: 10 s	firmeza: distancia de penetración (mm)
Collins y col., 1991	Instron modelo 1132	Célula de tensión de Cherry- Burrell	velocidad: 10 cm/min distancia: 5.5 cm	fuerza requerida para alcanzar la distancia de penetración
Yadav y col., 1994	Instron	cilindro diámetro: 6.25 mm	velocidad :50 mm/min	dureza (N), elasticidad (cm), cohesividad y gomosidad (N)
Rohm y Kovac, 1994	Instron modelo 1011	cilindro diámetro: 35 mm	velocidad: 25 mm/min	firmeza: pendiente inicial de la curva fuerza-penetración (N/mm)

la consistencia del producto, y por lo tanto, suelen tener que estabilizarse con aditivos tales como almidones, pectinas, gelatinas, carragenato, etc. (Ramaswamy y Basak, 1992).

Estas sustancias causan cambios en la estructura del yogur. Las técnicas de microscopía de barrido electrónico (SEM) y microscopía de transmisión electrónica (TEM) se han empleado con éxito para detectar la presencia de aditivos en el yogur y estudiar los cambios inducidos en la microestructura que son dependientes del agente estabilizante adicionado.

Kalab (1979) estudió la microestructura de los yogures con adición de almidón de maíz y carragenato. El almidón a una concentración del 2% y utilizando la técnica SEM aparece en forma de fibras cortas. Estas fibras tienen terminaciones libres que están conectadas a pequeños aglomerados de micelas de caseína que no aparecen en yogures que llevan añadido carragenato. El carragenato, a una concentración del 0.4% forma fibras largas y delgadas conectadas con grandes agregados de micelas de caseína, dando lugar a una microestructura fibrilar.

Kalab y col. (1975) estudiaron también la presencia de gelatina en yogur mediante estas dos técnicas. Llegaron a la conclusión de que la gelatina es un ingrediente del yogur difícil de observar con SEM y con TEM, aún utilizando diferentes aumentos. En general, en presencia de gelatina, se observan más uniones de las micelas de caseína en forma de cadenas que en forma de *clusters* (aglomerados), aunque estas diferencias no se detectan fácilmente. Al principio esta dificultad se atribuyó a la baja concentración de gelatina utilizada (0.5%), por lo que realizaron estudios de gelatina con TEM a una concentración entre el 2% y el 10%. Los resultados que obtuvieron fueron geles que macroscópicamente tenían el aspecto de geles de gelatina aunque microscópicamente la única diferencia visible con la muestra control de yogur era una ligera cantidad de proteínas no micelares en la proximidad de las micelas de caseína. Sin embargo, algunos yogures sin gelatina también presentan estas proteínas no micelares. Por tanto, la presencia de gelatina en los yogures no se pudo detectar bien aunque se especuló con su presencia debido a que con la técnica SEM aparece en forma de fibras finas (Kalab y Harwalkar, 1973).

Con respecto a la incorporación de gelatina como estabilizante, se puede decir que ésta cumple dos funciones primordiales que influyen en la calidad final del yogur: la capacidad de retención de agua y el aumento de la viscosidad. La concentración de gelatina permitida en el yogur es de 0.3% (Ministerio de la Presidencia).

4.1.4. Adición de sólidos lácteos

Es muy frecuente en la industria utilizar leche en polvo para el enriquecimiento de la leche destinada a la elaboración del yogur de consistencia espesa y suave. La proporción de leche en polvo añadida a la mezcla base puede oscilar entre un 1% a 6%, recomendándose, por lo general, valores del 3-4%; porcentajes superiores pueden conferir al yogur "sabor a polvo" debido a la elevada concentración de lactosa presente en la mezcla, que además puede determinar el desarrollo de una acidez excesiva durante el almacenamiento en refrigeración (Tamime y Robinson, 1991). En España se admite que la concentración de leche en polvo utilizada para enriquecer el yogur sea inferior al 5% en yogur natural e inferior al 10% en otro tipo de yogures (Ministerio de la Presidencia, 1987).

La adición de sólidos está regulada por las normas legales de cada país. El porcentaje de extracto seco presente en la elaboración del yogur puede variar desde un 9% (en yogur desnatado) hasta un 20-30% (en otro tipo de yogures enriquecidos (Tamime y Deeth, 1980). Sin embargo, Robinson y Tamime (1975) recomendaban cantidades de 14-18%. El yogur de mejor calidad se obtiene a partir de leche con un extracto seco total del 15-16%, aunque la mayoría de los yogures comerciales contienen un porcentaje de sólidos totales de 14-15% (Kozhev y col., 1972).

El objetivo de esta parte del trabajo es el estudio de la modificación de las propiedades texturales y viscoelásticas de geles basados en yogur por la adición de gelatina.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Materia prima

Para la realización del presente estudio se utilizaron los siguientes productos: leche en polvo desnatada (Nestlé, Boué, Francia); gelatina obtenida a partir de piel de cerdo mediante extracción ácida (tipo A) y gelatina obtenida de piel bovina mediante extracción básica (tipo B), ambas con una fuerza nominal de 230°Bloom (SBI-Systems Bio-Industries, Baupte, Francia); y como estárter para la realización de la fermentación tradicional, un cultivo comercial llamado Yogur N°56, compuesto por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* (SBI-Systems Bio-Industries, Barcelona, España).

4.2.2. Preparación del yogur

El protocolo utilizado para la preparación del yogur está representado en la figura 4.2. Se prepararon dos lotes de yogures. Uno con adición de gelatina como estabilizante, y otro, con adición de gelatina y de un 5% de leche en polvo. También se prepararon muestras sin adición ni de sólidos ni de gelatina y otras sin adición de gelatina.

Además de la concentración de gelatina permitida (0.3%), se utilizaron tres concentraciones adicionales de 0.6, 0.9 y 1.5% con el fin de obtener una amplia gama de texturas.

Pre calentamiento de la leche

La leche reconstituida se preparó a partir de leche en polvo desnatada a una concentración de 10% (p/p). A continuación, se le añadió la cantidad correspondiente de gelatina o sólidos lácteos, según el caso.

Las adiciones y extractos secos de las muestras preparadas en esta parte del estudio se presentan en la tabla 4.2.

Una vez preparadas las mezclas, se sometieron a un pre calentamiento a 60°C para disolver la gelatina y los sólidos lácteos añadidos.

Tratamiento térmico

Se realizó un calentamiento de las muestras a 85°C durante 30 minutos.

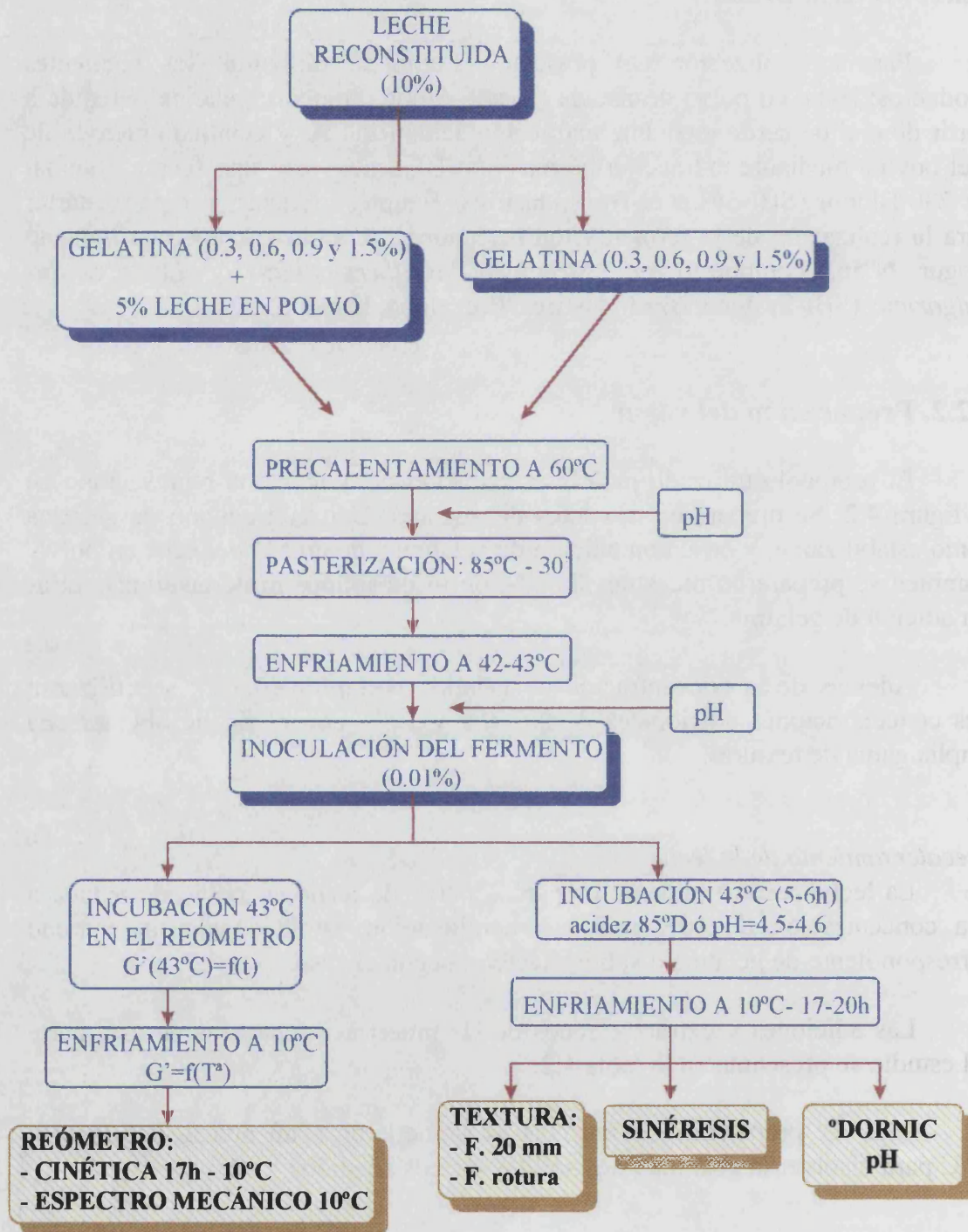


Figura 4.2. Protocolo de preparación de las muestras de yogur con gelatina añadida.

Tabla 4.2. Composición y contenido en extracto seco total de los yogures preparados.

CONCENTRACIÓN GELATINA (%)	CONCENTRACIÓN SÓLIDOS LÁCTEOS AÑADIDOS(%)	EXTRACTO SECO (%)
0.0%	----	10.00
	5%	14.50
0.3%	----	10.27
	5%	14.77
0.6%	----	10.54
	5%	15.04
0.9%	----	10.81
	5%	15.31
1.5%	----	11.35
	5%	15.85

Fermentación

Después del tratamiento térmico se enfriaron las muestras hasta 42-43°C (temperatura de incubación recomendada para el cultivo comercial utilizado) y se inoculó el fermento, compuesto por *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, a una concentración de 0.01%. La fermentación se realizó a dicha temperatura. El tiempo de incubación fue de 4-6 horas, dependiendo de la composición de las muestras estudiadas y se determinó mediante la medida del pH y de los grados Dornic. Para que se considerara finalizada la fermentación, estos parámetros tuvieron que alcanzar los valores de 4.5-4.6 para el pH y 85°Dornic aproximadamente.

Enfriamiento y almacenamiento

Se disminuyó la temperatura del yogur desde 42-43°C hasta 7-10°C para controlar la acidez final del producto en un baño de agua y hielo.

Las muestras de yogur se mantuvieron durante 17-20 horas a 7-10°C para proceder posteriormente a realizar los ensayos necesarios para determinar sus características mecánicas y reológicas.

4.2.3. Determinación de la acidez de las muestras

- Medida del pH: pHmetro micropH 2001-Crison (Crison Instruments S.A., Alella, España).

- Medida de los °Dornic (parámetro utilizado en la industria de derivados lácteos), que representan el contenido en ácido láctico que tiene la muestra. Se

define como el número de décimas de cm^3 de sosa N/9 (Licor Acidimétrico Valorado, Panreac) utilizadas para valorar 10 cm^3 de producto en presencia de fenoftaleína. Se calculan mediante la siguiente expresión:

$$^{\circ}\text{DORNIC} = \text{ml (sosa utilizada)} \times 10$$

Se efectuaron ambas medidas de la acidez en las siguientes etapas:

- Antes del tratamiento térmico.
- Antes de la inoculación del fermento (42°C).
- Para determinar el punto final de la fermentación (42°C), es decir, para comprobar en qué momento la muestra alcanzó un pH de 4.5-4.6 o unos 85°Dornic .
- Después del almacenamiento de las muestras a $7-10^{\circ}\text{C}$ durante 17-20 horas, para caracterizar la acidez final del producto terminado.

4.2.4. Determinación del grado de sinéresis

La sinéresis de las muestras se midió después del almacenamiento. Para ello se utilizó una jeringuilla estéril de 1 ml de capacidad y se determinó por la cantidad de ml de suero liberado cada 100 g de muestra.

4.2.5. Análisis del comportamiento de los geles mediante ensayos reológicos a grandes deformaciones: ensayos de penetración

La firmeza de los yogures se determinó mediante la realización de un ensayo de penetrometría usando un texturómetro TA.XT2.

Estos ensayos se realizaron utilizando un émbolo cilíndrico de base plana de 12.7 mm de diámetro con una velocidad de cabezal de 1 mm/s. La distancia de penetración del émbolo en el yogur se fijó en 20 mm para todas las muestras.

El parámetro que se utiliza para estudiar la textura de las muestras es la firmeza, que se define como la fuerza máxima obtenida durante la penetración del émbolo en la masa del yogur hasta una profundidad de 20 mm o la fuerza de rotura, en los casos que se produzca una rotura del gel, que se advierte por la presencia de un pico u hombro en la curva inicial ascendente (ver capítulo 3.3.2).

4.2.6. Análisis del comportamiento de los geles mediante ensayos reológicos a pequeñas deformaciones

Los ensayos dinámicos oscilatorios se efectuaron con un reómetro Physica Rheolab MC120. La muestra se colocó en un sistema de cilindros concéntricos, según puede verse en la figura 4.3, de 17 ml de volumen con R_i de 1.25 cm; R_a de 1.356 cm; R_s de 0.35 cm; L de 3.75 cm; L' de 1.55 cm y L'' de 1.25 cm (ver capítulo 2).

La frecuencia se fijó en 1 Hz y la amplitud de deformación en 0.5% para todos los ensayos. Una vez inoculadas las muestras con el fermento, se cogió una alícuota de 17 ml y se introdujo en el sistema de cilindros concéntricos del reómetro. Este sistema ya se había llevado previamente a la temperatura requerida para la fermentación (42°C). Al igual que en los geles del capítulo anterior, para evitar la evaporación durante el proceso de incubación se añadió una pequeña cantidad de parafina líquida sobre la superficie expuesta de la muestra. A continuación, se dejó la muestra incubando en el reómetro a 42°C durante 4-6 h. La fermentación se detuvo a igual tiempo de incubación que la misma muestra puesta en el baño a 42°C. Sobre ésta se efectuaron los controles adecuados de pH para determinar el tiempo de interrupción de la fermentación.

Las determinaciones que se realizaron a continuación fueron el registro de la curva de enfriamiento hasta 10°C, para determinar la temperatura de formación del gel, el registro de la curva de cinética de maduración y el del espectro mecánico.

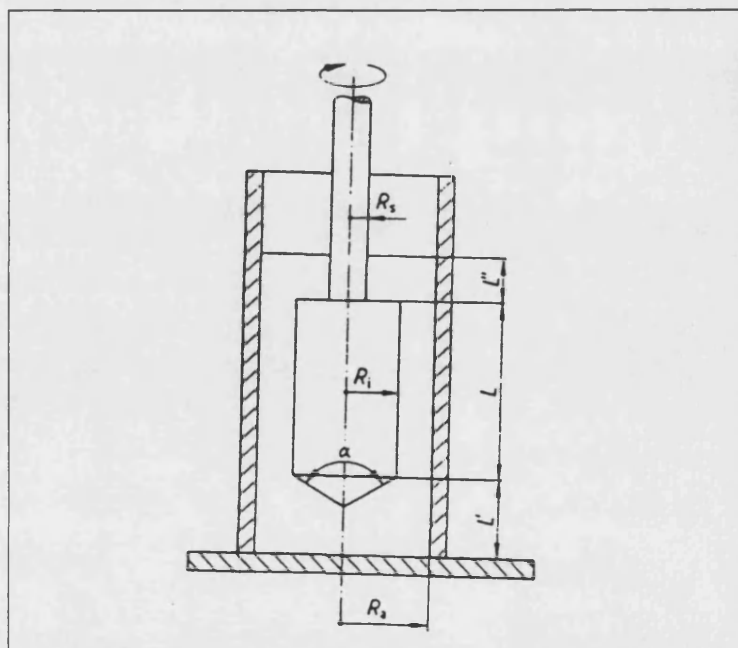


Figura 4.3. Esquema de la geometría de cilindros concéntricos utilizada con las muestras de yogur.

4.2.6.1. Determinación de la región lineal viscoelástica

Para determinar el intervalo lineal viscoelástico de las muestras, se realizó un barrido de amplitudes de deformación a una frecuencia de 1 Hz con las concentraciones extremas de gelatina (figura 4.4).

La deformación elegida fue de 0.5%. A partir de valores de deformación del 3%, G' ya no es constante con la deformación. Esto está de acuerdo con Steventon y col. (1988), que expuso que el límite de la región lineal viscoelástica, en el caso del yogur, se encontraba en una amplitud de deformación del 2%.

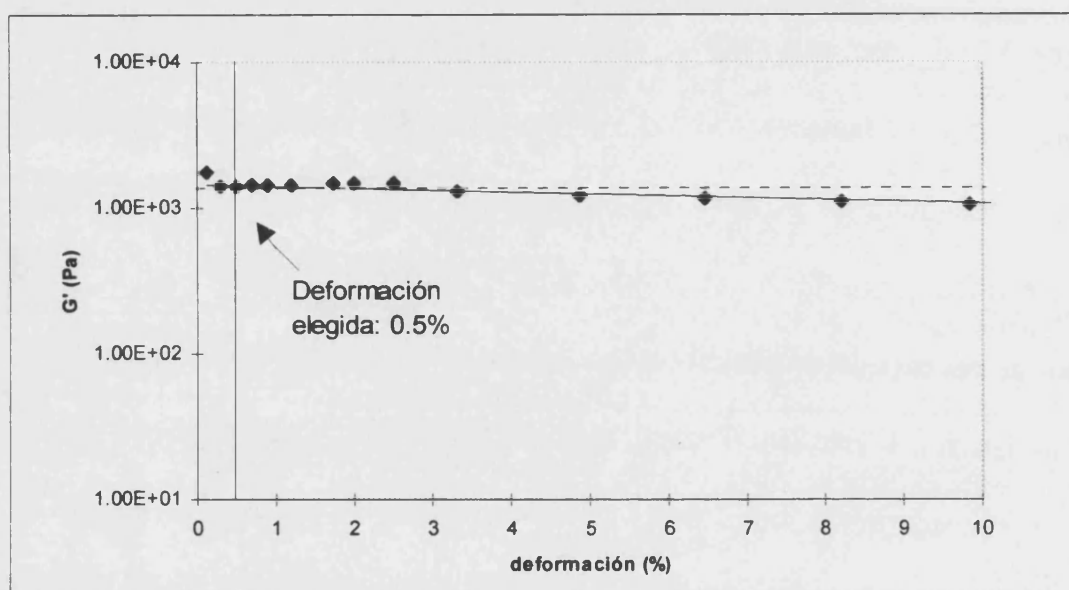


Figura 4.4. Variación del módulo de elasticidad (G') con la amplitud de deformación para una muestra de yogur con gelatina (1.5%).

4.2.6.2. Determinación de la temperatura de formación del gel

Una vez detenida la fermentación de la muestra en el reómetro, se sometió a un proceso de enfriamiento desde los 42°C hasta 10°C, a una velocidad de 1°C/minuto. El punto de transición del estado líquido al sólido se determinó por el cruce entre G' y G'' (Doublier y Cuvelier, 1996). Este punto indicó la temperatura a la que se forma el gel.

4.2.6.3. Cinética de maduración

Se estudió la cinética de maduración de las muestras a 10°C durante 17-20 horas por seguimiento de la variación de G' con el tiempo durante el periodo de estabilización.

4.2.6.4. Espectro mecánico

En los geles de yogur, este ensayo se realizó a continuación de la cinética de maduración, es decir, una vez que el yogur ya está formado completamente se registró la variación de G' y G'' con la frecuencia. El intervalo de frecuencias estudiado fue 0.01-100 Hz.

4.2.7. Análisis estadístico

Se realizaron tres repeticiones de cada muestra y se utilizó la técnica del Análisis de la Varianza (ANOVA) a un nivel de significación del 95%, usando el programa estadístico Statgraphics Plus para Windows 2.1. Se analizaron los efectos del tipo y concentración de gelatina en el estudio mecánico de los yogures.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Determinación de la acidez

La acidez de las muestras se determinó mediante un método potenciométrico (acidez real) y mediante el cálculo de los °Dornic a partir de una valoración de la muestra con NaOH (% ácido láctico, 85°Dornic corresponden a 0.9% de ácido láctico, aproximadamente).

Aunque la relación entre estos dos métodos no es directa, la determinación del pH mediante el uso de un pHmetro es sumamente conveniente, además de ser una técnica utilizada de forma habitual en la fabricación del yogur. Sin embargo, para controlar la acidez correspondiente a la formación de ácido láctico del producto es aconsejable tomar muestras representativas y determinar la acidez titulable. A través de esta acidez, se manifiestan rápidamente los cambios en la actividad de los microorganismos estárter. Viene determinada por la acidez natural de la leche más la acidez desarrollada debida a la actividad de las bacterias; como la primera apenas varía, la acidez titulable es una buena indicación de la actividad del fermento inoculado.

El punto final del proceso de incubación se establece cuando se obtiene un valor de pH entre 4.5-4.6 ó unos 85°Dornic (0.9% ácido láctico), sin embargo, la proporción de ácido láctico adecuada para considerar finalizada la incubación varía según el país y el tipo de yogur. Por ejemplo, en Holanda el yogur búlgaro debe tener una acidez de hasta 1.48% de ácido láctico, mientras que otros tipos de yogur se venden con una acidez máxima de 1.17% de ácido láctico. La International Dairy Federation (IDF) ha propuesto un mínimo de 0.7 g de ácido láctico por 100 g de yogur (Tamime y Robinson, 1991).

En la tabla 4.3 se muestra el control de la acidez de las muestras durante las etapas previas a la incubación del yogur.

Como ya se ha visto en apartados anteriores, la adición de gelatina a las muestra de leche dio lugar a una pequeña disminución en el pH.

Con respecto a los °Dornic, las muestras que llevan incorporados sólidos lácteos en su composición presentaron mayor acidez titulable ya que es mayor la aportación de componentes tales como ácido cítrico, caseinatos o sales ácidas tipo bicarbonatos.

La presencia de gelatina disminuyó en más de una hora el tiempo de incubación de las muestras probablemente debido a que su presencia aporta cierto grado de acidez.

Tabla 4.3. Tiempo de incubación y acidez en las diversas etapas de la elaboración del yogur utilizando dos tipos de gelatina.

GELATINA (%)	TIPO GELATINA	SÓLIDOS LÁCTEOS (%)	ACIDEZ ANTES DEL CALENTAMIENTO		ACIDEZ ANTES INOCULAR	TIEMPO DE INCUBACIÓN A 42°C (h)
			pH	°DORNIC	pH	
0%	----	-----	6.66 (0.34)	24.67 (2.02)	6.60 (0.02)	6.33 (0.29)
	----	5%	6.57 (0.02)	36.33 (1.53)	6.51 (0.01)	4.67 (0.58)
0.3%	A	-----	6.63 (0.03)	23.33 (0.58)	6.60 (0.04)	4.66 (0.58)
		5%	6.54 (0.05)	37.0 (0.87)	6.43 (0.04)	4.17 (0.29)
	B	-----	6.65 (0.07)	24.50 (1.80)	6.52 (0.02)	5.67 (0.58)
		5%	6.54 (0.06)	39.17 (3.33)	6.42 (0.02)	4.50 (0.00)
0.6%	A	-----	6.63 (0.00)	26.00 (3.61)	6.63 (0.01)	4.63 (0.40)
		5%	6.53 (0.03)	38.50 (3.50)	6.45 (0.08)	4.00 (0.00)
	B	-----	6.60 (0.06)	24.83 (1.61)	6.50 (0.02)	4.67 (0.29)
		5%	6.53 (0.06)	39.83 (0.76)	6.41 (0.01)	4.33 (0.29)
0.9%	A	-----	6.59 (0.05)	25.17 (1.04)	6.55 (0.05)	4.17 (0.29)
		5%	6.50 (0.03)	37.33 (2.89)	6.43 (0.07)	4.17 (0.29)
	B	-----	6.58 (0.05)	26.93 (0.75)	6.48 (0.00)	4.17 (0.29)
		5%	6.51 (0.05)	41.83 (2.25)	6.39 (0.01)	4.00 (0.00)
1.5%	A	-----	6.61 (0.03)	26.67 (1.26)	6.51 (0.06)	4.00 (0.00)
		5%	6.47 (0.06)	40.00 (2.00)	6.39 (0.04)	4.00 (0.00)
	B	-----	6.58 (0.06)	28.00 (0.87)	6.48 (0.02)	4.17 (0.29)
		5%	6.49 (0.07)	45.00 (2.18)	6.39 (0.03)	4.17 (0.29)

Los valores entre paréntesis son las desviaciones estándar.

Una vez formados los yogures, y enfriados en un baño de hielo y agua, se almacenaron 17 h a 10°C para medir posteriormente la acidez final alcanzada (tabla 4.4).

Tabla 4.4. Acidez final de las muestras de yogures preparados con dos tipos de gelatina.

[GELATINA] (%)	SÓLIDOS LÁCTEOS (%)	pH		°DORNIC	
		GELAT. A	GELAT. B	GELAT. A	GELAT. B
0.3%	----	4.53a (0.08)	4.42a (0.08)	93.50a (7.70)	96.17a (9.08)
	5%	4.42a (0.18)	4.46a (0.08)	126.50a (13.5)	135.67a (17.93)
0.6%	----	4.42a (0.09)	4.51a (0.08)	97.50a (1.32)	88.17b (1.76)
	5%	4.41a (0.11)	4.39a (0.08)	122.50a (7.79)	131.67a (4.62)
0.9%	----	4.40a (0.06)	4.38a (0.09)	90.83a (7.32)	89.83a (1.89)
	5%	4.49a (0.10)	4.36a (0.04)	116.33a (9.87)	130.83a (1.76)
1.5%	----	4.28a (0.03)	4.33a (0.08)	-----	-----
	5%	4.40a (0.06)	4.54b (0.06)	-----	-----
0.0%	----	4.56 (0.04)		83.33 (2.36)	
	5%	4.60 (0.08)		129.00 (2.65)	

Los valores entre paréntesis son las desviaciones estándar.

En la misma fila, y para cada parámetro, valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) según el test LSD.

Con respecto al pH, se observó que los valores de pH de las muestras sin gelatina siguen siendo ligeramente superiores a las muestras con gelatina. Al estudiar la influencia del tipo de gelatina utilizado, se vio que no hay diferencias significativas entre la gelatina ácida y básica tanto para los valores de pH como para los grados Dornic. Sin embargo, al estudiar la influencia de la concentración de gelatina se apreció una ligera tendencia a disminuir el pH a medida a que aumenta la concentración de gelatina. Esta dependencia es más clara en los yogures que no llevan sólidos lácteos añadidos.

Hay que destacar que en los yogures preparados con 1.5% de gelatina, no se pudieron medir los °Dornic debido a que resultaron ser unos geles muy duros.

4.3.2. Determinación de la sinéresis

Se determinó la sinéresis que presentaron las muestras después del almacenamiento 17 h a 10°C (tabla 4.5).

Tabla 4.5. Valores de sinéresis de los yogures después de almacenarlos durante 17 h a 10°C.

GELATINA (%)	SINÉRESIS (ml)			
	SIN S.L.		CON S.L.	
	A	B	A	B
0.3%	0.61b	1.70b	0.22ab	0.13b
0.6%	0.05c	0.20c	0.18b	0.15b
0.9%	0.07c	0.03c	0.13c	0.10b
1.5%	0.03c	0.02c	0.08d	0.05c
0.0%	2.08a		0.25a	

En la misma columna, valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) según el test LSD.

Los yogures sin agregado de gelatina presentaron un grado moderado de sinéresis que disminuyó con la presencia de un 5% de sólidos lácteos. Como se puede observar, la presencia de gelatina hizo desaparecer prácticamente el efecto de la pérdida de suero.

La adición de agentes gelificantes al yogur favorece la retención de agua dentro del gel y, por tanto, previene la sinéresis posterior que pueda sufrir el mismo debido al tratamiento térmico de las proteínas de la leche por pasterización o a shocks mecánicos sufridos por el coágulo del yogur durante su producción y distribución. Además, estos agentes aumentan la firmeza del gel (Kalab, 1979).

Al estudiar el efecto de la concentración, se vio que la sinéresis aún fue apreciable con concentraciones de gelatina de 0.3% y prácticamente inexistente con concentraciones mayores.

4.3.3. Análisis del comportamiento de los geles mediante ensayos reológicos a grandes deformaciones: ensayos de penetración

4.3.3.1. Estudio del perfil de las curvas de penetración

Debido al tipo de estructura del gel de yogur, la técnica más extendida para estudiar su textura es la utilización de penetrómetros. Esta técnica es bastante reproducible y versátil, lo que facilita el registro de las propiedades reológicas de los yogures (Tamime y Robinson, 1991); sin embargo, las medidas realizadas sólo son útiles si las condiciones del ensayo están bien normalizadas.

La disolución de gelatina en leche antes de la formación del yogur tuvo un efecto muy importante sobre la textura de los productos finales. En algunos ensayos previos pudo verse que aún a concentraciones menores que 1% de gelatina los cambios de firmeza fueron notorios. Por esta razón, para el presente estudio se seleccionaron concentraciones de gelatina entre 0.3% y 1.5% con el fin de obtener una amplia gama de texturas pero no muy alejadas de las del yogur.

En la figura 4.5. puede apreciarse cómo varió el perfil de las curvas de penetración en función de la cantidad de gelatina presente en el producto final. A una concentración de 0.3%, la curva presenta forma de meseta y prácticamente se superpuso con la del yogur sin gelatina, manteniéndose el valor de la fuerza de penetración constante hasta el final del ensayo, es decir, hasta 20 mm de penetración. A una concentración de 0.6% de gelatina, el valor de la fuerza de dicha meseta fue prácticamente el doble. Con una cantidad de gelatina de 0.9%, la forma de la curva varió, apareciendo un “hombro” o inflexión que indicó una fuerza de rotura, aunque débil, después de un breve período de compresión (0.37 N a 4 mm de desplazamiento). El valor de la fuerza al final del ensayo, correspondiente a 20 mm de penetración, fue mayor que dicha fuerza de rotura, sin embargo, cabe destacar que dicha fuerza final no es representativa de ningún verdadero valor textural sino sólo la consecuencia del incremento del rozamiento del émbolo dentro de la masa cohesiva de un gel bastante consistente. Por lo tanto, es conveniente registrar el valor de la primera fuerza máxima relativa como “resistencia o firmeza del gel” para este tipo de muestra. Es interesante destacar aquí que algunos texturómetros comerciales registran el valor de la fuerza final, es decir, el correspondiente al desplazamiento preseleccionado, como resultado de los ensayos que, en realidad, no respondería a lo que se quiere medir. La curva obtenida para una concentración de 1.5% de gelatina correspondió a la de un gel firme que se rompió después de casi 10 mm de recorrido del émbolo, es decir, que el gel se deformó por compresión antes de romperse hasta sufrir una gran fractura en su estructura, indicada por la magnitud de la caída del valor de la fuerza (figura 4.5). En esta caso, al igual que en el anterior, esta primer valor de inflexión de la fuerza indicó el momento de la rotura (1.35 N) y, por lo tanto, la

resistencia mecánica del gel a la compresión. El valor de la fuerza que se registró en el momento de alcanzar los 20 mm de penetración (1.6 N) vuelve a no ser indicativo de ninguna característica física.

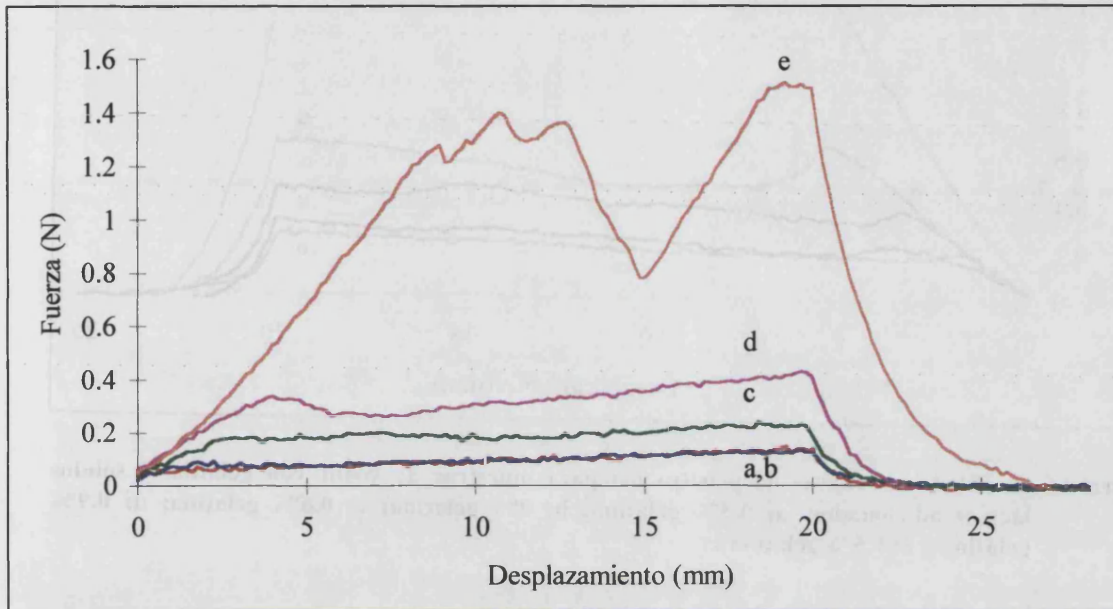


Figura 4.5. Perfil de las curvas de penetración para muestras de yogur con gelatina adicionada (a: 0% gelatina; b: 0.3% gelatina; c: 0.6% gelatina; d: 0.9% gelatina y e: 1.5% gelatina).

El agregado de sólidos lácteos en la elaboración del yogur es una práctica muy corriente que tiene gran influencia en la textura del producto final aumentando la firmeza y confiriéndole una textura más suave (Tamime y Deeth, 1980; Martinou-Voulasiki y Zerfiridis, 1990), por lo que se consideró interesante estudiar su efecto sobre la textura de los yogures elaborados.

Comparando la familia de curvas correspondientes a los yogures elaborados con un agregado de 5% de sólidos lácteos (figura 4.6) con la correspondiente a los yogures sin sólidos (figura 4.5), se concluyó que ambas presentaron formas similares. En presencia de sólidos, como cabe esperar, las fuerzas fueron algo mayores comparando los sistemas que contienen iguales concentraciones de gelatina.

Harwalkar y Kalab (1980) analizaron la microestructura de geles lácteos conteniendo 10, 20 y 30% de sólidos y encontraron que la red formada en los geles con 30% de sólidos era considerablemente más densa que la correspondiente a los geles con un 10% de sólidos, lo que justifica su firmeza.

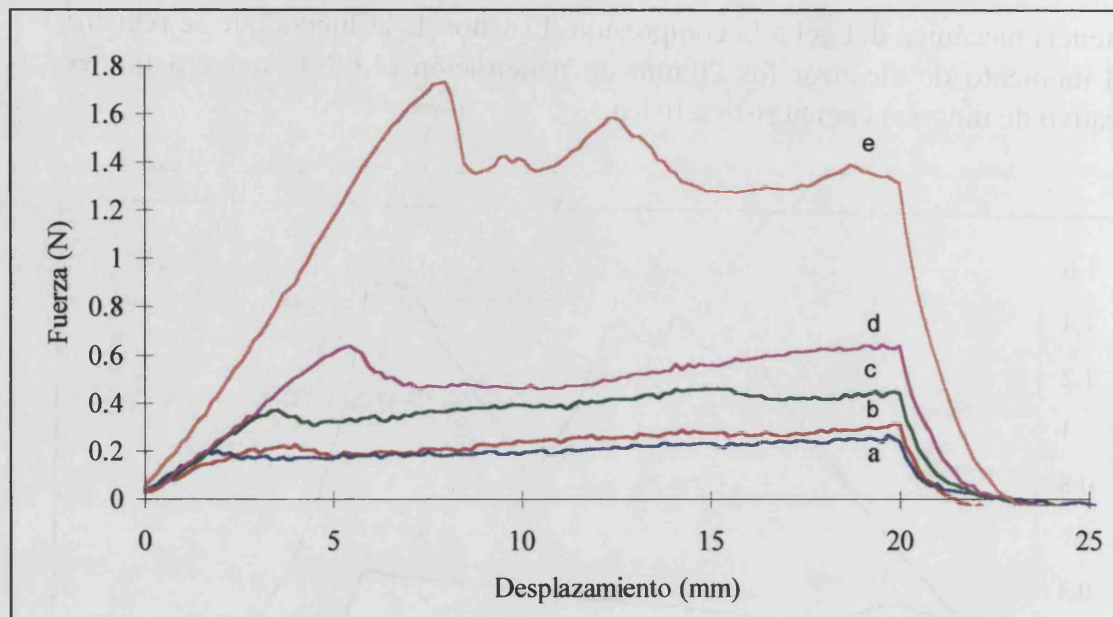


Figura 4.6. Perfil de las curvas de penetración para muestras de yogur con gelatina y sólidos lácteos adicionados (a: 0.3% gelatina; b: 0% gelatina; c: 0.6% gelatina; d: 0.9% gelatina y e: 1.5% gelatina).

En la curva correspondiente a una concentración de 0.9% de gelatina también se presentó un “hombro” que fue más pronunciado y apareció a distancias de penetración algo más altas, lo que indicó una mayor resistencia de la muestra (0.65 N, comparados con 0.37 N sin sólidos lácteos). La concentración del 1.5% de gelatina mostró un perfil y un pico de rotura similares al del yogur correspondiente sin agregado de sólidos lácteos (1.7 N y 1.35 N, respectivamente). Por tanto, se puede concluir que a medida que la concentración de gelatina es mayor, la firmeza de los geles está más influenciada por la concentración de gelatina que por la presencia de sólidos lácteos adicionales. Cabe destacar que en este caso, el perfil después de la rotura presentó picos menos agudos, lo que sería un índice de una mayor cohesividad atribuible a la presencia de los sólidos.

En ninguna muestra se pudo realizar un TPA instrumental por compresión ya que la consistencia de las mismas no permitió obtener muestras con dimensiones regulares para ser sujetas a una compresión uniaxial.

En la tabla 4.6 pueden verse los valores de firmeza de las muestras de 0.3 y 0.6% de concentración de gelatina, así como los de las muestras que no llevan gelatina adicionada. En general, no se apreciaron diferencias significativas entre los valores obtenidos con gelatina tipo A y tipo B.

Tabla 4.6. Valores de firmeza de las muestras de yogur que presentaron un perfil de la curva de textura típico de yogur, donde no se apreció rotura del gel.

GELATINA (%)	SÓLIDOS LÁCTEOS (%)	FIRMEZA (N) (20 mm desplazamiento)	
		GELATINA A	GELATINA B
0.3%	-----	0.14a (0.01)	0.13a (0.01)
	5%	0.27a (0.05)	0.28a (0.02)
0.6%	-----	0.23a (0.02)	0.19b (0.01)
	5%	0.43a (0.01)	0.43a (0.02)
0%	-----	0.17 (0.01)	
	5%	0.32 (0.01)	

Los valores entre paréntesis son las desviaciones estándar.

En la misma fila, valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) según el test LSD.

En los geles en los que se produjo una rotura (0.9 y 1.5% de gelatina), tampoco se apreciaron diferencias significativas debidas al efecto del tipo de gelatina utilizado (tabla 4.7).

Tabla 4.7. Valores de firmeza de las muestras de yogur que presentaron un perfil de la curva de textura donde se apreció rotura del gel.

GELATINA (%)	SÓLIDOS LÁCTEOS (%)	FUERZA ROTURA (N)		DESPLAZAMIENTO (mm)	
		GELAT. A	GELAT. B	GELAT. A	GELAT. B
0.9%	-----	0.37a (0.02)	0.36a (0.01)	5.3a (0.5)	6.1a (0.1)
	5%	0.55a (0.04)	0.60a (0.01)	5.3a (0.8)	5.0a (0.2)
1.5%	-----	1.53a (0.10)	1.40a (0.04)	11.2a (0.8)	12.2a (0.2)
	5%	1.57a (0.17)	1.39b (0.06)	8.3a (1.3)	8.7a (0.3)

Los valores entre paréntesis son las desviaciones estándar.

En la misma fila, y para cada parámetro, valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) según el test LSD.



En estos geles, al aumentar la concentración de gelatina también se observó un aumento en el valor de la fuerza de rotura, así como en el desplazamiento producido por el émbolo sobre la superficie del yogur hasta el punto de rotura, lo que implica una mayor deformabilidad de las muestras.

4.3.4. Análisis del comportamiento de los geles mediante ensayos reológicos a pequeñas deformaciones

4.3.4.1. Valor del pH obtenido en las muestras preparadas en el reómetro

Al analizar los valores de pH de los yogures obtenidos en sus envases, en los que la fermentación se realizó en un baño a 42°C, con los de los yogures fermentados en el reómetro también a 42°C, se observó que los segundos presentaron menores los valores de pH que los primeros (tabla 4.8).

Tabla 4.8. Valores de pH final de las muestras fermentadas en el reómetro y en un baño a 42°C.

GELATINA (%)	SÓLIDOS LÁCTEOS (%)	pH (baño)	pH (reómetro)
0.3	-----	4.53	4.23
	5%	4.42	4.32
0.6	-----	4.42	4.19
	5%	4.41	4.25
0.9	-----	4.40	4.19
	5%	4.49	4.32
1.5	-----	4.28	4.29
	5%	4.40	4.34
0%	-----	4.56	4.09
	5%	4.60	4.40

Como se ha dicho anteriormente, debido a la imposibilidad de controlar el pH de las muestras mientras están en el reómetro, la fermentación se detuvo cuando hubo transcurrido el mismo tiempo que el que la muestra correspondiente empleó para alcanzar un pH de 4.5-4.6 en la incubación en baño.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede deducir que la muestra necesitaría menos tiempo de incubación en el reómetro. Para hacer un seguimiento de la evolución del pH de estas muestras se realizó una experiencia utilizando una muestra de yogur que contenía una concentración del 0.9% de gelatina. Se efectuó la incubación en el reómetro a tres tiempos diferentes: 4 h,

3 h 30 min y 3 h. Los pH finales obtenidos son de 4.19, 4.28 y 4.65, respectivamente.

Los valores obtenidos a los diferentes tiempos de incubación indican que un tiempo de 3 h 30 min de incubación podría ser suficiente. Probablemente, estas diferencias se deben al tamaño de muestra y geometría del recipiente. En el reómetro se colocan 17 ml de muestra inoculada que se alojan en un recipiente en el que queda distribuido como una capa fina. Además, hay que considerar que luego de transcurrido el tiempo de incubación, la velocidad de enfriamiento tampoco es la misma en un envase de 100 ml que en la célula del reómetro.

Se realizó un espectro mecánico de estas tres muestras, después de mantenerlas 17 h a 10°C, para estudiar su comportamiento en función del tiempo de incubación.

En la figura 4.7 se aprecia la evolución de G' y G'' en función de la frecuencia. Con respecto a la muestra incubada durante 3 h, puede verse que G' y G'' mostraron una clara dependencia con la frecuencia. A medida que se incrementó el tiempo de incubación, la representación de los módulos en función de la frecuencia indicó la formación de una estructura más estable.

Por tanto, un tiempo de incubación de 3 h 30 min podría ser suficiente para incubar esta muestra en el reómetro.

Para poder detectar con precisión el punto final de la incubación en el reómetro, se tendría que disponer de algún método de medida de pH introducido en la muestra para controlarlo cada cierto intervalo de tiempo, como ocurre con la fermentación de las muestras en el baño, y así poder detener la fermentación cuando el pH sea de 4.5-4.6. En los trabajos de la literatura se utiliza siempre la fermentación en un baño controlado para detectar el final de la incubación en un reómetro (Gastaldi y col., 1996).

4.3.4.2. Determinación de la temperatura de formación del gel

Para determinar la temperatura a la que se forma el gel en el yogur, se enfrió la muestra, fermentada en el reómetro, hasta una temperatura de 10°C. La temperatura a la que se produce el entrecruzamiento entre las curvas correspondientes a G' y G'' se definió como temperatura de formación del gel, ya que se registra el paso de un estado de transición entre la fase sol y la fase gel de la muestra (Doublier y Cuvelier, 1996).

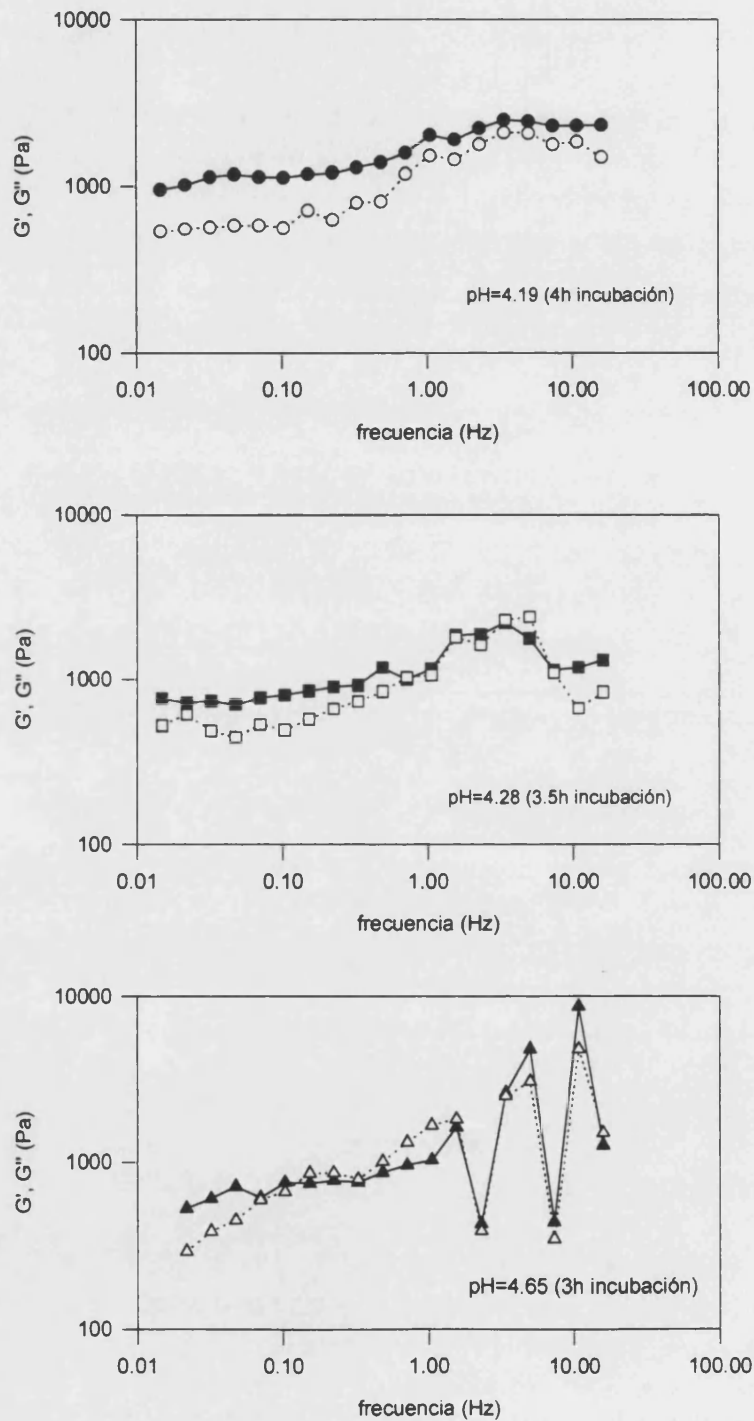


Figura 4.7. Espectro mecánico de una muestra de yogur que contiene 0.9% de gelatina a diferentes tiempos de incubación (símbolos negros: G' ; símbolos blancos: G'').

Como se puede ver en la tabla 4.9, la presencia de gelatina prácticamente no altera la temperatura de formación de gel en las muestras que no contienen sólidos lácteos. Mientras que en las muestras con un 5% de sólidos lácteos añadidos, la presencia de gelatina aumenta en más de 10°C la temperatura de formación del gel.

Esto es un dato de importancia para la industria láctea ya que normalmente, una vez llenados los envases, es interesante tener en cuenta la temperatura de formación del gel con el objetivo de evitar shocks mecánicos o movimientos durante esta delicada etapa.

Tabla 4.9. Valores de temperatura de formación del gel de yogur, con y sin sólidos lácteos añadidos.

GELATINA (%)	SÓLIDOS LÁCTEOS (%)	TEMPERATURA (°C)
0%	----- 5%	14.4 20.3
0.3%	----- 5%	13.4 32.4
0.6%	----- 5%	15.6 35.9
0.9%	----- 5%	16.9 33.7
1.5%	----- 5%	14.2 25.6

Utilizando gelatina básica, sólo se realizaron estos ensayos reológicos con la mínima y máxima concentración (0.3% y 1.5%) y no se encontraron cambios en el comportamiento reológico de los yogures ni en su temperatura de gelificación.

4.3.4.3. Cinética de maduración

En la figura 4.8 puede observarse las cinéticas de maduración de las muestras de yogur a 10°C durante 17 h (tiempo de maduración necesario para la formación estable de un gel de gelatina).

Cabe destacar que los geles no presentaron un mayor crecimiento inicial de G' en función del tiempo lo que indica que la estructura del gel no se basa en una red de gelatina sino en una red de micelas de caseína entrecruzadas con la gelatina presente.

En general, todas las muestras presentaron un comportamiento similar, aumentando G' ligeramente a medida que aumenta el tiempo de maduración. En los yogures que no llevan sólidos lácteos en su composición, el valor de G' fue muy similar en todos los casos. El gel de 1.5% de gelatina presentó valores de G' superiores indicando un mayor grado de “solidez”. Con respecto a la influencia de los sólidos lácteos añadidos, en todos los casos se observó un aumento de la rigidez de las muestras. Este resultado es paralelo al obtenido en la determinación de la firmeza, parámetro que fue mayor en los casos en los que se había añadido sólidos lácteos.

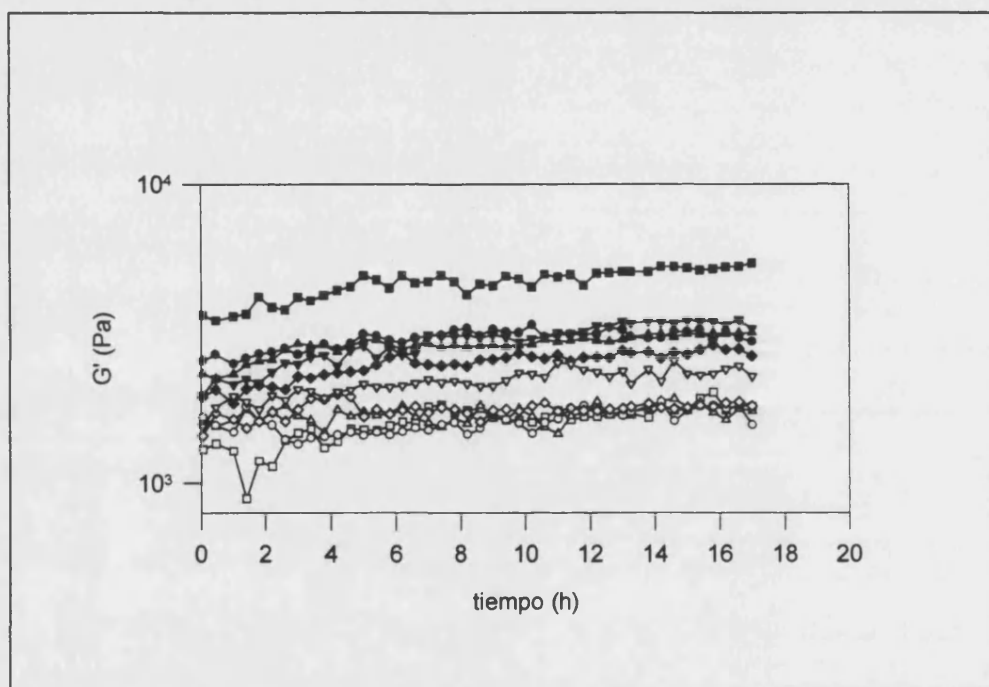


Figura 4.8. Cinética de maduración de muestras de yogur preparadas con gelatina ácida a 10°C:
 □ 0% gelatina, △ 0.3% gelatina, ○ 0.6% gelatina, ◇ 0.9% gelatina, ▽ 1.5% gelatina,
 ■ 5% sólidos lácteos, ▲ 0.3% gelatina + 5% sólidos lácteos, ● 0.6% gelatina + 5% sólidos
 lácteos, ◆ 0.9% gelatina + 5% sólidos lácteos y ▼ 1.5% gelatina + 5% sólidos lácteos.

Cabe destacar que los valores de G' indican que la mayor estabilidad estructural corresponde a la muestra sin gelatina. La adición de ésta reduce el valor de G' probablemente debido a que la segunda red formada no es tan estable cuando en el medio de gelificación encuentra “impedimentos” físicos debido a la presencia de sólidos.

Influencia del tipo de gelatina

En los ensayos de determinación de la reología a grandes deformaciones ya se vio que el tipo de gelatina no influía en la firmeza de los yogures.

Con los estudios de reometría oscilatoria se analizaron sólo las dos concentraciones extremas de gelatina (0.3 y 1.5%) y no se detectaron diferencias de comportamiento.

4.3.4.4. Espectro mecánico

En la figura 4.9 está representado el espectro mecánico de las muestras de yogur. Este ensayo se realizó a 10°C, después de producirse la maduración de los geles durante 17 h a esa misma temperatura.

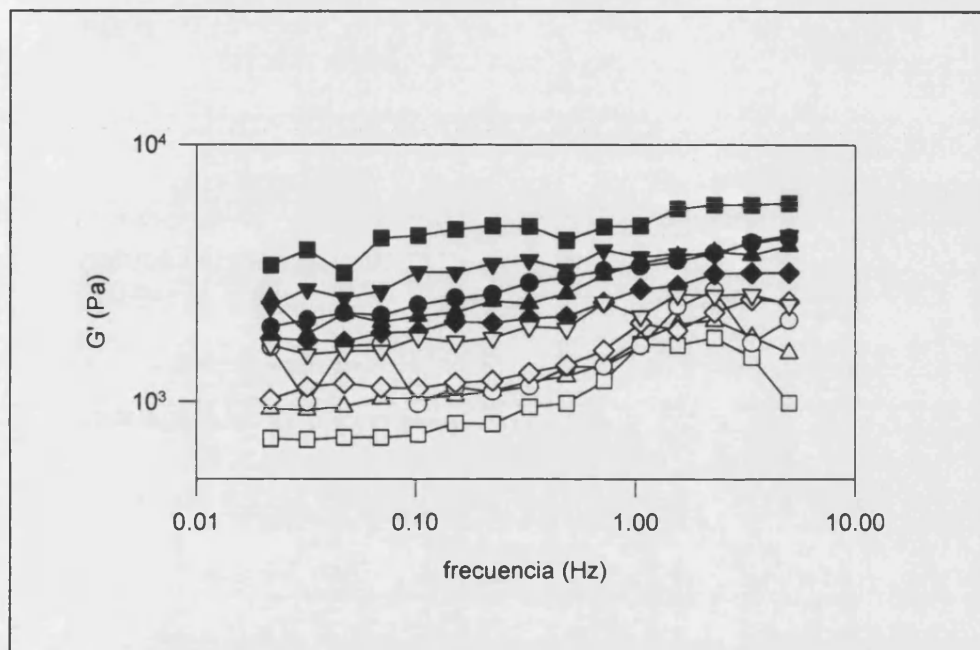


Figura 4.9. Espectro mecánico de muestras de yogur preparadas con gelatina ácida a 10°C:

- 0% gelatina, △ 0.3% gelatina, ○ 0.6% gelatina, ◇ 0.9% gelatina, ▽ 1.5% gelatina,
- 5% sólidos lácteos, ▲ 0.3% gelatina + 5% sólidos lácteos, ● 0.6% gelatina + 5% sólidos lácteos,
- ◆ 0.9% gelatina + 5% sólidos lácteos y ▼ 1.5% gelatina + 5% sólidos lácteos.

Como se puede observar, todas las muestras son dependientes de la frecuencia, sobre todo a valores altos de frecuencias, siendo la dependencia menor en las muestras que contienen sólidos lácteos, lo que refleja su mayor estabilidad.

Cabe destacar el caso de la muestra que tiene un 5% de sólidos lácteos y no contiene gelatina, que presenta el mayor valor de G' respecto de las demás muestras. Resultados que confirman la estabilidad de la muestra como se indicó en el análisis de la cinética de maduración. Por los resultados obtenidos tanto en el ensayo de cinética de maduración como en éste, se puede concluir que la muestra que lleva sólidos lácteos y no tiene gelatina incorporada, es la que

presenta un mayor componente elástico respecto del resto de las muestras. La adición de gelatina a muestras de yogur aporta una mayor dependencia de la frecuencia.

Al estudiar la influencia de la presencia de sólidos lácteos en las muestras (figura 4.9), se observa que en las muestras que no los contienen formaron un gel muy débil, sobre todo a 0.3% y 0.6% de gelatina, como se ve por su dependencia con la frecuencia.

En el caso de las muestras con 1.5% de gelatina, el gel mostró un comportamiento similar con o sin adición de sólidos lácteos. A esta concentración tan elevada el gel formado no se asemeja a las muestras de yogur sino más bien a geles más duros tipo cuajada.

Influencia del tipo de gelatina

Se realizó el espectro mecánico de las muestras con las concentraciones extremo de gelatina, es decir, de las muestras de 0.3% y 1.5% de gelatina ácida y básica (figura 4.10) con el objeto de analizar las diferencias debidas al tipo de gelatina.

Los valores de G' en función de la frecuencia para ambos tipos de gelatina prácticamente no revelaron diferencias entre ellas.

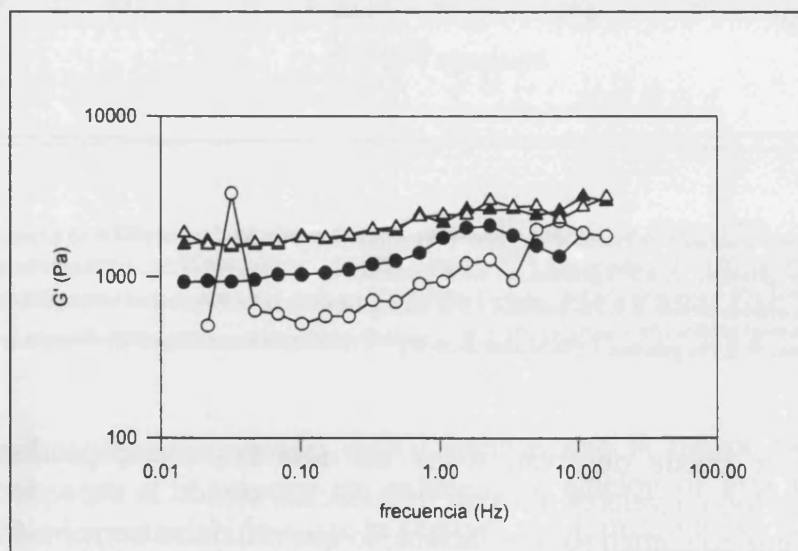


Figura 4.10. Espectro mecánico de muestras de yogur preparadas con gelatina ácida y básica a 10°C: ● 0.3% gelatina ácida, ○ 0.3% gelatina básica, ▲ 1.5% gelatina ácida y △ 1.5% gelatina básica.

CAPÍTULO 5

CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA POR CRYO-SEM DE GELES DE GELATINA EN LECHE

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

5.1. INTRODUCCIÓN

La Microscopía Electrónica es un complemento a otras técnicas que estudian los cambios físicos, químicos y bioquímicos que acontecen en el procesado de los alimentos, ya que hay una relación entre estos aspectos y los cambios estructurales que tienen lugar (Lewis, 1981 y 1986; Pérez-Munuera, 1995).

La Cryo-Microscopía Electrónica de Barrido (Cryo-SEM) está siendo utilizada durante los últimos años en el estudio de la microestructura de los productos lácteos. Sánchez y col. (1986) estudiaron por Cryo-SEM las propiedades estructurales del "double-cream cheese" durante su elaboración y almacenamiento a diferentes temperaturas. Taneya y col. (1992) describieron la estructura fibrosa del "string cheese". Los estudios de Rosenberg y Lee (1993) por SEM y Cryo-SEM revelaron que las proteínas estabilizan las emulsiones constituidas por grasa de leche deshidratada y proteínas de suero lácteo, mediante la formación de una película en la interfase aceite-agua. Xu y col. (1992) utilizaron la técnica de Cryo-SEM para estudiar el mecanismo de formación y la estructura de un gel de leche constituido por carragenatos y κ -caseínas y observaron que el gel obtenido es un producto versátil con un amplio intervalo de características reológicas que pueden ser controladas por el industrial.

Con el objeto de comparar las estructuras de todos los geles analizados de gelatina en leche, se procedió a realizar un estudio de la microscopía de algunas de las muestras utilizando la técnica Cryo-SEM.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

La crio-microscopía electrónica de barrido (CRYO-SEM) se llevó a cabo en un equipo Cryostage CT-1500C de Oxford Instruments, acoplado a un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-5410. La muestra se sumergió en N₂ nieve a temperatura $\leq -210^{\circ}\text{C}$, y se transfirió rápidamente a un Cryostage a 10^{-2} bar, donde se fracturó y se metalizó a vacío (2 mbar) con oro, durante cuatro minutos con una corriente de ionización de 2 mA. La observación en el microscopio electrónico de barrido se realizó a 15 kV y a una temperatura menor de -130°C , después de sublimar las muestras 30 minutos a -90°C .

Se analizaron las muestras que contenían un 1.5% de gelatina de los tres tipos de geles de leche estudiados (geles obtenidos en frío, en caliente y en base yogur, con y sin sólidos lácteos adicionados), así como las muestras obtenidas en caliente y el yogur sin presencia de gelatina.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caracterización microestructural de las muestras se llevó a cabo por Cryo-SEM. Las muestras se sublimaron (30 minutos a -90°C) antes de su observación microscópica con el objetivo de eliminar la escarcha superficial que pudiera ocultar estructuras subyacentes. Por otro lado, si existe mucha agua de disolución o de dispersión, su eliminación provoca una concentración de los solutos presentes o compuestos dispersos presentes los cuales, se desplazan microscópicamente durante la sublimación hasta entornos donde su concentración es tal que ya no es posible la sublimación. Ello produce observaciones ligeramente modificadas de la realidad, lo que en microscopía se denomina "artefactos", pero cuyo estudio puede dar también información valiosa sobre la microestructura que los generó.

Todas las microfotografías presentadas a continuación están tomadas con igual número de aumentos (5.000).

5.3.1. Geles ácidos obtenidos en frío

En la figura 5.1 se puede observar cómo la estructura del gel formado en estas condiciones (pH 5.3) se basa fundamentalmente en una red de gelatina en cuyo interior están retenidas las micelas de caseína. La gelatina aparece como una red de superficie lisa sobre la que se aprecian las micelas caseínicas, de aspecto granular. Durante la sublimación de la superficie se libera de agua y esto hace que los solutos se concentren, dando el aspecto de red característico de un artefacto: su densidad depende de la concentración de solutos y también de la facilidad de estos últimos para desplazarse hasta las paredes intersticiales.

Según estas observaciones, el comportamiento mecánico de los geles debe responder a una estructura base constituida por gelatina y dependiente principalmente de su concentración.

5.3.2. Geles inducidos por acidez obtenidos en caliente

En la figura 5.2 se observa la estructura del gel formado a 90°C con la adición de GDL a esta temperatura, sin presencia de gelatina. La red está formada por las micelas de caseína que aparecen desnaturalizadas por el efecto de las altas temperaturas, y muestran un aspecto como de velo ahilado o de encaje.

Si se efectúa la comparación de la figura 5.2 con la figura 5.3 en la que la muestra se preparó con adición de gelatina, se observa que la estructura de la

misma está basada en una red de gelatina similar a la de los geles formados a 10°C (figura 5.1). Sin embargo, en la figura 5.3 se pueden apreciar que los huecos intersticiales son de mayor tamaño dentro de la red, posiblemente debidos a un mayor grado de desnaturalización de la caseína junto con una disminución de concentración de artefacto debido a la alta deformabilidad de las proteínas desnaturalizadas.

El diferente comportamiento mecánico de los geles sin y con gelatina adicionada corresponde perfectamente con la estructura microscópica observada. En el primer caso, en el que gel está formado por una red de micelas de caseína desnaturalizadas, se encontró que los geles eran muy débiles y presentaron un alto grado de sinéresis. Sin embargo, en el segundo caso el comportamiento fue similar al de los geles de gelatina obtenidos en frío, que estaban libres de sinéresis y presentaron mayor firmeza.

5.3.3. Geles obtenidos mediante fermentación láctica

En las figuras 5.4 y 5.5 se observan las estructuras de los yogures formados sin y con agregado de sólidos lácteos, respectivamente. La presencia de un 5% de sólidos lácteos adicionales refuerza la estructura de la red, como se puede ver en la figura 5.5, en la que se observa una mayor densidad de la red de proteínas. El comportamiento durante los ensayos de resistencia a la penetración, efectivamente, revela una mayor consistencia de los yogures preparados con la adición de sólidos lácteos.

En los yogures preparados con adición de gelatina se puede observar la presencia de una superficie lisa superpuesta que refuerza la red de proteína (figuras 5.6 y 5.7) y que responde con una mayor resistencia mecánica.

Al igual que en los yogures sin agregado de gelatina, la adición de sólidos lácteos supone un aumento espectacular de la densidad de la red, que se hace más compacta y, por lo tanto, más resistente a la penetración. Estos productos tienen la estructura básica de una red proteica y la presencia de gelatina aporta cierta consistencia a la red del yogur, ya que las cadenas de gelatina se unen con las proteínas lácticas y lo que se observa es una mayor “densidad de red” lo que equivale a una mayor densidad de artefacto y, por tanto, una mayor resistencia del gel. Esto confirma los resultados obtenidos en los ensayos mecánicos donde la resistencia del gel a la penetración era mayor cuanto mayor era la concentración de gelatina.

Si comparamos la figura 5.4 con la 5.2, se puede observar cómo en la primera la proteína láctea no está desnaturalizada, con su característico aspecto granular, por tanto, hay un aumento en la rigidez microscópica de las moléculas y

menor desplazamiento hacia las paredes intersticiales próximas para dar artefactos. Sin embargo, en la figura 5.2, al estar las proteínas lácticas desnaturalizadas, con su aspecto de velo ahilado, éstas se hicieron más flexibles y admitieron desplazamientos microscópicos más largos hasta las paredes finales donde se concentran los solutos para generar finalmente un artefacto menos denso.

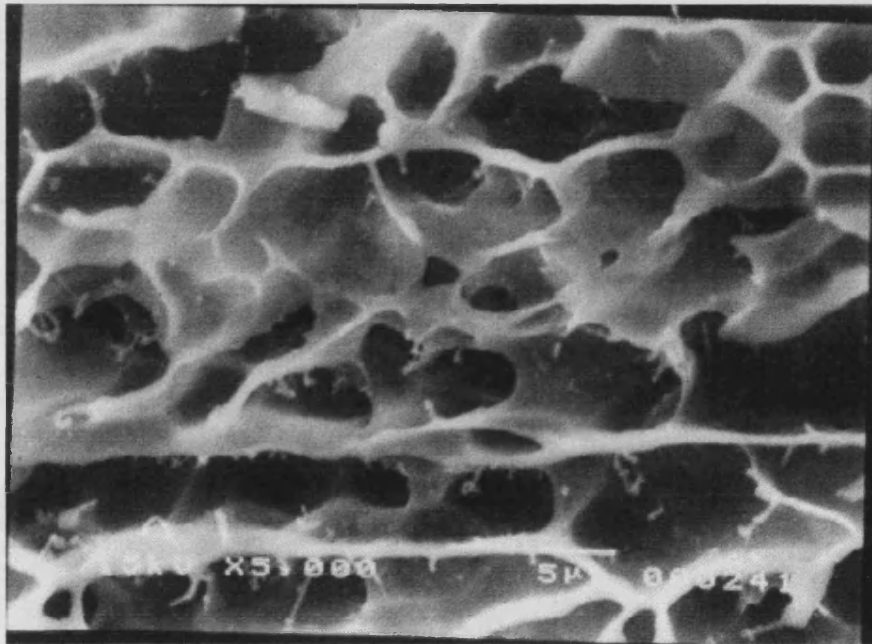


Figura 5.1. Estructura microscópica de un gel de gelatina (1.5%) en leche obtenido en frío a pH 5.3.

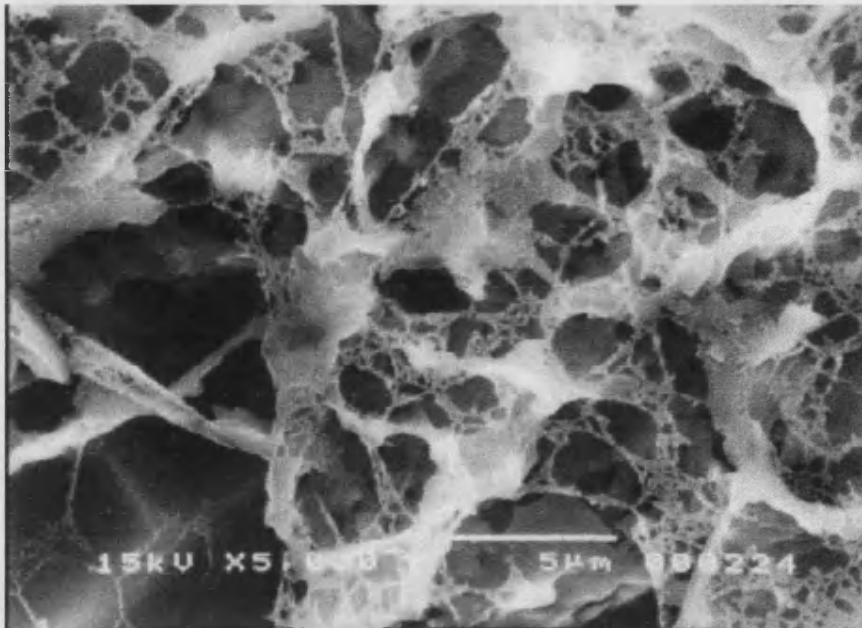


Figura 5.2. Estructura microscópica de un gel ácido de leche obtenido en caliente (90°C) a pH 5.3.



Figura 5.3. Estructura microscópica de un gel ácido de leche obtenido en caliente (90°C) a pH 5.3, con adición de gelatina (1.5%).

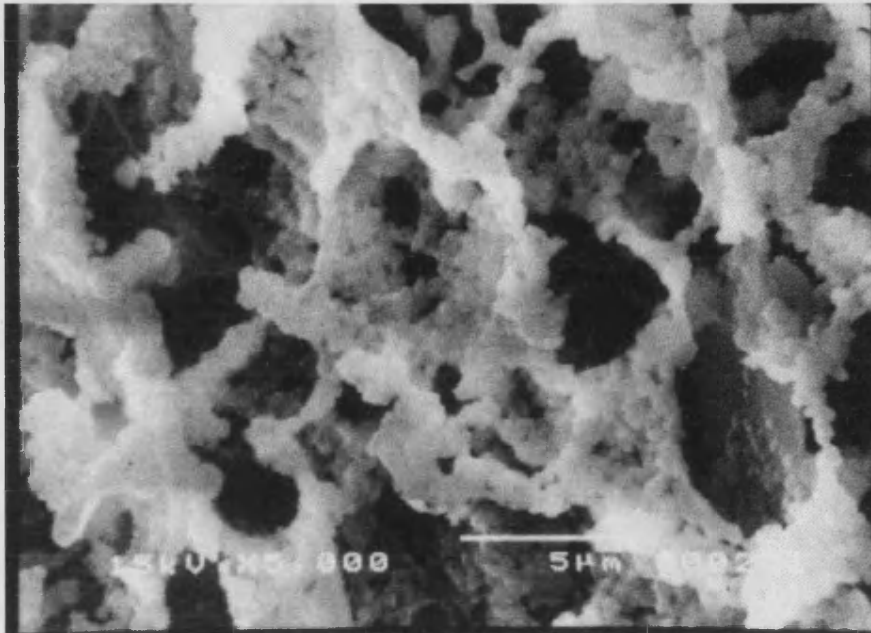


Figura 5.4. Estructura microscópica de un yogur.

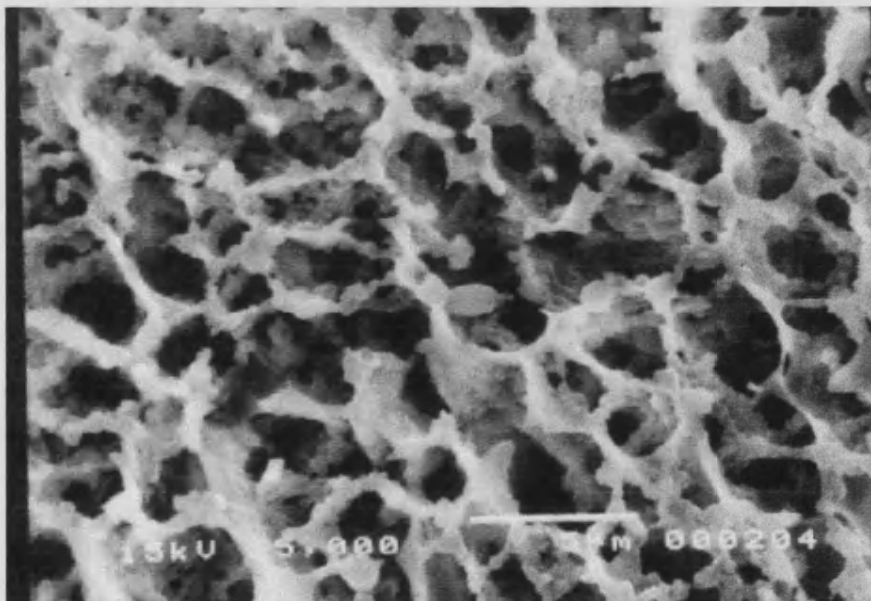


Figura 5.5. Estructura microscópica de un yogur con 5% sólidos lácteos adicionales.

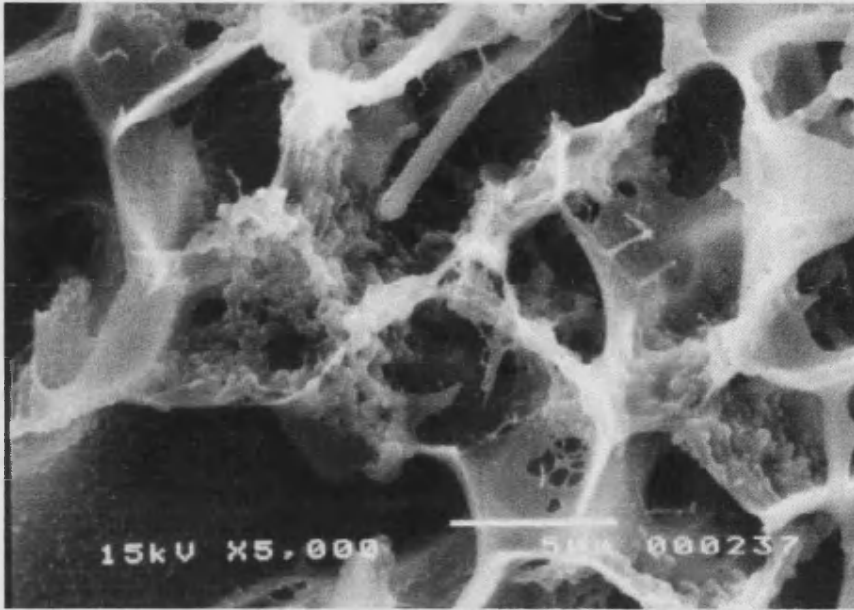


Figura 5.6. Estructura microscópica de un yogur con adición de 1.5% de gelatina.

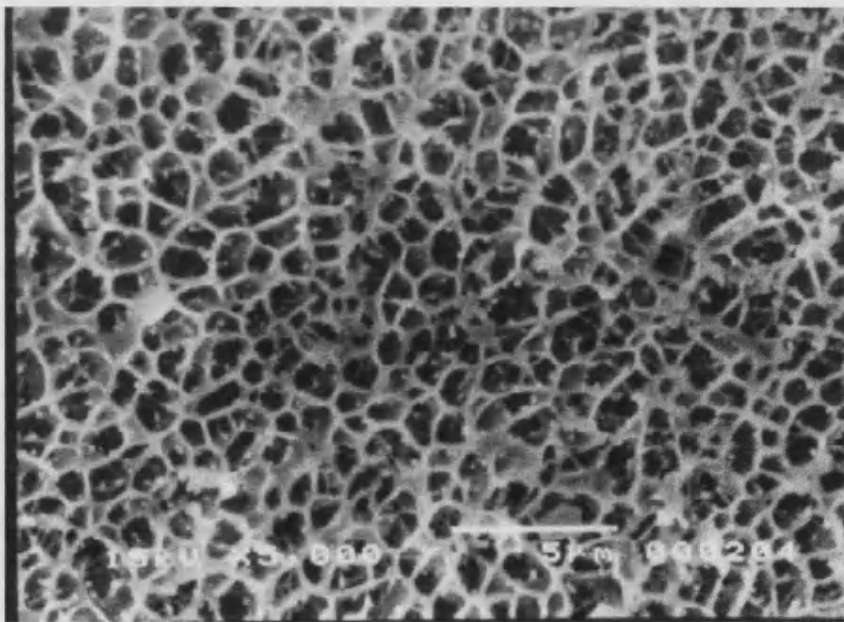


Figura 5.7. Estructura microscópica de un yogur con 5% sólidos lácteos y adición de 1.5% de gelatina.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- La gelatina en leche produce geles estables, homogéneos, algo menos rígidos que en agua y libres de sinéresis. Variando la concentración, se puede obtener una gama muy amplia de texturas.
- 2.- Mediante el uso de gelatina es posible obtener geles de pH neutro en leche con características texturales similares a los geles lácteos inducidos por ácido y con menor grado de sinéresis.
- 3.- La cinética de maduración de los geles de gelatina en leche puede definirse como un proceso en dos etapas. Una, de rápida formación de enlaces y otra, más lenta, de estabilización. Este mecanismo es independiente del tipo y concentración de gelatina, del pH y del medio de gelificación (agua o leche) dentro de los intervalos experimentales estudiados.
- 4.- La temperatura de fusión de los geles de gelatina en leche es similar a la de los geles en agua y no se ve afectada por el pH. Esta propiedad de fundir a la temperatura de la boca, conferiría a los productos finales una textura suave y muy similar a la de algunas grasas.
- 5.- La incorporación de gelatina a sistemas lácteos que gelifican por inducción con ácido (GDL) y calor, es compatible en un amplio intervalo de concentraciones y puede producir sistemas con texturas muy variadas, de aspecto homogéneo y libres de sinéresis.
- 6.- La evaluación de la textura de geles lácteos débiles (geles inducidos por calor y ácido y geles obtenidos por fermentación láctea), necesita una correcta interpretación de las curvas fuerza - deformación. Dependiendo de la textura final, el valor de firmeza o resistencia mecánica puede corresponder a puntos ubicados en zonas muy diferentes del texturograma.
- 7.- La presencia de gelatina hasta una concentración de 1.5%, acorta el tiempo de incubación de geles obtenidos por fermentación. En presencia de sólidos lácteos este efecto es mayor.
- 8.- La gelatina aumenta la firmeza de los geles obtenidos por fermentación, especialmente en presencia de sólidos lácteos. A bajas concentraciones (hasta 0.6%) los productos tienen texturas similares al yogur. Concentraciones mayores de gelatina dan lugar a productos cuyas características texturales son completamente diferentes de las del yogur y podrían ser la base de desarrollos de nuevos postres lácteos. La presencia de sólidos lácteos "suaviza" el perfil de rotura que presenta picos menos agudos.

9.- La presencia de gelatina en muestras obtenidas por fermentación que contienen sólidos lácteos añadidos, aumenta la temperatura de gelificación en unos 10°C. Este dato debe tenerse en cuenta para planificar las etapas de almacenamiento y transporte de los productos finales.

10. En general, el tipo de gelatina utilizada (A o B) no influye en las propiedades mecánicas de los sistemas analizados.

11.- Las observaciones por microscopía electrónica confirman que en los geles obtenidos a pH neutro y los inducidos por acidez y calor, es la gelatina la que forma la red básica. La fermentación produce, en cambio, geles basados en la red de proteínas lácteas en la que la gelatina forma una red que refuerza dicha estructura.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

4.

5.

6.

7.

8.

9.

- AMICE-QUEMENEUR, N., HALUX, J.P., HARDY, J. y KRAVTCHENKO, T.P. 1995. Influence of the acidification process on the colloidal stability of acidic milk drinks prepared from reconstituted nonfat dry milk. *J. Dairy Sci.* **78**, 2683-2690.
- A.O.A.C. 1980. Association of Official Analytical Chemist. 13 edición. Ed. N. Horwitz. Washington, U.S.A.
- BANON, S. y HARDY, J. 1991. Study of acid milk coagulation by an optical method using reflection. *J. Dairy Res.* **58**, 75-84.
- BANON, S. y HARDY, J. 1992. A colloidal approach of milk acidification by glucono- δ -lactone. *J. Dairy Sci.* **75**, 935-941.
- BARBOSA-CÁNOVAS, G.V., IBARZ, A. y PELEG, M. 1993. Propiedades reológicas de alimentos fluidos. Revisión. *Alimentaria* **241**, 39-89.
- BECKER, T. y PUHAN, Z. 1989. Effects of different processes to increase the milk solids non-fat content on the rheological properties of yoghurt. *Milchwissenschaft* **44**, 626-629.
- BOHLIN, L., HEGG, P. y LJUSBERG-WAHREN, H. 1984. Viscoelastic properties of coagulating milk. *J. Dairy Sci.* **67**, 729-734.
- BONGENAAR, J.J.T., KOSSEN, N.W.F., METZ, B. y MEIJBOOM, F.W. 1973. A method for characterizing the rheological properties of viscous fermentation broths. *Biotech. Bioeng.* **15**, 201-206.
- BOURNE, M.C. 1982. Texture, viscosity and foods. En *Food Texture and Viscosity*. Academic Press, Nueva York, pp. 1-23.
- BSI. 1975. Methods for sampling and testing gelatin. British Standards Institution.
- CASTLE, J., DICKINSON, E., MURRAY, A. y STAINSBY, G. 1988. Rheological and stability properties of concentrated emulsions made with a binary mixture of proteins. En *Gums and Stabilisers for the Food Industry 4*. Eds. G.O. Phillips, D.J. Wedlock y P.A. Williams. Elsevier Applied Science, Londres, pp. 473-483.
- CHEN, J. y DICKINSON, E. 1995. Surface shear viscosity and protein-surfactant interactions in mixed protein films adsorbed at the oil-water interface. *Food Hydrocolloids* **9**, 35-42.

- CHESWORTH, S.M., DICKINSON, E., SEARLE, A. y STAINSBY, G. 1985. Properties of oil-in-water emulsions containing gelatin and caseinate. *Lebensm -wiss u-Technologie* **18**, 230-232.
- CLARK, A.H. 1990. Structural and Mechanical Properties of Biopolymer Gels. En *Food Polymers, Gels and Colloids*. Ed. E. Dickinson. Royal Soc. Chem., Londres, pp. 322-338.
- COLLINS, J.L., EBAH, C.B., MOUNT, J.R., DEMOTT, B.J. y DRAUGHON, F.A. 1991. Production and evaluation of milk-sweet potato mixtures fermented with yoghurt bacteria. *J. Food Sci.* **56**, 685-688.
- DANNENBERG, F. y KESSLER, H.G. 1988. Effect of denaturation of β -lactoglobulin on texture properties of set-style non-fat yoghurt. 2. Firmness and flow properties. *Milchwissenschaft* **43**, 700-704.
- DAVIS, S.S. 1973. Rheological properties of semisolid foodstuffs: viscoelasticity and its role in quality control. *J. Texture Stud.* **4**, 15-40.
- DAVIES, F.L., SHANKAR, P.A., BROODER, B.E. y HOBBS, D.G. 1978. A heat induced change in the ultrastructure of milk and its effect on gel formation in yoghurt. *J. Dairy Res.* **45**, 53-61.
- DEJMEK, P. 1987. Dynamic rheology of rennet curd. *J. Dairy Sci.* **70**, 1325-1330.
- DICKINSON, E. 1993. Protein-Polysaccharide Interaction in Food Colloids. En *Food Colloids and Polymers*. Eds. E. Dickinson y P. Walstra. Royal Soc. Chemistry, Cambridge, pp. 77-93.
- DOUBLIER, J.L. y CUVELIER, G. 1996. Gums and Hydrocolloids: functional aspects. En *Carbohydrate in Foods*. Ed. Marcel Decker Inc. A-ch. Eliasson, Nueva York, pp. 283-318
- ELLIOT, J.H. y GANZ, A.J. 1977. Salad dressings - preliminary rheological characterization. *J. Texture Stud.* **8**, 359-371.
- FERNANDES, P.B. 1998. Interactions in whey protein/polysaccharide mixtures at pH 7. En *Polysaccharides Association Structures in Food*. Ed. R.H. Walter. Marcel Dekker, Inc., Nueva York, pp. 257-271.
- FERNANDES, P.B.; GONÇALVES, M.P. y DOUBLIER, J.L. 1992. Effect of galactomannan addition on the thermal behaviour of κ -carrageenan gels. *Carbohydrate Polymers* **19**, 261-262.

- FISZMAN, S.M. 1989. Propiedades funcionales de los hidrocoloides polisacáridicos. Mecanismos de gelificación. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* **29**, 415-429.
- FISZMAN, S.M. y DURÁN, L. 1989. Mechanical properties of κ -carrageenan and locust bean gum mixed gels with added sucrose. *Food Hydrocolloids* **3**, 209-216.
- FISZMAN, S.M. y DURÁN, L. 1992. Effects of fruit pulp and sucrose on the compression response of different polysaccharides gel systems. *Carbohydrate Polymers.* **17**, 11-17.
- FISZMAN, S.M., COSTELL, E. y DURÁN, L. 1986. Effects of the addition of sucrose and cellulose on the compression behaviour of κ -carrageenan gels. *Food Hydrocolloids* **1**, 113-120.
- FISZMAN, S.M., PONS, M. y DAMASIO, M.H. 1998. New parameters for instrumental texture profile analysis: Instantaneous and retarded recoverable springiness. *J. Texture Stud.* **29** (5), en prensa.
- GALAZKA, V.B. y DICKINSON, E. 1995. Surface properties of protein layers adsorbed from mixtures of gelatin with various caseins. *J. Texture Stud.* **26**, 401-409.
- GASTALDI, E.; LAGAUDE, A. y TARODO DE LA FUENTE, B. 1996. Micellar transition state in casein between pH 5.5 y 5.0. *J. Food Sci.* **61**, 59-64, 68.
- GME. (GELATIN MANUFACTURERS OF EUROPE). 1998. Monograph. Standardised Methods for Testing of Edible gelatin. European Chemical Industry Council. Bruselas, Bélgica.
- GODDARD, S.J. y AUGUSTIN, M.A. 1995. Formation of acid-heat-induced skim milk gels in the pH range 5.0-5.7: effect of the addition of salts and calcium chelating agents. *J. Dairy Res.* **62**, 491-500.
- GRIGOROV, H. 1996. Effect of heat treatment on cow's milk on the hydrophilic properties of the protein in Bulgarian yoghurt. XVII Intern. Dairy Congress, Section, p. 649.
- GRINDROD, J. y NICKERSON, T.A. 1968. Effect of various gums on skim milk and purified milk proteins. *J. Dairy Sci.* **51**, 834-841.

- HAGERMAN, C.G. 1990. Gelatine as a stabiliser in low-fat products. *Eur. Food and Drink Rev.*, otoño, 87-89.
- HARWALKAR, V.R. y KALAB, M. 1980. Milk gel structure. IX: Electron microscopy of glucono- Δ -lactone induced skim milk gels. *J. Texture Stud.* **11**, 35-49.
- HARWALKAR, V.R., KALAB, M. y EMMONS, D.B. 1977. Gels prepared by adding D-glucono- δ -lactone to milk at high temperature. *Milchwissenschaft* **32**, 400-402.
- HASHIZUME, K. y SATO, T. 1988. Gel forming characteristics of milk proteins. 1. Effect of heat treatment. *J. Dairy Sci.* **71**, 1439-1446.
- HORNE, D.S. y LEAVER, J. 1995. Milk proteins on surface. *Food Hydrocolloids.* **9**, 91-95.
- JANSSENS, L. y MUYLDERMANS, G. 1994. Gelatin - a modern food ingredient. *Food Technol. Int. Europe*, 133-137.
- JOHNSTON-BANKS, F.A. 1990. Gelatine. En *Food gels*. Ed. P. Harris. Elsevier Applied Science, Londres, pp. 233-289.
- KALAB, M. 1979. Microstructure of dairy foods. 1. Milk based on protein. *J. Dairy Sci.* **62**, 1352-1364.
- KALAB, M. y HARWALKAR, V.R. 1973. Milk gel structure. I. Application of scanning electron microscopy to milk and other food gels. *J. Dairy Sci.* **56**, 835-842.
- KALAB, M. y HARWALKAR, V.R. 1974. Milk gel structure. II. Relation between firmness and ultrastructure of heat-induced skim milk gels containing 40-60% total solids. *J. Dairy Res.* **41**, 131-135.
- KALAB, M., EMMONS, D.B. y SARGANT, A.G. 1975. Milk gel structure. IV. Microstructure of yoghurts in relation to the presence of thickening agents. *J. Dairy Res.* **42**, 453-461.
- KALAB, M., EMMONS, D.B. y SARGANT, A.G. 1976. Milk gel structure. V. Microstructure of yoghurt as related to heating of milk. *Milchwissenschaft* **31**, 402-408.

- KALAB, M., VOISEY, P.W. y EMMONS, D.B. 1971. Heat-induced milk gels. II. Preparation of gels and measurement of firmness. *J. Dairy Sci.* **54**, 178-181.
- KALAB, M., VOISEY, P.W., HARWALKAR, V.R. y LAROSE, J.A.G. 1973. Heat-induced milk gels. VI. Effect of temperature on firmness in comparison with some common food gels. *J. Dairy Sci.* **56**, 998-1003.
- KHEDKAR, J.N., DAVE, J.M. y SANNABADTI, S.S. 1996. Preparation of bifidobacter fermented milk with and without lactic bacteria. *J. Food Sci. and Technol. India.* **33**, 63-65.
- KIM, B.Y. y KINSELLA, J.E. 1989. Rheological changes during slow acid induced gelation of milk by D-glucono- δ -lactone. *J. Food Sci.* **54**, 894-898.
- KOZHEV, A., PENELSKI, I. y PANOVA, V. 1972, citado en Tamime y Deeth, 1980. *Food Science and Technology Abstract 1972*, **10** P1469.
- KRISHNAKUMAR, V. y GORDON, I. 1995. Gelatin. Global supply and demand. *Int. Food Ingrid.* **1** (1/2), 17-20.
- LEDWARD, D.A. 1986. Gelation of gelatin. En *Functional Properties of Food Macromolecules*. Eds. J.R.Mitchell y D.A. Ledward. Elsevier Appl. Sci. Londres, pp. 171-201.
- LEDWARD, D.A. 1992. Gelation. *Food Sci. and Technol. Today* **6** (4), 236-241.
- LEWIS, D.F. 1981. The use of microscopy to explain the behaviour of foodstuffs. *Scanning Electron Microscopy III*, 391-404.
- LEWIS, D.F. 1986. Features of food microscopy. *Food Microstructure* **5**, 1-18.
- LITTLE, L. 1967. Techniques for acidified dairy products. *J. Dairy Sci.* **50**, 434-441.
- LUCEY, J.A., GORRY, C., O'KENNEDY, B., KALAB, M., TANKINITA, R. y FOX, P.F. 1996. Effect of acidification and neutralization of milk on some physico-chemical properties of casein micelles. *Int. Dairy J.* **6** (3), 257-272.
- LYNCH, M.G. y MULVIHILL, D.M. 1994. The influence of caseins on the rheology of ι -carrageenan gels. *Food Hydrocolloids* **8**, 317-329.

- MA, L., DRAKE, M.A., BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. y SWANSON, B.G. 1996. Viscoelastic properties of reduced-fat and full-fat Cheddar cheeses. *J. Food Sci.* **61**, 821-823.
- MA, L., DRAKE, M.A., BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. y SWANSON, B.G. 1997. Rheology of full-fat and low-fat Cheddar cheeses as related to type of fat mimetic. *J. Food Sci.* **62**, 748-752.
- MACFADYEN, L. 1992. New uses of pectin in the dairy industry. *Int. Food Ingred.* (1/2), 11-14.
- MARTINOVOULASIKI, I.S. y ZERFIRIDIS, G.K. 1990. Effect of some stabilizers on textural and sensory characteristics of yoghurt ice cream from sheep's milk. *J. Food Sci.* **55**, 703-707.
- MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA. 1987. B.O.E. nº 158. Norma de Calidad para el yogur destinado al mercado interior.
- MUIR, D.D. 1998. Milk chemistry and nutritive value. En *The Technology of dairy products*. Ed. R. Early. Blackie Academic & Professional, Londres, pp. 353-367.
- NIJENHUIS, K. 1981. Investigation into the ageing process in gels of gelatin/water systems by the measurement of their dynamic moduli. Part I. *Colloid and Polymer Sci.* **259**, 522-535.
- NORMAND, V. 1995. Comportement rhéologique des gels de gélatine, relations propriétés-structures. M.S. Tesis, Univ. Henri Poincaré, Nancy, Francia.
- PARNELL-CLUINES, E.M., KAKUDA, Y. y DEMAN, J.M. 1986. Influence of heat treatment of milk on the flow properties of yoghurt. *J. Food Sci.* **51**, 1459-1462.
- PARNELL-CLUINES, E.M., KAKUDA, Y. y SMITH, A.K. 1987. Microstructure of yoghurt as affected by heat treatment of milk. *Milchwissenschaft* **42**, 314-317.
- PÉREZ-MUNUERA, I. 1995. Estudio de algunos cambios químicos y microestructurales producidos en el proceso de elaboración del turrón de Jijona. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- PONS, M. 1995. Los hidrocoloides en el comportamiento reológico y estabilidad de emulsiones alimenticias. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.

- PONS, M. y FISZMAN, S.M. 1996. Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems. Review paper. *J. Texture Stud.* **27**, 597-624.
- POPPE, J. 1997. Gelatin. En *Thickening and gelling agents for food*. 2ª edición. Ed. A. Imeson. Balckie Academic & Professional, Londres, pp. 144-168.
- PRENTICE, J.H. 1997. Yoghurt. En *Dairy Rheology*, VHC Publishers. pp. 123-135.
- RAMASWAMY, H.S. y BASAK, S. 1992. Time dependent stress decay rheology of stirred yoghurt. *Int. Dairy J.* **2**, 17-31.
- RAO, M.A. 1975. Measurement of flow properties of food suspensions with a mixer. *J. Texture Stud.* **6**, 533-539.
- RAO, M.A. 1992. Measurement of viscoelastic properties of fluid and semisolid foods. En *Viscoelastic properties of foods*. Eds. M.A. Rao y J.F. Steffe. Elsevier Applied Science.
- RAO, M.A. 1995. Rheological properties of fluid foods. En *Engineering of foods*. Eds. M.A. Rao y S.S.H. Rizvi. Marcel Decker, Inc. Nueva York, pp. 1-53.
- ROBINSON, R.K. y TAMIME, A.Y. 1975. Yoghurt. Review of the product and its manufacture. *J. Soc. Dairy Technol.* **28**, 149-163.
- ROBINSON, J.A., KELLAWAY, I.W. y MARRIOT, C. 1975. Effect of ageing on the rheological properties of gelatin gels. *J. Pharm. Pharmacol.* **27** (9), 653-658.
- ROEFS, S.P.F.M., VAN VLIET, T., BIJGAART, H.J.C.N. VAN DEN, GROOT-MOSTERT, A.E.A. DE y WALSTRA, P. 1990. Structure of casein gels made by combined acidification and rennet action. *Neth. Milk Dairy J.* **44** (3/4), 159-188.
- ROELS, J.A., VAN DER BERG, J. y VONCKEN, R.M. 1974. The rheology of micelial broths. *Biotech. Bioeng.* **16**, 181-208.
- ROHM, H. y KOVAC, A. 1994. Effect of starter cultures on linear viscoelastic and physical properties of set-style yoghurt. *J. Texture Stud.* **25**, 311-329.
- ROSENBERG, M. y LEE, S.L. 1993. Microstructure of whey protein/anhydrous milk fat emulsions. *Food Structure* **12**, 267-274.

- ROTHER, J. 1993. Gelatin in the dairy industry. *Dtsch. Milchwirtsch* **44** (21), 1050-1053.
- ROTHER, J. 1995. Gelatin in dairy and sweet products. *Food Technol. Europe* **2** (3), 60-66.
- SÁNCHEZ, M.T. 1996. Food Texture: Concept and Measurement. *Alimentaria* **272**, 29-34.
- SÁNCHEZ, C.; BEAUREGARD, J.L.; BRIDE, M.; BUCHHEIM, W. y HARDY, J. 1996. Rheological and microstructural characterization of double cream cheese. *Nahrung* **40**, 108-116.
- SCHMIDT, K.A. y SMITH, E. 1992. Milk reactivity of gum and milk protein solutions. *J. Dairy Sci.* **75**, 3290-3295.
- SCHRAMM, G. 1994. *A Practical Approach to Rheology and Rheometry*. ed. Gebrueder Haake, Karlsruhe, Alemania.
- SHOEMAKER, C.F., NANTZ, J., BONNANS, S. y NOBLE, A.C. 1992. Rheological characterization of dairy products. *Food Technology* **enero**, 98-104.
- SPREER, E. 1991. *Lactología Industrial*. Ed. Acribia, S.A, Zaragoza, España.
- STEFFE, J.F. 1992. *Rheological methods in food process engineering*. Freeman Press, Michigan.
- STEVENTON, A.J., MACKLEY, M.R. y FRYER, P.J. 1988. The rheology of protein gels and yoghurt. Eurotherm Nr. 5 Thermorheology of complex fluids, 3-5 Octubre, Compiègne, Francia.
- TAMIME, A.Y. y DEETH, H.C. 1980. Yoghurt: Technology and Biochemistry. *J. Food Prot.* **43**, 939-977.
- TAMIME, A.Y. y ROBINSON, R.K. 1991. *Yogur. Ciencia y Tecnología*. Ed. Acribia, S.A., Zaragoza.
- TANEYA, S.; IZUTSU, T.; KIMURA, T. y SHIOYA, T. 1992. Structure and rheology of string cheese. *Food Structure* **11**, 61-71.
- TEGGATZ, J.A. y MORRIS, H.A. 1990. Changes in the rheology and microstructure of ropy yoghurt during shearing. *Food Structure* **9** (2), 133-138.

- TOBITANI, A., YAKAMOTO, H., SHIOYA, T. y ROSS-MURPHY, S.B. 1995. Rheological and structural studies on heat-induced gelation of concentrated skim milk. *J. Dairy Res.* **62** (2), 257-267.
- WALSTRA, P., VAN DIJK, H.J.M. y GEURTS, T.J. 1985. The syneresis of curd. 1. General considerations and literature review. *Neth. Milk Dairy J.* **39**, 209-246.
- XU, S.Y., SHOEMAKER, C.F. y LUH, B.S. 1986. Effect of break temperature on rheological properties and microstructure of tomato juices and pastes. *J. Food Sci.* **51**, 399-402.
- XU, S.Y., STANLEY, D.W., GOFF, H.D., DAVISON, V.J. y LE MAGUER, M. 1992. Hydrocolloid/milk gel formation and properties. *J. Food Sci.* **57**, 96-102.
- YADAV, V.B., JHA, Y.K., GARG, S.K. y MITAL, B.K. 1994. Effect of soymilk supplementation and additives on sensory characteristics and biochemical changes of yoghurt during storage. *Aust. J. Dairy Technol.* **49** (1), 33-38.
- ZOON, P., ROEFS, S.P.F.M., DECINDIO, B. y VAN VLIET, T. 1990. Rheological properties of skim milk gels at various temperatures: interrelation between the dynamic moduli and the relaxation modulus. *Rheological Acta.* **29**, 212-230.

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de
D. ANA SALVADOR ALCARAZ

la calificación de SOBRESALIENTE CUM LAUDE

Valencia, a 29 de ENERO de 1999

El Secretario,

El Presidente



Fdo: Luis Durán

Fdo: Montserrat Pons

Nº 527 del Registro de Facultades

