

# XXXII Encuentro Nacional y 1<sup>er</sup> Congreso Internacional AMIDIQ

3 al 6 de Mayo de 2011, Riviera Maya, Quintana Roo

---

## ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO Y LA PRESENCIA DE HIDROCOLOIDES, EN LA MICRO ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE TEXTURA EN GELES DE PROTEÍNAS LÁCTEAS A BASE DE RENINA

## STUDY OF THE CONCENTRATION OF CALCIUM AND THE PRESENCE OF HYDROCOLLOIDS IN THE MICRO STRUCTURE AND TEXTURE PROPERTIES OF MILK PROTEIN GELS BASED RENIN

D. A. Caro-Calderon<sup>1\*</sup>, R. Pedroza Islas<sup>2</sup>, M. A. Aguilar-Méndez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del IPN. Legaria 694, Col. Irrigación. C.P. 11500, México D. F., México, e-mail: [thatsright\\_dude@hotmail.com](mailto:thatsright_dude@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidad Iberoamericana, Ciudad de México, Prolongación Paseo de la Reforma 880, Lomas de Santa Fe, México C.P. 01219, D.F.

### Resumen

El cuajado o coagulación, es un proceso en el que ocurre una separación del agua y constituyentes solubles de la leche, como lo son: la lactosa, sales minerales, así como las proteínas no floculadas, a través de la deshidratación parcial del gel de caseína formado por sinéresis o dicho de otra forma, por la contracción de las proteínas que lo forman. En esta floculación, las micelas de caseína forman un gel compacto, aprisionando el líquido de dispersión que constituye el suero. Para que este mecanismo pueda llevarse a cabo, es necesaria la acidificación láctica, o bien, la adición de renina.

El proceso en la elaboración de geles a base de renina puede ser modificado de tal manera que cumpla los requerimientos del consumidor, mediante la formación de geles que modificados por la incorporación de estabilizantes puedan mantener su textura y micro estructura similar a un gel control mediante el uso de hidrocoloides, reduciendo las pérdidas de compuestos solubles.

La combinación de los hidrocoloides carragenina, pectina de alto metoxilo y grenetina son estudiados con la finalidad de generar una red mas compleja durante el proceso de elaboración de geles de proteínas lácteas a base de renina, sin modificar sustancialmente su textura ni micro estructura. Un diseño de experimentos del tipo Placket & Burman se llevo a cabo para conocer la interacción entre ingredientes y filtrar las variables que no arrojaran una respuesta satisfactoria. En este se encontró que la carragenina en combinación con el calcio incremento la fuerza del gel. Posteriormente se incremento la concentración de grasa y proteína para conocer su efecto en micro estructura.

### Abstract

The setting or coagulation is a process in which separation of water and water soluble constituents of milk, such as: lactose, minerals and proteins not flocculated occurs; through partial dehydration of casein gel formed by syneresis or put another way, by the contraction of the proteins that form it. In this flocculation of casein micelles forming a compact gel, the dispersion fluid is serum. This mechanism can take place necessary by lactic acidification or by the addition of rennin.

The process in developing rennin-based gels can be modified in such a way that meets customer requirements, through the formation of gels modified by the addition of stabilizers to maintain their texture and microstructure similar to a control gel by use of hydrocolloids, reducing losses of soluble compounds. The combination of hydrocolloids carrageenan, high methoxyl pectin and gelatin are studied in order to generate a more complex network during the preparation of milk protein gels based on rennin, without fundamentally changing its texture or microstructure. An experimental design Placket & Burman type was carried out to understand the interaction between ingredients and filter variables that didn't give a satisfactory answer. In this, it was found that carrageenan in combination with calcium increased the gel strength and elasticity.

# XXXII Encuentro Nacional y 1<sup>er</sup> Congreso Internacional AMIDIQ

3 al 6 de Mayo de 2011, Riviera Maya, Quintana Roo

---

Subsequently, by increasing the concentration of fat and protein, the effect on the microstructure was determined.

## INTRODUCCIÓN

Las caseínas, poli péptidos de floculación sencilla. Son proteínas insolubles de la leche que se organizan en forma de micelas y se mantienen como asociaciones coloidales estabilizadas por  $\kappa$ -caseína en la superficie. Esta caseína, designada con la letra griega kappa, adquiere también el nombre de “caseino-macropéptido”, y brinda estabilidad micelar a través de sus cadenas flexibles hidrofílicas adjuntas a la superficie. Recubren una tercera parte de la superficie total, y tiene una estructura similar a un cepillo que recubre la superficie de una esfera, mejor conocido como “cepillo poli electrolítico”, por el hecho de brindar la estabilidad a través de repulsión electrostática y estérica, ya que dicho cepillo presenta una fuerte carga negativa que confiere repelencia intermicelar al pH de la leche (6.6-6.7) (*Corredig 2009; Langendorff y col., 1999; Spagnuolo y col., 2005*).

Sin embargo, esta repulsión electrostática puede ser disminuida al reducir la estabilidad coloidal, fomentando la floculación de la micelas inmersas en el líquido de dispersión que a demás puede contener proteínas solubles globulares, mejor conocidas como proteínas de suero (Xian-Qing & Spradlin, 2001). Algunas de estas últimas mencionadas son expulsadas posteriormente a la coagulación junto con algunos o todos los componentes solubles, en dependencia de las condiciones termodinámicas presentes. Sin embargo, para que este mecanismo pueda llevarse a cabo es necesaria la adición de renina, una acidificación láctica, o bien, un incremento en la temperatura (*Eck, 1990; Corredig, 2009*).

Cuando se induce la floculación por la adición de renina (quimosina), el enlace que se hidroliza es el Phe105-Met106 en la  $\kappa$ -caseína. Como resultado de esta hidrólisis, se desprende el caseino-macropéptido soluble a partir del residuo terminal-C. El otro residuo N-terminal de la  $\kappa$ -caseína, ahora conocido como para- $\kappa$ -caseína, se mantiene adjunto a la micela. Cuando una proporción por encima del 85% de  $\kappa$ -caseína ha sido hidrolizada, la  $\kappa$ -caseína residual es incapaz de estabilizar las micelas, predominan las interacciones hidrofóbicas y comienza la floculación (*Corredig, 2009; Xiao-Qing & Spradlin 2001; Bönisch y col., 2008; Solorza & Bell, 1998; Eck, 1990*).

Por otra parte, existen interacciones proteína-polisacárido que pueden subdividirse en dos grupos: formación de complejos e incompatibilidad termodinámica. Dado que las interacciones ocurren en solución, ambos grupos están influenciadas por el pH, la fuerza iónica, la densidad de carga y la concentración de biopolímeros presentes en el sistema (*Ye, 2008; de Kruif & Tuinier, 2001*).

Los polisacáridos cargados negativamente tienen la capacidad de formar complejos con las proteínas cargadas positivamente (*Sperber y col., 2009; Ye, 2008*). Sin embargo, también es posible ensamblar complejos utilizando algunos hidrocoloides por encima del punto isoeléctrico de las proteínas y regulando la fuerza iónica (*Stainsby, 1980; Rocha y col., 2009; Olsen, 1989*).

Existen complejos coacervados sin relevancia para inducir la floculación o formar geles lácteos, ya que inhiben la agregación y precipitación de proteínas. Este fenómeno es atribuido a la adsorción del polisacárido ( $\lambda$ -carragenina y pectina, entre otros) en toda la superficie de las proteínas, protegiéndolas de la interacción entre sí e incrementando su tamaño (*Ye, 2008*).

Un ejemplo de estos complejos coacervados puede apreciarse utilizando pectina. La pectina, que es un polisacárido encontrado en la pared celular primaria de las plantas, principalmente en el albedo y lamela de las frutas cítricas (Información adicional, 2010), tiene grupos éster capaces de formar entrecruzamiento con moléculas pequeñas, pero sin éxito de crear geles con proteínas (*Stainsby, 1980*).

# XXXII Encuentro Nacional y 1<sup>er</sup> Congreso Internacional AMIDIQ

3 al 6 de Mayo de 2011, Riviera Maya, Quintana Roo

---

Tanto la pectina de bajo metoxilo, como la de alto metoxilo son capaces de formar complejos solubles con la  $\beta$ -Lactoglobulina por encima del punto isoeléctrico de la proteína en presencia de iones divalentes como el calcio, que crea puentes iónicos entre ambos biopolímeros cargados negativamente, fomentando la adsorción del polisacárido, que tiene como consecuencia el incremento en el diámetro del complejo, así como el incremento en la turbidez del sistema (*Sperber y col., 2009; Ye, 2008*).

Con respecto a las caseínas, la pectina no presenta ningún tipo de interacción a menos que el pH disminuya hasta 5.3 o menos, en donde el tamaño de las micelas incrementa debido a la adsorción y puenteo por floculación de pectina en la superficie (complejo de naturaleza electrostática), estabilizando a las partículas estéricamente en bebidas lácteas acidificadas (*Marozziene & de Kruij, 2000; Ye, 2008*).

Es probable, entonces, que al usar pectina en geles lácteos inducidos por renina, donde el pH este por encima de 5.3 y con un ligero incremento en la fuerza iónica, se formen complejos solubles entre las proteínas del suero y la pectina, generando un incremento poco significativo en el tamaño de las proteínas como para ser retenidas en la red formada de para- $\kappa$ - caseína y afectando negativamente la floculación de proteínas séricas.

Por otra parte. Las interacciones mas estudiadas entre proteínas lácteas y polisacáridos se enfocan en; Carrageninas (Olsen, 1989). Estos polisacáridos anionicos sulfatados de alto peso molecular, son extraídos del alga roja y su interacción con proteínas es de origen electrostático (Información adicional, 2010; *Langendorff y col., 1999; Weinbreck y col., 2004; Badui, 1999*).

En las proteínas del tipo lácteo, la interacción es sinérgica; Y se lleva a cabo en la superficie de las micelas de caseína ( $\kappa$ -caseína) (*Payens, 1971; Spagnuolo y col., 2005; Snoeren y col., 1975*). El hidrocoloide funciona como estabilizante en productos como emulsiones de grasa de leche, el suero en helados, leches chocolatadas, budines y flanes, entre otros; Ya que tiene la capacidad para incrementar la viscosidad, mejorar la gelación y disminuir la sinéresis al utilizar concentraciones muy bajas del polisacárido (información adicional, 2010; *Badui, 1999; Langendorff y col., 1999*).

Esta estabilidad hacia las proteínas se debe a que tiene grupos sulfatados cargados negativamente, capaces de orientarse hacia el exterior de la molécula antes de interactuar con los grupos cargados positivamente de las proteína, ya sea de manera directa o a través de iones como calcio o potasio (*Badui, 1999*). A pH de 6.7, tanto la  $\kappa$ -caseína como la carragenina, que están cargadas negativamente, reaccionan entre si para formar un complejo electrostático estabilizado después de la pasteurización y durante el enfriamiento del sistema (*Olsen, 1989; Snoeren y col. 1975*).

Durante la pasteurización, cuando la temperatura esta por encima de la transición espiral-hélice ( $> 47^\circ\text{C}$ ), existe incompatibilidad termodinámica entre las micelas de caseína y la carragenina iota o kappa. La incompatibilidad existente entre el polisacárido no adsorbente en su conformación espiral y las micelas de caseína, ocasiona la floculación microscópica de las micelas de caseína, mientras el polisacárido se mantiene rodeando los micro floculos al estar por encima de cierta concentración critica y en dependencia de la concentración de caseína (*Stainsby, 1980; Spagnuolo y col., 2005; Langendorff y col. 1999*).

Al enfriar el sistema, la temperatura disminuye por debajo de la transición espiral-hélice, ocasionando que las espirales de carragenina se enreden y ensamblen entre sí a través de puentes iónicos, que sirven como parches de unión entre sus grupos sulfato. Esta nueva conformación de hélice brinda rigidez y mayor densidad de carga al polisacárido, ahora listo para interactuar fácilmente con las  $\kappa$ -caseínas (información adicional, 2010; *Langendorff y col., 1999; Payens, 1971*).

# XXXII Encuentro Nacional y 1<sup>er</sup> Congreso Internacional AMIDIQ

3 al 6 de Mayo de 2011, Riviera Maya, Quintana Roo

A pesar de que la carga neta en la  $\kappa$ -caseína es negativa, al estar por encima del punto isoelectrico, sus residuos de aminoácidos catiónicos y aniónicos están lo suficientemente separados entre sí, tal que, la molécula es capaz de orientar sus sitios catiónicos hacia los grupos sulfatados aniónicos de la carragenina, formando interacciones con punto de fusión por arriba de 70°C (Langendorff y col., 1999; Spagnuolo y col., 2005; Snoeren, 1975; Stainsby, 1980).

Cuando la concentración de carragenina se eleva, la adsorción de ésta sobre la  $\kappa$ - caseína deja a la mayoría del polisacárido libre en solución, en forma de bucle. El conjunto de bucles vecinos se asocia en los espacios entre micelas para formar una red similar al gel de carragenina puro, esta vez, con menor punto de fusión (Stainsby, 1980; Spagnuolo y col. 2005).

Al igual que las pectinas, las carrageninas también pueden crear complejos solubles con las proteínas séricas por encima del punto isoelectrico de estas. Este fenómeno entre ambos compuestos con carga negativa, es atribuido a las fluctuaciones de carga cercanas al punto isoelectrico de la proteína y a la presencia de parches cargados positivamente que sirven como intermediarios en la interacción con la superficie de las proteínas, incrementando la turbidez del sistema en dependencia de la concentración de iones presentes, como el calcio (Weinbreck y col. 2004).

Ya que la carragenina tiene la capacidad para interactuar tanto con las proteínas caseínas, como con las séricas, es posible que una dosis pequeña del hidrocólido pueda afectar la floculación positivamente, incrementando o generando una red más compleja durante el proceso de coagulación.

## METODOLOGÍA

### Materiales

Para la experimentación se utilizó; Pectina (Danisco Mexicana), Grenetina comercial (Danisco Mexicana), Carragenina (Danisco Mexicana), Cloruro de Calcio comercial (Danisco Mexicana), Renina (Danisco Mexicana) y Leche descremada en polvo LH (Dilac), La leche fluida fue obtenida de un establo local y se estandarizó para el diseño de experimentos a 3.3% de grasa, 3.3% de proteína y 10.5% de sólidos y posteriormente se evaluó en comparación con otros estandarizados a 6.5% de grasa, 4.5% de proteína y 20% de sólidos.

### Método

Se prepararon lotes de 5 kg para el diseño de experimentos, y la preparación del gel se realizó bajo el proceso de elaboración típico a base de renina. Los hidrocólidos fueron añadidos junto con la leche descremada en polvo antes de la pasteurización (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros del diseño Placket & Burman

<b>Carragenina</b> 0%-0.025%	<b>Pectina</b> 0%-0.08%	<b>Grenetina</b> 0%-0.3%	<b>Calcio</b> 0.05%-0.2%
---------------------------------	----------------------------	-----------------------------	-----------------------------

Tabla 2. Parámetros de evaluación posterior

<b>Carragenina</b> 0% - 0.05%	<b>Calcio</b> 0.10% - 0.3%
----------------------------------	-------------------------------

# XXXII Encuentro Nacional y 1<sup>er</sup> Congreso Internacional AMIDIQ

3 al 6 de Mayo de 2011, Riviera Maya, Quintana Roo

## Textura

Esta medición se realizó con un TA-XT2i Texture Analyzer (Stable Micro Systems, UK). Se midió el gradiente de fuerza con un émbolo cilíndrico de acero inoxidable de 5mm de diámetro (P/5), la pegajosidad del gel con un embolo esférico de acero inoxidable de 1 pulgada (P/1S). Las muestras fueron tomadas de 3X3X3 cm, se hicieron por triplicado.

## Análisis Estadístico

Las respuestas para ambos diseños fueron analizadas estadísticamente con Design-Expert 5 (Statistical Software). El análisis de varianza fue utilizado para determinar las diferencias significativas a lo largo de los tratamientos promedio a  $P \leq 0.05$ .

## Micro estructura

Se cortaron rebanadas muy finas de aproximadamente 0.5 mm de diámetro, se mantuvieron en un desecador durante un periodo de 15 días. Después las muestras del gel secas fueron montadas en piezas de carbón del SEM y recubiertas con una capa delgada de oro en un Fine Coat Ion Sputter JFC 1100 (Jeol Ltd., Akishima, Japan). Un Microscopio Electrónico de Barrido con alto vacío JEOL JMS-35 (Jeol Ltd., Akishima, Japan), fue usado para ver un mínimo de dos muestras relevantes del gel.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Diseño Placket & Burman

Para la primer fase de la experimentación, se observó un incremento en la pegajosidad al incrementar las concentraciones de gnetina, pectina y calcio, y disminuyó al incrementar la carragenina, así como el producto entre gnetina y calcio (ecuación 1). La mínima pegajosidad se encontró al incrementar la concentración de carragenina y disminuir el calcio al mínimo (Fig. 1a), mientras que la máxima pegajosidad se encontró al incrementar la concentración de gnetina y pectina (Fig. 1b).

$$\text{Pegajosidad} = +1.81 - 11.26 * \text{Carragenina} + 10.87 * \text{Pectina HM} + 11.83 * \text{Gnetina} + 11.71 * \text{CaCl}_2 - 57.23 * \text{Gnetina} * \text{CaCl}_2 \quad (\text{Ecuación 1})$$

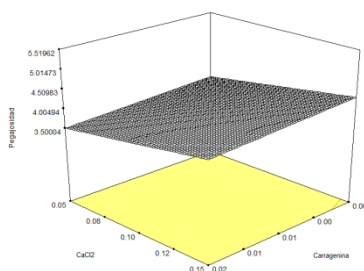


Fig. 1a Pegajosidad  
(CaCl<sub>2</sub> vs Carragenina)

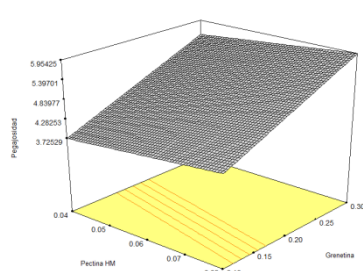
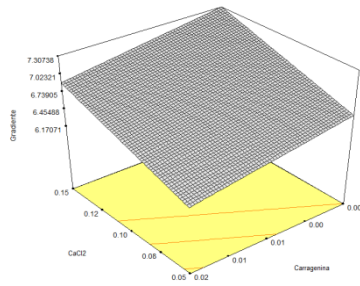


Fig. 1b Pegajosidad  
(Pectina vs Gnetina)

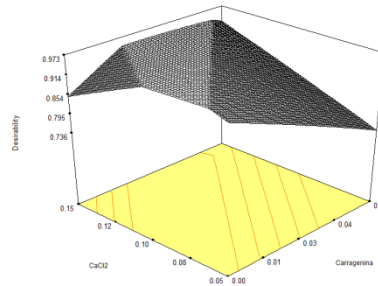
Para el caso del gradiente de fuerza del gel, éste aumento considerablemente al incrementar la concentración de calcio (ecuación 2) y disminuir al mínimo los demás parámetros (Fig. 2). La optimización del diseño se hace de tal forma que se obtengan valores tanto de pegajosidad, como de fuerza de gradiente afines a una muestra control. Finalmente se obtuvieron valores óptimos a una concentración de carragenina de 0.04% y 0.14% de CaCl<sub>2</sub> dentro del rango de la Fig. 3.

# XXXII Encuentro Nacional y 1<sup>er</sup> Congreso Internacional AMIDIQ

3 al 6 de Mayo de 2011, Riviera Maya, Quintana Roo

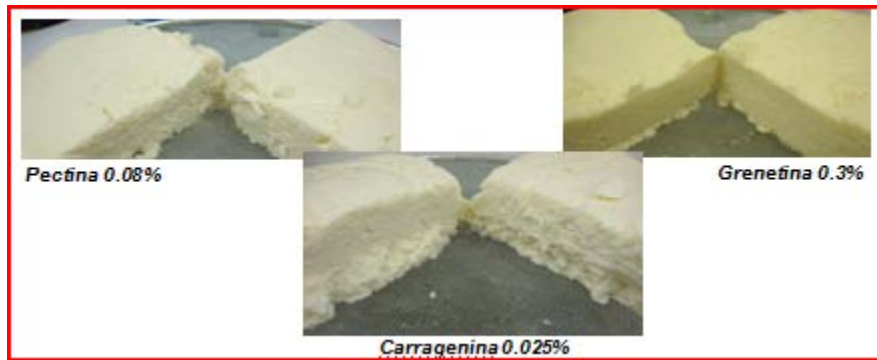


**Fig. 2 Gradiente  
(CaCl<sub>2</sub> vs Carragenina)**



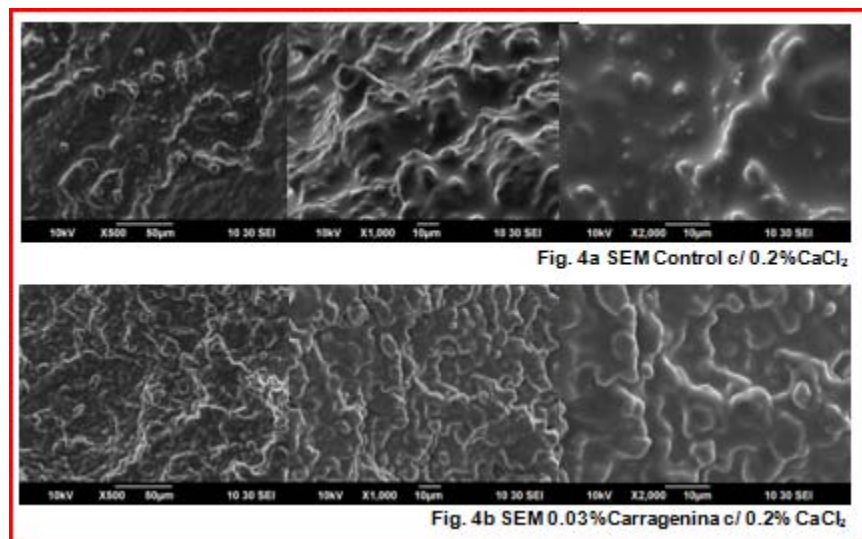
**Fig. 3 Optimización del modelo  
(CaCl<sub>2</sub> vs Carragenina)**

$$\text{Gradiente} = +5.96 + 26.75 * \text{Carragenina} - 21.56 * \text{Pectina HM} + 7.17 * \text{CaCl}_2 - 143.75 * \text{Carragenina} * \text{Pectina HM} \quad (\text{Ecuación 2})$$



Micro estructura

Las muestras con carragenina presentaron una superficie mayormente rugosa que el control (fig. 4a y 4b).



# XXXII Encuentro Nacional y 1<sup>er</sup> Congreso Internacional AMIDIQ

3 al 6 de Mayo de 2011, Riviera Maya, Quintana Roo

---

## CONCLUSIÓN Y DISCUSIÓN

La pectina de alto metoxilo no es capaz de formar estructuras tipo gel a pH neutro por lo que su interacción no mostró relevancia. Sin embargo la gretina que si tiene la habilidad de formar geles a pH neutro parece haber retenido una mayor cantidad de humedad, afectando directamente la pegajosidad del gel. Finalmente, la carragenina por debajo de su estado de transición y en condiciones óptimas de calcio puede formar complejos con las proteínas insolubles incrementando la fuerza de gel, y mostrando atenuación al aumentar la concentración de calcio, sin afectar considerablemente la pegajosidad.

La micro estructura fue modificada en su rugosidad, posiblemente debido a la mayor interacción entre componentes, sin embargo, esto no fue notable desde el punto de vista macroscópico.

## REFERENCIAS

1. Badui S. Química de los alimentos. (1999) Ed. Pearson, 114-116, 160-161, 193-194.
2. Bullens C.W. Process and Ingredient Effects on the Structure of Reduced-Fat Cheddar Cheese. FMC Corporation, Food Ingredients Division USA. (1994) 215-218.
3. de Kruif C.G. and Tuinier R. Polysaccharide protein interactions. Food Hydrocolloids 15 (2001) 555-563.
4. Eck Andre. El queso. Editorial Omega, Barcelona (1990).
5. Friedman H.H. et al. The texturometer- A new instrument for objective texture measurement. (1962) 390-396.
6. Langendorff V. et al. Casein micelle/iota carrageenan interactions in milk: influence of temperature. Food Hydrocolloids 13 (1999) 211-218.
7. Lobato-Calleros C. et al. Microstructure and Texture of manchego cheese-like products made with canola oil, lipophilic and hydrophilic emulsifiers. Journal of Texture Studies 33 (2002) 165-182.
8. Lobato-Caballeros C. and Vernon E.J. Microstructure and texture of cheese analogs containing different types of fat. Journal of texture studies 29 (1998) 569-586.
9. Maroziane A. and De Kruif C.G. Interaction of pectin and casein micelles. Food Hydrocolloid. (2000) 14, 391-394.
10. Olsen R.L. Effects of Polysaccharides on Rennet Coagulation of Skim Milk Proteins. (1989) J. Dairy Sci. 72, 1695-1700.
11. Payens T.A.J. Light Scattering of Protein Reactivity of Polysaccharides Especially of Carrageenans. (1971) Research Papers 141-149.
12. Snoeren Th. H.M. et al. Electrostatic interaction between  $\kappa$ -carrageenan and  $\kappa$ -casein. Milchwissenschaft 30 (7) (1975), 393-396.
13. Solorza F.J. and Bell A.E. The effect of calcium addition on the rheological properties of a soft cheese at various stages of manufacture. International Journal of Dairy Technology, Vol 51, No. 1, (1998) 23-29.
14. Spagnuolo P.A. et al. Kappa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers. Food Hydrocolloids 19 (2005) 371-377.
15. Sperber Bram L.H.M et al. Influence of the overall charge and local charge density of pectin on the complex formation between pectin and  $\beta$ -lactoglobulin, Food hydrocolloids 23 (2009) 765-772.
16. Stainsby G. Proteinaceous gelling systems and their complexes with polysaccharids, Food Chemistry 6 (1980) 3-14.
17. Weinbreck F. et al. Complexation of whey proteins with carrageenan. J. Agric. Food Chem. (2004), 52, 3550-3555.
18. Ye A. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. International Journal of Food Science and Technology 43 (2008) 406-415.

[Índice](#)