



**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE CIENCIAS
CAMPUS DE LUGO**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA
ÁREA DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

**APROVECHAMIENTO DE SUERO DE QUESERÍA DE
ORIGEN CAPRINO MEDIANTE LA OBTENCIÓN DE
CONCENTRADOS DE PROTEÍNAS SÉRICAS Y
SUBPRODUCTOS DE CLARIFICACIÓN.
ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES TECNOLÓGICAS.**

**Beatriz Sanmartín Estrada
TESIS DOCTORAL
Lugo, 2010**



**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE CIENCIAS
CAMPUS DE LUGO**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA
ÁREA DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

D. **Ángel Cobos García** y Dña. **Olga Díaz Rubio**, Profesores Titulares del Área de Tecnología de los Alimentos del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la **Universidad de Santiago de Compostela**.

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada "**APROVECHAMIENTO DE SUERO DE QUESERÍA DE ORIGEN CAPRINO MEDIANTE LA OBTENCIÓN DE CONCENTRADOS DE PROTEÍNAS SÉRICAS Y SUBPRODUCTOS DE CLARIFICACIÓN. ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES TECNOLÓGICAS**", presentada por Dña. **Beatriz Sanmartín Estrada**, ha sido realizada bajo su dirección conjunta en la Facultad de Ciencias de Lugo y cumple todos los requisitos exigidos por la normativa vigente. Por consiguiente, **autorizamos** su presentación ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firman la presente en Lugo, a 29 de noviembre de 2010.

Fdo.: **Ángel Cobos García**

Fdo.: **Olga Díaz Rubio**

La doctoranda, **Beatriz Sanmartín Estrada**

**Para mis padres,
que siempre están a mi lado**

Agradecimientos...

A veces es difícil, ver la luz al final del túnel y por ello sé, que se necesita voluntad y entusiasmo, pero sobretodo, que sin ayuda, no habría podido recorrer todo el camino y llegar al fin. Ahora más que nunca me gustaría expresar mi más sincero cariño y agradecimiento:

A mis tutores **Dra. Olga Díaz Rubio** y **Dr. Ángel Cobos García**, por darme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto y por su colaboración continua y desinteresada

A mi compañera en esta aventura, pero sobretodo amiga, **Laura**. Gracias no sólo por haber estado ahí en todo momento, sino por comprenderme y darme siempre una palabra de ánimo en los peores momentos.

A **Ángeles** y **Javi**, por su amistad, por su apoyo y por todos los buenos momentos que hemos compartido.

A todos los compañeros, y muchos de ellos amigos, de la tercera planta de la Facultad de Ciencias, pero en especial, a **Jose**, **Manu** y **Vanesa**.

A **Sofía**, que aunque ha aparecido en el último momento, con su amistad me ha ayudado a acabar esta tesis

A mis tutores durante mi estancia de investigación en la Technische Universität Dresden, **Harald Rohm** y **Doris Jaros**, y a mis compañeros, **Mandy**, **Madlen**, **Cora**, **Christopher**, **Thidarat**, **Stephan**, **Gunther** y **Thanet**, que me apoyaron e integraron en su grupo desde el principio

A la **Xunta de Galicia**, por formar parte de su programa "*María Barbeito*" para la formación de doctores en organismos públicos de investigación de la comunidad autónoma de Galicia.

Y por último, aunque para mi eres el primero, me gustaría expresar toda mi gratitud a **Jose**. Gracias por tu cariño, apoyo, comprensión y por estar siempre a mi lado.

GRACIÑAS

**“Ich habe nicht nachgedacht,
Ich habe experimentiert”**

Wilhelm Röntgen
(1845-1923)

**VALORIZATION OF CAPRINE CHEESE WHEY BY MEANS OF
PRODUCTION OF WHEY PROTEIN CONCENTRATES AND
CLARIFICATION BY-PRODUCTS.
STUDY OF THEIR TECHNOLOGICAL PROPERTIES.**

One of the most important by-products of the dairy industry is whey. Cheese-making and casein manufacture produces high amounts of whey, which can generate important environmental problems. In spite of this, bovine whey is an excellent source of protein of high nutritional quality and high functional value. So, it is usually transformed into whey protein isolates (WPI, \geq 90% protein) or whey protein concentrates (WPC, 35-85% protein). Whey proteins are highly soluble over a broad range of pH, a property that is important in their application as foaming, emulsifying, gelling agents... Due to these good functional properties, WPC can be used as ingredients in many types of food products (beverages, baked products, processed meats, salad dressings, ice creams, dairy products, soups, infant formula products, dietary products...).

However, there is a lack of knowledge about caprine cheese whey transformation, and about the compositional and functional properties of caprine whey protein concentrates, that could be different from bovine WPC. Also, there are no studies about clarification of caprine whey before ultrafiltration treatment. The application of caprine whey protein concentrates could be interesting in food industry; however, there is no information about their use in food manufacturing.

The main objectives of this Ph.D. Thesis were:

1. The production of caprine whey protein concentrates from cheese whey by means of ultrafiltration/diafiltration.
2. The study of the viability of application of the thermocalcic precipitation followed by separation of aggregates and its effect on subsequent ultrafiltration/diafiltration fluxes. These fluxes were compared with original whey ultrafiltration/diafiltration fluxes.
3. The evaluation of the effect of the clarification by thermocalcic precipitation on the chemical, lipid and protein composition of caprine whey protein concentrates produced by ultrafiltration followed by diafiltration. These results are compared with those of a commercial bovine whey protein concentrate.

Summary

4. The study of the main functional or technological properties (solubility, emulsifying and foaming properties, gelling capacity) of the caprine whey protein concentrates and comparing these results with the functional properties of a commercial bovine whey protein concentrate.
5. The evaluation of the clarification by-products (aggregates) by means of the same analysis reported in objectives 3 and 4 in order to evaluate their use in food manufacturing.
6. The use of the caprine whey protein concentrates and the aggregates in food manufacturing; specifically, the study of the effects of their addition in some properties of acid milk gels and salad dressings. These results are also compared with the addition of a commercial bovine whey protein concentrate in these products.

The study was carried out with sweet caprine whey that was obtained from a local industry. Approximately 80 litres of whey were used in each trial. 30 litres were submitted to ultrafiltration/diafiltration, and 50 litres, after determining the calcium content, were used for thermocalcic precipitation. The calcium content of the whey was adjusted to 1.2 g/l with CaCl_2 , the pH adjusted to 7.3 with NaOH 10N and the temperature was quickly raised to 50°C, and maintained at this value for 8 minutes. The whey was cooled to 4-6 °C and kept overnight. The next day, the aggregates were separated and the clarified whey was submitted to ultrafiltration/diafiltration using a Centramate lab tangential flow system equipped with an Omega (polyethersulfone) membrane cassette (0.09 m² surface area, 10 kDa MW cut-off) (Pall Corporation, Ann Arbor, MI, USA). The membrane retentates and the aggregates were lyophilized using a freeze drier. All experiments were made in triplicate.

The chemical composition of these powders and of the original cheese whey were examined. Dry matter, ash, protein (by Bradford and Kjeldahl methods), lactose, calcium, lactate and lipids contents were determined. The pH was also analysed. The lipids were extracted and fractionated in phospholipids, neutral lipids and free fatty acids. The fatty acid composition and the main proteins (α -lactalbumin, β -lactoglobulin, serum albumin, immunoglobulin G and caseinomacropetide) contents of the powders were determined as well.

The functional properties evaluated were protein solubility, foaming properties (foam expansion and foam stability), emulsifying capacity (expressed as emulsifying

activity index), emulsifying stability, gelling capacity (rheological properties, water retention capacity, colour and microstructure of heat-induced gels prepared with solutions of whey protein concentrates).

Thanks to the good emulsifying and gelling properties that the caprine powders show, it was studied the effect of the caprine powders as ingredients in two different food applications: acid milk gels and salad dressings.

Most of the yogurts are elaborated with bovine milk, and there is little information with caprine milk. Besides, a way to increase the level of solids of the milk for yogurt is by addition of WPC. For this reason we decided to incorporate caprine WPC in caprine milk in order to obtain acid gels.

The acid milk gels were manufactured mainly with caprine milk. The levels of solids were increased by two methods: evaporation or supplementation with whey protein concentrates. The acidification was made by addition of glucono-delta-lactone. Rheological properties, whey draining and colour of acid gels were determined.

Salad dressing was the other application we decided to prepare, because there is no information about the addition of caprine WPC in the formulation of this kind of products.

The salad dressings were manufactured mainly with sunflower oil, water, vinegar, sugar, salt, onion and garlic, besides the caprine and bovine whey protein concentrates and caprine aggregates. Type of emulsion, pH, rheological properties, emulsion stability and colour of salad dressings were determined.

The main conclusions are the following:

1. The clarification of caprine cheese whey by thermocalcic precipitation followed by separation of the aggregates improves posterior ultrafiltration/diafiltration treatments.
2. The clarification procedure makes possible to obtain caprine whey protein concentrates with high protein content (74%). The lipid content decreases below 6%. However, the ash and calcium contents are higher than those observed in unclarified by-products. The phospholipid proportion and the protein and fatty acid compositions are not influenced by the clarification procedure.

Summary

3. Thermocalcic aggregation followed by aggregates separation improves some functional properties of caprine whey protein concentrates. This pre-treatment increases the emulsifying and gelling capacities at pH 7. Other functional properties (solubility, emulsifying stability at pH 7 and 4 and emulsifying and gelling capacities at pH 4) are not influenced by the clarification procedure.
4. Both caprine whey protein concentrates show higher solubility, gelling capacity and emulsifying stability than commercial bovine whey protein concentrate. The minimum concentration of product that is capable of producing heat-induced gels in caprine whey concentrates at pH 7 is lower than that observed in the bovine whey protein concentrate. The caprine whey protein concentrate obtained after clarification also shows better emulsifying capacity than bovine whey protein concentrate. Both caprine whey protein concentrates and bovine whey protein concentrate do not show foaming capacity.
5. The aggregates, the by-products in the clarification treatment, could also be of potential use in food manufacturing due to their interesting functional properties (solubility and emulsifying properties).
6. The acid caprine milk gels manufactured with caprine whey protein concentrates increase the firmness and decrease the syneresis more than the acid caprine milk gels made with bovine whey protein concentrates. The caprine yoghourts are usually weaker than bovine yoghourts; so, the use of caprine whey protein concentrates would be very useful in the manufacture of caprine fermented milks.
7. The emulsifying properties of caprine whey protein concentrates and aggregates are very useful in order to prepare salad dressings with high stability and strength. A more yellow salad dressing is obtained when aggregates are used.
8. The salad dressing made with the supplementation of caprine whey protein concentrates or aggregates show higher firmness than the dressings manufactured with the addition of bovine whey protein concentrate.

I. INTRODUCCIÓN	1
1. IMPORTANCIA DE LA LECHE Y LOS QUESOS DE CABRA	1
2. EL LACTOSUERO	4
2.1. INTRODUCCIÓN	4
2.2. PRODUCCIÓN DE LACTOSUERO	4
2.3. PROBLEMAS MEDIOAMBIENTALES DEL LACTOSUERO	5
2.4. TIPOS DE LACTOSUERO	6
2.5. COMPOSICIÓN DEL LACTOSUERO	7
2.5.1. LACTOSA	9
2.5.2. PROTEÍNAS SÉRICAS	10
2.5.2.1. β -lactoglobulina (β -LG)	12
2.5.2.2. α -lactalbúmina (α -LA)	13
2.5.2.3. Seroalbúmina	14
2.5.2.4. Inmunoglobulinas (Igs)	15
2.5.2.5. Proteosomas peptonas	16
2.5.2.6. Glicomacropéptido	17
2.5.2.7. Otras proteínas	17
2.5.3. LÍPIDOS	18
2.5.4. MINERALES	21
2.5.5. VITAMINAS	22
3. TECNOLOGÍA DE APROVECHAMIENTO DEL LACTOSUERO	23
3.1. TRATAMIENTOS PREVIOS	24
3.2. USO DIRECTO	25
3.2.1. ALIMENTACIÓN ANIMAL	25
3.2.2. FERTILIZANTE	25
3.2.3. QUESOS DE SUERO	26
3.2.4. BEBIDAS DE SUERO	27
3.2.5. SUSTRATO DE FERMENTACIONES	28
3.3. CONCENTRACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES: LACTOSUERO EN POLVO	28
3.4. FRACCIONAMIENTO DE COMPONENTES	29
3.4.1. DESMINERALIZACIÓN	31
3.4.2. RECUPERACIÓN DE LACTOSA Y OBTENCIÓN DE SUERO DELACTOSADO	31
3.4.3. TECNOLOGÍA PROTEICA	32
3.4.3.1. Lactalbúmina	32
3.4.3.2. Fracciones de proteínas individuales	33
3.4.3.3. Obtención de concentrados y aislados de proteínas séricas	34
4. PROPIEDADES NUTRITIVAS Y TERAPÉUTICAS DEL SUERO	43
5. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS SÉRICAS	46
5.1. INTRODUCCIÓN	46
5.2. SOLUBILIDAD	49
5.3. PROPIEDADES DE SUPERFICIE	53

Índice

5.3.1. PROPIEDAD ESPUMANTE.....	55
5.3.2. PROPIEDAD EMULSIONANTE.....	59
5.4. GELIFICACIÓN.....	65
6. APLICACIONES DE LOS CONCENTRADOS Y AISLADOS DE PROTEÍNAS SÉRICAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.....	72
6.1. INTRODUCCIÓN.....	72
6.2. PRODUCTOS DE PANADERÍA, PASTELERÍA Y CONFITERÍA.....	72
6.3. BEBIDAS.....	74
6.4. SALSAS, CREMAS, MAYONESAS Y ALIÑOS.....	75
6.5. PRODUCTOS LÁCTEOS.....	75
6.5.1. YOGURES.....	76
6.6. PRODUCTOS CÁRNICOS.....	78
6.7. PRODUCTOS PESQUEROS.....	79
6.8. APERITIVOS Y BARRAS ALIMENTICIAS.....	80
6.9. PRODUCTOS FUNCIONALES Y DIETÉTICOS.....	81
6.10. PELÍCULAS COMESTIBLES.....	82
6.11. HIDROGELES Y SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS.....	82

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS **85**

III. MATERIAL Y MÉTODOS **89**

1. MATERIAL DE LABORATORIO.....	89
1.1. APARATOS Y MATERIAL GENERAL.....	89
1.2. REACTIVOS Y DISOLVENTES.....	92
1.3. GASES.....	92
1.4. SOPORTES CROMATOGRÁFICOS.....	92
2. MÉTODOS.....	92
2.1. ORIGEN DE LAS MUESTRAS.....	92
2.2. ELABORACIÓN DEL QUESO DE CABRA Y TOMA DE MUESTRAS.....	94
2.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	95
2.3.1. RECEPCIÓN DE LOS SUEROS CAPRINOS.....	97
2.3.2. CLARIFICACIÓN DE LOS SUEROS.....	97
2.3.3. ULTRAFILTRACIÓN / DIAFILTRACIÓN DEL SUERO.....	98
2.3.4. DESHIDRATACIÓN DE LOS PRODUCTOS LÍQUIDOS.....	99
2.4. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA.....	99
2.4.1. DETERMINACIÓN DEL EXTRACTO SECO.....	99
2.4.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CENIZAS.....	99
2.4.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA.....	100
2.4.3.1. Método Bradford, variante microensayo.....	100
2.4.3.2. Método Kjeldahl.....	101
2.4.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO LIPÍDICO.....	101
2.4.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CALCIO.....	102

2.4.6. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE LACTATO	103
2.4.7. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN LACTOSA	104
2.4.8. DETERMINACIÓN DEL pH.....	105
2.5. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA	105
2.5.1. EXTRACCIÓN DE LOS LÍPIDOS	105
2.5.2. FRACCIONAMIENTO LIPÍDICO	105
2.5.2.1. Acondicionamiento de la muestra y de la minicolumna	106
2.5.2.2. Desarrollo del fraccionamiento	106
2.5.3. ANÁLISIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS.....	106
2.5.3.1. Preparación de ésteres metílicos.....	107
2.5.3.2. Condiciones de la cromatografía de gases.....	107
2.6. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN PROTEICA	107
2.7. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES	109
2.7.1 DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD PROTEICA	109
2.7.2. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ESPUMANTES.....	110
2.7.2.1. Dispersión de las proteínas.....	110
2.7.2.2. Formación de las espuma.....	110
2.7.2.3. Capacidad espumante	111
2.7.2.4. Estabilidad espumante.....	111
2.7.3. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES EMULSIONANTES	112
2.7.3.1. Preparación de la emulsión.....	112
2.7.3.2. Capacidad emulsionante.....	112
2.7.3.3. Estabilidad emulsionante.....	114
2.7.4. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD GELIFICANTE	115
2.7.4.1. Preparación de los geles.....	115
2.7.4.2. Determinaciones reológicas.....	115
2.7.4.3. Capacidad de retención de agua	116
2.7.4.4. Determinación del color.....	116
2.8. APLICACIONES	117
2.8.1. ELABORACIÓN DE GEL ÁCIDO CON LECHE	117
2.8.1.1. Preparación de los geles ácidos.....	118
2.8.1.2. Determinaciones reológicas	121
2.8.1.3. Sinéresis o suero separado por centrifugación	121
2.8.1.4. Determinación del color	122
2.8.2. SALSAS	122
2.8.2.1. Preparación de las muestras	122
2.8.2.2. Determinación del tipo de emulsión y pH.....	123
2.8.2.3. Determinaciones reológicas.....	123
2.8.2.4. Determinación del color.....	124
2.8.2.5. Evaluación de la estabilidad.....	124
2.9. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA	125

IV. RESULTADOS y DISCUSIÓN	127
1. COMPOSICIÓN DEL SUERO DE PARTIDA	127
1.1. COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA.....	127
1.2. COMPOSICIÓN PROTEICA	130
2. OBTENCIÓN DE CPS Y SUBPRODUCTOS DE CLARIFICACIÓN: FLUJOS DE ULTRAFILTRACIÓN	132
3. COMPOSICIÓN DE LOS CPS	136
3.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA	136
3.2. FRACCIONAMIENTO LÍPIDICO	146
3.3. COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.....	150
3.4. COMPOSICIÓN PROTEICA	155
4. PROPIEDADES FUNCIONALES	161
4.1. SOLUBILIDAD.....	161
4.2. PROPIEDADES ESPUMANTES.....	167
4.3. PROPIEDADES EMULSIONANTES	172
4.4. PROPIEDADES GELIFICANTES	180
4.4.1. REOLOGÍA.....	180
4.4.2. CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA.....	193
4.4.3. COLOR.....	196
4.4.4. MICROESTRUCTURA	204
5. APLICACIONES	206
5.1. GELES ÁCIDOS	206
5.1.1. PRODUCTOS OBTENIDOS	206
5.1.2. GELIFICACIÓN	208
5.1.3. PROPIEDADES REOLÓGICAS	211
5.1.4. SINÉRESIS.....	221
5.1.5. COLOR.....	225
5.2. SALSAS.....	230
5.2.1. TIPO EMULSIÓN y pH	231
5.2.1. PROPIEDADES REOLÓGICAS	233
5.2.2. ESTABILIDAD.....	241
5.2.3. COLOR.....	246
V. CONCLUSIONS	253
VI. BIBLIOGRAFÍA	255

1. IMPORTANCIA DE LA LECHE Y LOS QUESOS DE CABRA

La cabra fue uno de los primeros animales de granja en ser domesticados, para su uso y consumo, hace aproximadamente 12.000 años en Ganj Darech (hoy en día Irán), próximo a la cuna de la primera civilización conocida, Mesopotamia, donde la agricultura estaba muy desarrollada y estaban presentes especies de cabras salvajes (Pringle, 1998; Zeder y Hesse, 2000; Hatziminaoglou y Boyazoglu, 2004). De este



modo la cabra está claramente asociada al destino de la humanidad puesto que la domesticación y la cría de animales es una característica propia de las civilizaciones.

Las cabras jugaron un papel importante en la mitología del antiguo Egipto, China, Mongolia, Grecia y la cultura hebrea. Como curiosidad, el faraón Tutankamón ordenó que fuera colocado en su tumba su queso de cabra favorito para poder comerlo durante su viaje hasta el otro mundo y ofrecerlo como regalo a los dioses. El imperio romano conservó la cría de estos animales y facilitó el desarrollo del sector caprino, que incluso sobrevivió varios siglos después; así, en la Edad Media, la cabra tuvo gran valor durante los períodos de hambruna (Boyazoglu et al., 2005). En los siglos posteriores las cabras se usaban como fuente de leche fresca en los barcos de exploradores de personajes tan conocidos como Cristóbal Colón o el capitán Cook (Anónimo, 2010).

El siglo XVIII supuso una gran evolución, porque se identificaron y definieron especies de cabras distintas a las 3 razas originales (europea, asiática y africana). Sin embargo, los cambios producidos durante finales del siglo XIX condujeron a una producción intensiva y especializada, basada principalmente en la leche de vaca, que reemplazó el modelo tradicional y artesanal, e impulsó el sector bovino relegando el papel de la cabra a la subsistencia en zonas rurales, pobres o marginales. Además fueron prohibidas en muchas regiones por ser consideradas las responsables de la desertificación y la deforestación, suponiendo una gran amenaza para el medio ambiente (Boyazoglu et al., 2005).

Por estos motivos se ha considerado a esta especie como "*the little cow of the poor man*" (Haenlein, 2001).

No obstante desde la segunda mitad del siglo XX la situación del sector caprino ha cambiado positivamente, debido a varios factores (Morand-Fehr et al., 2004):

Introducción

- La gran capacidad de adaptación de las cabras a diferentes ambientes, incluso bajo condiciones adversas.
- Su capacidad de modificar la cubierta vegetal, al limpiar áreas ricas en arbustos, maleza... permitiendo así el pastoreo del resto del ganado e incluso evitando o reduciendo los incendios forestales.
- La buena imagen de la leche y los productos lácteos caprinos que han incrementado su producción y consumo, fundamentalmente debido a que durante los últimos 30 años se ha producido un despertar y una vuelta hacia lo tradicional, lo natural, lo artesanal, y estos productos evocan la "felicidad de vivir en el campo".

En la figura 1 se muestra la evolución del número de cabezas de cabra y de vaca a nivel mundial desde el año 1961 hasta la actualidad. Se observa claramente un incremento en el número de ambas especies, sin embargo el aumento del sector caprino es mucho más acusado con un 148,89% frente al 46,7% del sector bovino.

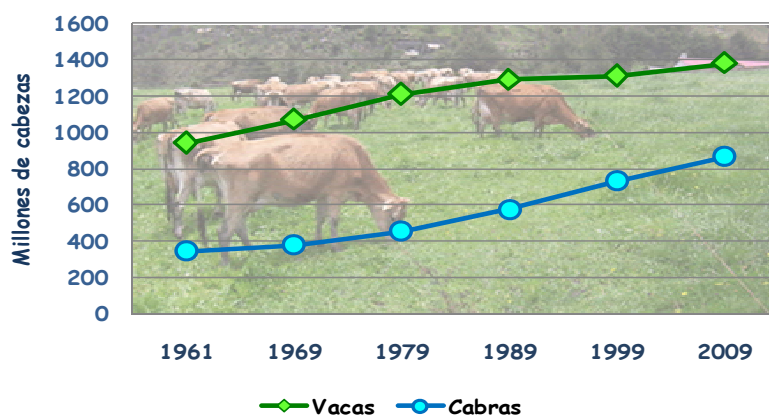


Figura 1: Millones de cabezas de cabras y vacas a nivel mundial (FAO, 2010a)

La leche de origen bovino y todos sus productos (más del 95% de los productos lácteos derivan de este tipo de leche) han sido desde siempre un sinónimo de la industria láctea, tanto en el mercado mundial como en los libros de texto (Park y Haenlein, 2006).

Como se observa en la tabla 1, la producción de leche de bovina es mucho mayor tanto a nivel mundial como a nivel europeo o español que la leche de cabra.

Tabla 1: Producción de leche de cabra y de vaca en el año 2007.

	Producción de leche de vaca (Toneladas)	Producción de leche de cabra (Toneladas)
Mundial	560.487.275	14.800.534
Europa	207.820.909	2.585.930
España	6.716.700	488.500

Fuente: FAO (2010b)

Tanto la industria láctea caprina como la ovina son importantes en la economía de varios países, sobre todo de la zona del Mediterráneo (Francia, Italia, España y Grecia). Esto también prueba que el sector caprino no es necesariamente sinónimo de pobreza y subdesarrollo (Haenlein, 2001).

En general, una parte de la leche de cabra se consume como bebida en el sitio de producción o muy próximo a él, y algo se concentra y esteriliza, sin embargo, el principal destino de la leche, tanto de cabra como de oveja, es la producción de leches fermentadas y quesos (Fox, 2001).

Un aumento de la demanda de los quesos con leche caprina y ovina ha sido muy beneficioso para pequeños productores de quesos, ya que es mejor producir este tipo de quesos que competir con las grandes industrias lácteas que fabrican quesos de leche bovina (Casper et al., 1998). Existe un gran potencial para el crecimiento de un mercado de quesos de oveja y cabra, sin embargo se topan con un gran problema, que es la eliminación del suero ovino y caprino, porque las industrias encargadas del procesado del suero no aceptan el suero de este origen, debido a motivos relacionados con el sabor, el volumen y la falta de conocimiento de la composición y propiedades funcionales del suero ovino y caprino. Por estos motivos los productores de queso acaban vertiendo el suero al medio ambiente, con los consiguientes problemas medioambientales y económicos. La producción de productos alimentarios con sueros caprinos y ovinos, no sólo evitaría la contaminación, sino también generaría un mercado para este tipo de productos (Casper et al., 1998).

A pesar de todo, la presencia dominante del sector bovino y sus productos lácteos hace difícil para el sector caprino mantener un nicho competitivo en el mercado, por lo que es necesario, no sólo proteger, sino también fomentar el apoyo tanto social como económico al sector caprino, mantener una imagen positiva de la

Introducción

cabra y sus productos, y promover e impulsar la investigación científica sobre este sector (Boyazoglu et al., 2005).

2. EL LACTOSUERO

2.1. INTRODUCCIÓN

Cuenta una de las muchas leyendas que, alrededor del año 5000 a.C. en Mesopotamia, un comerciante árabe llamado Kanana vertió leche en un saco, el cual estaba hecho con la piel del estómago de una cabra o de una oveja. Al caer la noche, tras caminar bajo el intenso calor del desierto abrió su saco para beber la leche y encontró sorprendido un líquido con unos trozos blancos. Se puede afirmar que le gustó lo que probó, porque había nacido el arte de hacer queso y al mismo tiempo había descubierto el suero (Pintado et al., 2001; Barbosa et al., 2010).

El suero lácteo o lactosuero se puede definir como el subproducto originado tras la separación de la cuajada en la elaboración de queso o durante la separación de las caseínas de la leche para producir caseinatos (Pintado et al., 2001; Foegeding et al., 2002).



Tradicionalmente el suero era considerado por los productores de queso como una pérdida o desecho con poco o ningún valor comercial, sin embargo este punto de vista cambió radicalmente cuando se descubrieron numerosas técnicas y aplicaciones nutricionales para el suero y sus componentes (Walzem et al., 2002).

El suero posee un contenido sólido total de 6,0-6,5% (p/v) (Pintado et al., 2001). Está constituido por proteínas séricas o del lactosuero, aminoácidos, péptidos, vitaminas, minerales, trazas de grasa y lactosa, la cual representa el componente principal. Este líquido posee un color verdoso-amarillento, o a veces incluso un matiz azulado, aunque el color depende de la calidad y tipo de leche utilizada, siendo la leche de vaca la más popular (Smithers, 2008).

2.2. PRODUCCIÓN DE LACTOSUERO

Hoy en día el suero supone uno de los mayores subproductos de la industria quesera y de la caseína. De hecho, el volumen de suero está creciendo casi paralelamente al volumen de leche, puesto que el aumento en la producción de leche conlleva una mayor producción de quesos, que implica directamente el incremento de la producción de suero (Smithers, 2008).

Según la Federación Nacional de Industrias Lácteas (FIAB, 2010), la producción de quesos en España en 2008 fue de 317.100 toneladas, siendo la de quesos de cabra de 20.400 toneladas (tabla 2). Teniendo en cuenta que por término medio, 10 litros de leche generan, aproximadamente, 1 kg de queso y 9 litros de suero (Jelen, 2003), se puede estimar la producción de suero de quesería, tal como refleja la tabla 2.

Tabla 2: Producción de quesos y estimación de la producción de lactosuero en España.

	Producción de Quesos (toneladas)	Producción estimada de Lactosuero (toneladas)
ESPAÑA	Quesos de vaca	129.000
	Quesos de oveja	45.300
	Quesos de cabra	20.400
	Quesos de mezcla	122.400
	Total quesos España	317.100

Fuente: FIAB (2010)

2.3. PROBLEMAS MEDIOAMBIENTALES DEL LACTOSUERO

La situación del lactosuero ha cambiado bastante en los últimos años. Durante mucho tiempo se creyó que el suero era un producto de desecho, y se vertía sin control en la naturaleza (Scott, 1991), por lo que un volumen considerable de este producto iba a parar a ríos, lagos, océanos y al sistema municipal de alcantarillado (Smithers, 2008).

El alto poder contaminante del lactosuero deriva principalmente de su elevado contenido en materia orgánica (lactosa, proteínas y materia grasa), siendo su riqueza en lactosa la principal responsable, por su capacidad para actuar como sustrato de fermentación bacteriana (Castillo et al., 1996).

Una quesería a gran escala podría originar unos 50.000 litros de suero/diario; suponiendo una demanda biológica de oxígeno (DBO) de 12 g O₂/litro, En 5 días la DBO₅ sería de 3.000.000 g O₂. Según los estándares europeos, estos valores implican una contaminación extrema, igual a la que produciría una ciudad de 50.000 habitantes (Ostojic et al., 2005). En los últimos 25 años se han introducido leyes para la

Introducción

protección del medio ambiente. Esta estricta política medioambiental ha obligado a la industria láctea a buscar soluciones para manejar los grandes volúmenes de suero que se producen, buscando alternativas al vertido. Actualmente, como la lucha contra la polución ambiental prohíbe esta práctica, el vertido del suero debe ir precedido necesariamente de una depuración costosa, que elimina los componentes más valiosos del lactosuero. Además en una época en que las necesidades de la alimentación humana y animal son cada vez más importantes es preferible el aprovechamiento del lactosuero mediante técnicas apropiadas a destruirlo (Veisseyre, 1988; Smithers, 2008).

En España, la normativa medioambiental (Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas), no permite el vertido del suero, y exige, por lo tanto, al queso la gestión del suero que produce (Ley 10/1998 de 21 de abril, de Residuos). Esta ley señala que el queso puede encargarse bien de la reutilización o de la transformación en sus propias instalaciones, o bien entregarlo a otra empresa, que se encargaría de su empleo y/o transformación.

Para el queso, una de los destinos más simples, principalmente en queserías con granjas, es la de la utilización del suero como fuente de alimentación animal, principalmente, vacuno, pero también porcino.

La segunda opción, que implica el tratamiento del suero in situ, supone un problema desde el punto de vista económico. El alto contenido de agua del suero (~ 95%) encarece el proceso de concentración, secado o fraccionamiento, y la mayoría de queserías, principalmente las pequeñas, carecen de los medios y tecnología necesaria para un adecuado aprovechamiento del lactosuero, por lo que para resolver el problema de los vertidos, es necesario realizar una inversión sustancial para llevar a cabo el tratamiento de este efluente.

Para ello, la alternativa para cumplir esta ley de residuos es la de entregar el suero a un posible gestor, que se encargue de su tratamiento.

2.4. TIPOS DE LACTOSUERO

En función de la forma de producir la separación de la principal proteína (caseína) de la leche (Jelen, 1992), se obtienen 2 tipos diferentes de suero lácteo:

- ☆ Lactosuero dulce
- ☆ Lactosuero ácido

Ambos se diferencian en el contenido mineral, el pH, la composición de la fracción proteica y en el contenido de lactosa (Jelen, 1992; 2003).

El suero ácido procede de la fabricación de quesos frescos de coagulación ácida como el cottage o el quark, elaborados mediante fermentación microbiana y de la obtención industrial de caseínas y caseinatos a través de la acidificación directa (mediante la adición de acidulantes como la glucono- δ -lactona o ácidos minerales o orgánicos) (Jelen, 1992; 2003). Por el contrario, el suero dulce se obtiene de la coagulación enzimática de las caseínas durante la fabricación de la mayoría de los quesos como el Cheddar, Swiss, Gouda, Mozzarella... (Jelen, 1992). Este tipo de suero es el más abundante y generalmente posee un mayor pH ($\geq 5,6$) y un mayor contenido en lactosa, mientras que el suero ácido, con un pH $\leq 5,1$, presenta un menor contenido en lactosa, porque ésta se convierte en ácido láctico, pero posee una mayor concentración de minerales, debido probablemente a la solubilización del fosfato cálcico coloidal de las micelas de caseína que ocurre al mismo tiempo que la acidificación (Zall, 1992; Jelen, 2003; Pintado et al., 2001). Las diferencias de acidez y de contenido mineral (fundamentalmente de calcio) parecen ser las principales razones de las variaciones en las propiedades físico-químicas de ambos tipos de sueros y de sus diferencias sensoriales, particularmente en su sabor salado y agrio que limitan el uso del suero sin modificar como ingrediente en muchos productos alimenticios (Jelen, 1992).

2.5. COMPOSICIÓN DEL LACTOSUERO






Los principales componentes del lactosuero, tanto dulce como ácido, son el agua (93-94%), lactosa (70-75% de los sólidos totales), proteínas séricas (8-11% de los sólidos totales) y minerales (10-15% de los sólidos totales) (Jelen, 1992; 2003). También presenta grasa y vitaminas (Smithers, 2008).

En la tabla 3 se puede observar la composición media del suero caprino, bovino y ovino. La composición del lactosuero depende del tipo de queso (enzimático o ácido), de las técnicas de elaboración queseras empleadas (como el método de coagulación), del tratamiento que experimenta el suero líquido (tratamientos térmicos, preconcentración, recuperación de los finos de caseína), del estado fisiológico del animal, del tipo de raza y especie, y además sigue la tendencia de la composición química de la leche de la que proviene (Quiles et al., 1994; Pintado et al., 2001; Jelen, 1992, 2003; Ji y Haque, 2003; Jaeggi et al., 2005; Moreno-Indias et al., 2009).

Introducción

La composición original de la leche de partida varía en función de la época de lactación, alimentación, clima, raza, de las diferencias individuales de los animales (Quiles et al., 1994; Tziboula-Clarke, 2003) y de los tratamientos previos (homogeneización, centrifugación, tratamiento térmico) que experimenta antes de la fabricación quesera (Jelen, 1992).

Tabla 3: Composición típica del suero ácido y dulce (g/l).

	SUERO DULCE			SUERO ÁCIDO		
						
	a,b,e	c	c,d	a,b,e	c	d
pH	5,9-6,4	6,2	6,3	4,6-4,8	4,6	
Sólidos totales	63,0-70,0	66,1	74,6 - 83,84	63,0 - 70,0	64,0	62,91
Lactosa	46,0-52,3	47,1	50,98 - 51,6	44,0 - 46,0	50,7	39,18
Proteína	6,0-10,0	7,7	10,5 - 18,71	5,8 - 8,0	5,3	9,35
Grasa	0,2-10	5,1	6,46 - 8,2	0,1 - 0,5	0,3	0,40
Cenizas	5,0	6,1	4,30 - 5,65	7,5	7,6	8,36
Nitrógeno no proteico	0,37	0,5	0,8	0,40	0,6	0,67
Calcio	0,4-0,6		0,49	1,2 - 1,6		1,35
Fosfato	1,0-3,0			2,0 - 4,5		
Lactato	2,0			6,4		
Cloruros	1,0-1,2			0,90 - 1,2		
Magnesio	0,07-0,08			0,10 - 0,11		
Citrato	1,2-1,7			0,2 - 10		
Sodio	0,4-0,53			0,4-0,51		
Potasio	1,4-1,6			1,4-1,6		
Sulfatos	0,7			0,5		

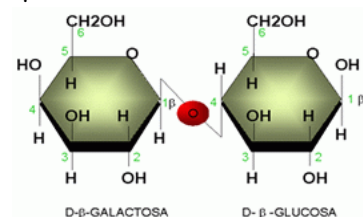
Fuente: ^a Jelen, (1992); ^b Riera et al., (1996a), ^c Casper et al., (1998); ^d Pintado et al.,(2001); ^e Jelen, (2003)

Al observar la composición del suero ovino (Casper et al., 1998; Pintado et al., 2001; Pereira et al., 2002; Jaeggi et al., 2005), éste presenta un contenido proteico, lipídico, láctico y de sólidos totales superior al de los sueros caprinos y bovinos, como consecuencia, posiblemente, de que la leche de oveja posee una mayor proporción de proteínas, lípidos, extracto seco y lactosa que las otras dos especies (Casper et al., 1998)

Al mismo tiempo la producción de leche de cabra es estacional (Park, 1990), con lo que se puede ver modificada la composición química del suero a lo largo del tiempo por estas variaciones estacionales (Mangino, 1992b; Jaeggi et al., 2005), ocasionadas por la etapa de lactación en la que se encuentren los animales y por modificaciones en la alimentación (Mangino, 1992b).

2.5.1. LACTOSA

La lactosa es, no sólo el principal hidrato de carbono de la leche, sino también el componente principal del lactosuero (aparte del agua), constituyendo aproximadamente el 4,4 - 4,9% del total del suero (~ el 75% del extracto seco) (Jelen, 1992). Es un disacárido formado por una molécula de glucosa y otra de galactosa, que se sintetiza en la glándula mamaria.



La concentración de lactosa en el suero es bastante constante, pero depende de la proporción de lactosa

original que ha sido degradada a ácido láctico (Scott, 1991). Los sueros ácidos presentan menor contenido de lactosa que los sueros dulces, y consecuentemente, un alto contenido en ácido láctico a raíz de que durante la fermentación bacteriana parte de la lactosa se transforma en ácido láctico.

Es un azúcar reductor, que en algunas circunstancias, puede reaccionar con los grupos aminos de las proteínas. Es una adecuada fuente de energía que juega un papel importante en la absorción del calcio (U.S.D.E.C, 2004b). La lactosa se caracteriza por poseer un solubilidad limitada y una baja dulzura (Jelen, 1992) lo que limita, en muchas ocasiones, su uso en alimentos, por lo que se suele hidrolizar antes de su utilización (Walzem et al., 2002). La decoloración amarillenta del suero puede ocurrir tras un tratamiento térmico prolongado o incluso por reacciones de pardeamiento no enzimático (reacción de Maillard) entre la lactosa y las proteínas séricas (Jelen, 1992).

2.5.2. PROTEÍNAS SÉRICAS

Aunque el componente mayoritario después del agua es la lactosa, son las proteínas séricas el ingrediente de más valor (Jelen, 1992). Se pueden definir como las proteínas que permanecen solubles en la fase líquida después de la precipitación de las caseínas a pH 4,6 (Fox, 2001; Ng-Kwai-Hang, 2003). Constituyen aproximadamente el 0,7% del suero (~8-11% del extracto seco). Además el suero también contiene 0,2-0,3% de nitrógeno no proteico (Jelen, 1992, 2003). El contenido proteico del suero depende en su mayor parte del tipo de coágulo y de su tratamiento y la presencia en el mismo de partículas de la cuajada puede aumentarlo considerablemente (Scott, 1991).

En la leche, el 80% de las proteínas son caseínas; sin embargo, éstas se agregan en la cuajada durante la formación del queso, mientras que las proteínas séricas no quedan retenidas en la cuajada permaneciendo disueltas en la porción acuosa (Walzem et al., 2002).

Las proteínas séricas son incluso un grupo más heterogéneo que las caseínas, y tienen pocas características en común (Robin et al., 1993; Ng-Kwai-Hang, 2003), exhibiendo una serie de propiedades únicas que dependen de su peso molecular, de su composición y su secuencia aminoacídica (Morr y Ha, 1993; Fox, 2001):

- ✓ Son solubles bajo condiciones que no lo son las caseínas (a pH 4,6-4,7).
- ✓ La mayoría son proteínas globulares.
- ✓ Se desnaturalizan fácilmente con el calor, mientras que las caseínas son más estables.
- ✓ Las caseínas presentan fuertes regiones hidrofóbicas mientras que las proteínas séricas poseen un mayor balance entre residuos hidrofílicos e hidrofóbicos.
- ✓ No se ven muy afectadas por el pH y las sales. No están fosforiladas y son insensibles al calcio.
- ✓ Presentan una estructura secundaria y terciaria más organizada que las caseínas debido a una distribución más uniforme de los tipos de aminoácidos a lo largo de la cadena polipeptídica y a la presencia de puentes disulfuro (lo que implica que poseen grandes cantidades de cisteína a diferencia de lo que ocurre en las caseínas). Todas las proteínas séricas contienen puentes disulfuro intermoleculares que estabilizan su estructura.

Una de las características más importantes de las proteínas séricas es la alta presencia de residuos de aminoácidos con grupos sulfhidrilos que les permite formar

enlaces covalentes intermoleculares durante procesos a altas temperaturas (lo que provoca su desnaturalización y posterior agregación) (Morr y Ha, 1993). Las proteínas del suero son solubles en un amplio rango de pH y se desnaturalizan (individualmente y en solución) entre 64 y 85 °C, y a partir de esta temperatura empiezan a agregarse y a gelificar. La desnaturalización implica la pérdida de solubilidad proteica (Bonnaillie y Tomasula, 2008).

Las principales proteínas séricas son la β -lactoglobulina (β -LG), la α -lactalbúmina (α -LA), inmunoglobulinas (Igs), la seroalbúmina (BSA) y las proteosas peptonas. Junto a éstas, aparecen otras proteínas minoritarias como el glicomacropéptido, lactoferrina, y enzimas como la lactoperoxidasa. En la tabla 4 se muestra la composición proteica de los sueros bovinos y algunas de sus características. Las diferencias encontradas en el perfil proteico pueden ser consecuencia de las variaciones estacionales, de la etapa de lactación, de la raza, de la alimentación y de las técnicas de elaboración queseras empleadas (Pintado y Malcata, 1996; Casper et al., 1998; Moreno-Indias et al., 2009). Los diferentes tratamientos térmicos aplicados, tanto a la leche como al suero, también pueden influir en las proteínas séricas, ya que su estabilidad al calor es distinto, y sigue este orden decreciente: α -LA > β -LG > BSA > Ig (Morr y Ha, 1993).

Tabla 4: Principales proteínas séricas

Proteínas	Concentración en suero (g/L)	% en suero	Pm (kg/mol)	pI	T ^a Desnat. (°C)
β -lactoglobulina	2-4	48-58	18	5,4	82
α -lactalbúmina	0,6-1,7	13-19	14	4,4	61
Glicomacropéptido	1,5	12-20	8,6	<3,8	
Proteosas peptonas	0,2-0,4	6	4-80	5,1-6,0	
Seroalbúmina	0,2-0,4	6	66-69	4,8-5,1	66
Inmunoglobulinas	0,5-1,0	8-12	150-1000	5-8	72
Lactoferrina	0,1	2	77	7,9	
Lactoperoxidasa	0,03	0,5	78	9,6	

Fuente: Jelen (1992); Etzel (2004); Kilara y Vaghela (2004); Bonnaillie y Tomasula (2008); Sullivan et al. (2008).

(Pm: Peso Molecular; pI: Punto Isoeléctrico; T^a Desnat.: Temperatura de desnaturalización).

Introducción

Casper et al. (1998) señalan que el suero de origen caprino tiene menos BSA y β -LG que el suero bovino y ovino, pero por el contrario la concentración de α -LA es mayor. El contenido de Igs también es menor que en el suero bovino.

2.5.2.1. β -lactoglobulina (β -LG)

Es la proteína más abundante del lactosuero, constituida la caprina, al igual que su homóloga bovina, por 162 aminoácidos; sin embargo, difiere de la β -LG B bovina en seis posiciones incluyendo ambos residuos terminales. Estas diferencias en aminoácidos implican que, la β -LG caprina tenga tres cargas negativas menos y una carga positiva más que la β -LG bovina en un rango de pH entre 5 y 9 (Jenness, 1980; Park, 2006). Además ambas proteínas exhiben diferencias estructurales, según estudios que demuestran que la variante caprina es menos estable que la bovina bajo desnaturalización en urea y que ambas pueden ser distinguidas inmunológicamente. Presenta diversas variantes genéticas A, B, C y D que se diferencian en sustituciones aminoacídicas en distintas posiciones (Jenness, 1980; Park, 2006), siendo las formas A y B las más abundantes (Mehra y O' Kennedy, 2008). Es sintetizada en la glándula mamaria (Ng-Kwai-Hang, 2003).



La β -LG, en relación a su composición aminoacídica, presenta menor contenido de aspartato y mayor cantidad de alanina y glutamato que la α -LA (Park, 2006).

La estructura cuaternaria de la β -LG presenta una dependencia del pH: a pHs por debajo de 3,5 y por encima de 8,0, la proteína existe en su forma monomérica, la cual tiene un peso molecular de 18.000 kDa, sin embargo entre pH 3,5 y 5,2 forma octámeros y entre pH 5,2 y 8,0 (que incluye el pH de la leche) forma dímeros esféricos con un peso molecular de aproximadamente 36 kDa y con un diámetro de 18 Å (Bonnaillie y Tomasula, 2008). En la figura 2 se resume la variación de la estructura de la β -LG con el pH.

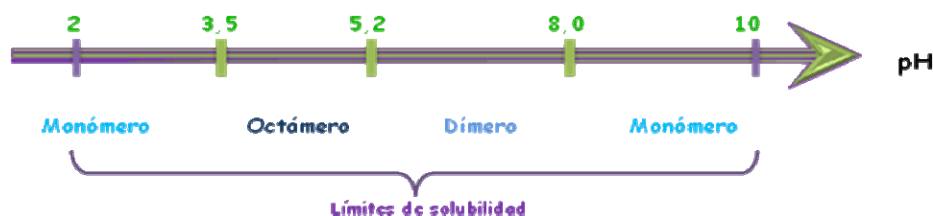


Figura 2: Relación de la estructura de la β -LG con el pH
(Bonnaillie y Tomasula, 2008; Sullivan et al., 2008)

Esta molécula presenta cinco residuos de cisteína, que forman dos enlaces disulfuro intramoleculares, y un grupo tiol libre que puede constituir puentes intermoleculares con otras moléculas de β -LG o con otras proteínas como la α -lactalbúmina (Creamer y Sawyer, 2003; Mehra y O' Kennedy, 2008). La conformación nativa es sensible no sólo al pH, sino también al calor y el grupo tiol libre es de gran importancia en la desnaturalización, puesto que en primer lugar se disocia el dímero seguido por el desplegamiento del monómero lo que permite una mayor reactividad del grupo tiol que puede formar puentes disulfuro y conducir a la agregación, si bien esta agregación incluso puede ocurrir sin la participación de este grupo tiol (Mehra y O' Kennedy, 2008).

Aunque ha sido aislada hace más de 60 años, se desconoce la función de esta proteína. Es capaz de unir calcio, zinc y una variedad de pequeñas moléculas hidrofóbicas. La β -LG y otras proteínas como la que se une al retinol, a la apolipoproteína D... pertenecen a una familia de proteínas cuya función principal es la de unir y/o transportar pequeñas moléculas. Su secuencia es similar a las proteínas que se unen al retinol, sin embargo su función parece no ser la misma, pudiendo ser la encargada de unirse a ácidos grasos u otros lípidos (Walzem et al., 2002) aunque la β -LG porcina no se une a ácidos grasos, lo que hace que sea imposible que éstos sean sus verdaderos ligandos (Creamer y Sawyer, 2003). Además no es una proteína con presencia universal puesto que no se encuentra en la leche humana, de roedores y de lagomorfos. Es posible que se trate de una proteína con un papel nutricional que en determinados casos posee propiedades adicionales fortuitas (Creamer y Sawyer, 2003).

La β -LG es no sólo la proteína más abundante del suero sino también la más importante, puesto que la funcionalidad de los concentrados de proteínas séricas son un reflejo de la funcionalidad de esta proteína (Christiansen et al., 2004). Tomasula y Yee (2001) observaron que soluciones de concentrados de proteínas séricas (CPS o WPC) enriquecidas en β -LG mostraban una mejor capacidad gelificante, estabilidad y actividad emulsionante. Previamente, Kim et al. (1987) señalaban que esta proteína presenta una correlación positiva tanto con estas propiedades como con la capacidad espumante y la solubilidad proteica.

2.5.2.2. α -lactalbúmina (α -LA)

Es la segunda proteína más abundante del suero, representando aproximadamente el 20% del total de proteínas séricas (Morr y Ha, 1993).

Introducción

La α -LA es la más pequeña de las proteínas séricas, pues posee un peso molecular de ~ 14 kDa con 123 residuos aminoacídicos y su forma monomérica presenta una estructura terciaria compacta y esférica que está estabilizada por un enlace interno de calcio iónico, que hace que esta proteína sea menos sensible a los cambios de pH por encima de 4,0, a diferencia de lo que sucede con la β -LG (Bonnaillie y Tomasula, 2008). Esta proteína presenta 2 variantes genéticas: A y B, y tiene 8 grupos de cisteína que forman 4 enlaces disulfuro internos (Park, 2006; Bonnaillie y Tomasula, 2008). Es sintetizada en la glándula mamaria (Ng-Kwai-Hang, 2003).



La caprina es idéntica en un 94% a su homóloga bovina (Zhang y Brew, 2003). Si se compara la secuencia aminoacídica completa entre la α -LA caprina y la variante B de α -LA bovina (que es la más común en el ganado europeo), se observan únicamente 12 diferencias. Asimismo la conformación de ambas proteínas parece ser también similar. Sin embargo la α -LA caprina carece de metionina con lo que se parece a la variante ovina, pero difiere de otras α -LAs que contienen tres residuos de metionina (Jenness, 1980; Park, 2006). Posee además una secuencia aminoacídica similar a la enzima lisozima (Zhang y Brew, 2003; Park, 2006).

Al contrario que la β -LG, esta proteína está presente en leche de la mayoría de los mamíferos (Zhang y Brew, 2003).

Esta molécula es una proteína ligante del ion calcio y al mismo tiempo también tiene una gran afinidad por otros iones metálicos (Zn^{+2} , Mn^{+2} , Cd^{+2} , Cu^{+2} y Al^{+3}), lo que permite que estos minerales sean más fácilmente absorbidos. Además es la proteína "B" de la enzima lactosa sintetasa, que cataliza la última reacción de la biosíntesis de la lactosa (Walzem et al., 2002; Foegeding y Luck, 2003). Su fuerte fijación con el calcio influye fuertemente en su estabilidad y su estructura, aunque no afecta a su papel en la síntesis de lactosa (Zhang y Brew, 2003). Esta proteína presenta la peculiaridad que es más inestable al calor cuando el calcio está ausente que cuando éste está presente (Morr y Ha, 1993), porque emplea este ión metálico para formar enlaces iónicos intramoleculares, que tienden a hacer la molécula resistente al desplegamiento térmico.

2.5.2.3. Seroalbúmina

Esta proteína caprina parece ser homóloga a la seroalbúmina bovina (BSA), la cual es idéntica a la que se encuentra en el suero sanguíneo bovino (Park, 2006).

Se considera que posee la cadena polipeptídica más larga de todas las proteínas séricas con 582 aminoácidos (Morr y Ha, 1993). Contiene 35 residuos de cisteína, que forman 17 enlaces disulfuro quedando un grupo tiol libre. A bajos y altos valores de pH (<4 y >8) se encuentra parcialmente desplegada (Park, 2006). Por debajo de su punto isoeléctrico (pI) experimenta cambios conformacionales aumentando su viscosidad y su volumen, y su solubilidad disminuye al aumentar la fuerza iónica (Riera et al., 1996a).

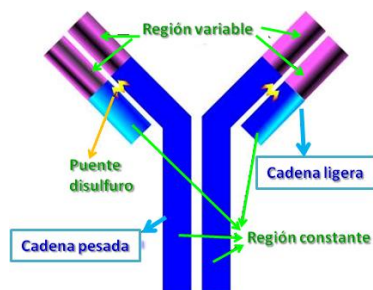
La seroalbúmina presente en la leche deriva del torrente sanguíneo materno que la transporta a la glándula mamaria. A diferencia de la β -LG y de la α -LA no es sintetizada en la glándula mamaria. La concentración de esta proteína en la leche aumenta durante la mastitis (Walzem et al., 2002).

Actúa tanto como proteína de reserva y como transportadora de ácidos grasos hacia el torrente sanguíneo, de hormonas esteroideas, bilirrubina e iones metálicos. En la sangre se encarga de mantener la presión osmótica coloidal y el pH (Riera et al., 1996a; Haggarty, 2003).

2.5.2.4. Inmunoglobulinas (Igs)

Las Igs, también llamadas anticuerpos, son una familia de proteínas que comparten una función biológica: proporcionar protección inmunológica (Marnila y Korhonen, 2003).

Son las proteínas más grandes del suero, con un peso molecular entorno a 150 kDa (Bonnaillie y Tomasula, 2008). Los tipos de Igs presentes tanto en el calostro como en la leche y en el suero caprino son: IgA, IgM y IgGs (IgG₁ y IgG₂), siendo estas últimas las que se encuentran en mayor proporción en la leche caprina que en la leche humana y de otros rumiantes (Park, 2006).



Están compuestas por dos cadenas ligeras idénticas y dos pesadas idénticas (ver figura adjunta), y cada una de ellas posee un peso molecular de aproximadamente 23 y 53 kDa respectivamente. Están unidas entre si por puentes disulfuro. Las cadenas ligeras poseen una región constante y otra variable, la cual se corresponde con la zona de especificidad inmunológica que será la zona de interacción con el antígeno (Marnila y Korhonen, 2003).

Introducción

La concentración de Igs es mayor en el calostro que en la leche debido principalmente a que una de sus funciones principales es la de proporcionar protección inmunológica a la cría vía calostro (Walzem et al. 2002). Al mismo tiempo, las Igs contribuyen a las propiedades antimicrobianas naturales de la leche (Marnila y Korhonen, 2003).

2.5.2.5. Proteosas peptonas

Es la fracción de las proteínas de la leche que no precipitan por calentamiento a 95°C durante 30 minutos seguida de acidificación a pH 4,6 (Veisseyre, 1988). Precipitan con ácido tricloroacético al 12% y contienen pequeñas concentraciones de residuos de aminoácidos aromáticos y azufrados (Morr y Ha, 1993; Walstra et al., 2006).

Esta fracción está compuesta por 4 productos mayoritarios (denominados 3, 5, 8 rápido y 8 lento) y otros componentes minoritarios.

La proteosa peptona 3 (PP3) o también llamada lactoforina es una fosfoglicoproteína estable al calor que se encuentra únicamente en el suero y no está asociada a las caseínas. La caprina se compone de 136 aminoácidos con un masa molecular de 15.194 Da para la apoproteína y 2 sitios de fosforilización (a diferencia de la bovina que tiene 135 aminoácidos, 15.304 Da y 5 sitios de fosforilización) (Haggarty, 2003). Su origen se asocia a la membrana del glóbulo graso (Girardet y Linden, 1996; Haggarty, 2003). Es una proteína con una gran actividad superficial debido en parte a su bajo peso molecular y al carbohidrato que tiene asociado (Swaisgood, 1982). La PP3 posee excelentes propiedades emulsionantes y espumantes, y la habilidad de inhibir la lipólisis en la leche. Desde el punto de vista biológico, parece tener, entre otras, una función de defensa antimicrobiana y estimular el crecimiento de bifidobacterias (Haggarty, 2003)

El resto de los componentes principales (PP5, PP8 rápido y PP8 lento) derivan de la proteólisis de la β -caseína (Haggarty, 2003). La proteosa peptona 5, con un peso molecular de 13.000 Da, está asociada con el suero y con la fracción caseínica de la leche. Las proteosas peptonas 8 rápida y lenta tienen un peso molecular de 3.900 y 9.900 Da respectivamente. Como a pH neutro una parte considerable de las proteosas peptonas está en las micelas de caseína, el suero dulce no contiene nunca la totalidad de esta fracción, pero el suero obtenido por acidificación de la leche contiene todas las proteosas peptonas (Walstra et al., 2006).

2.5.2.6. Glicomacropéptido

El glicomacropéptido (GMP) o también llamado caseinomacropéptido (CMP) es una molécula proteica que proviene de la hidrólisis de una de las caseínas.

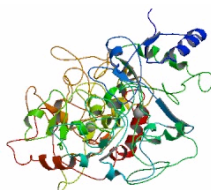
Durante la fabricación quesera, la cuajada se forma en respuesta a la acción de la enzima quimosina, la cual ataca a la κ -caseína de la superficie de la micela de caseínas, provocando la liberación de la κ -paracaseína y el GMP (Walzem et al., 2002). El GMP es una molécula de 64 aminoácidos procedente del extremo C-terminal de la κ -caseína y que constituye, aproximadamente, el 20% de la fracción proteica del suero dulce (Walzem et al., 2002; Jelen, 2003). No aparece en los sueros ácidos, a menos que se incluyan enzimas en la fabricación de quesos frescos (Jelen, 2003).

Su peso molecular depende del pH y varía entre 6000 y 8000 Da a bajos pH, mientras que a $\text{pH} > 4$ puede polimerizarse hasta alcanzar pesos moleculares de ~ 50.000 Da (Riera et al, 1996a).

Su actividad fisiológica depende de su glicosilación. Sus funciones son muy variadas: evita la fijación de bacterias al intestino, es capaz de estimular el sistema inmunológico, actúa de prebiótico promoviendo las bifidobacterias, inhibe la agregación plaquetaria, puede suprimir el apetito al estimular la secreción de la hormona pancreática colecistoquinina y altera la producción de pigmento por los melanocitos (Riera et al., 1996a; U.S.D.E.C., 2004a).

2.5.2.7. Otras proteínas

La lactoferrina es una glicoproteína de ~ 700 aminoácidos con una gran afinidad por el hierro, aunque también es capaz de unirse a otros metales como el cobre, cobalto, zinc y manganeso. Su síntesis, que está regulada hormonalmente, tiene lugar en la glándula mamaria y en otras glándulas exógenas. Si se encuentra glicosilada es más resistente a enzimas proteolíticas (Korhonen y Marnila, 2003). La leche humana es rica en esta proteína (1,48 -2 g/l) mientras que la leche de cabra presenta cantidades entre 10 y 100 veces menor (Park, 2006). Presenta un pI elevado, lo que implica que tenga una clara tendencia a formar complejos con otras macromoléculas como ADN, BSA, agar y β -LG. Polimeriza rápidamente en presencia de iones de Ca^{+2} (Morr y Ha, 1993). Además de incrementar la biodisponibilidad del hierro, funciona como agente antimicrobiano al secuestrar el hierro impidiendo que esté disponible para las bacterias o dañando sus membranas. Se cree que es antiinflamatoria y antioxidante, que favorece el crecimiento de



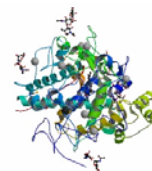
Introducción

bifidobacterias y estimula el crecimiento celular y el sistema inmune, lo que le confiere una actividad anticarcinogénica (Walzem et al., 2002; Korhonen y Marnila, 2003; U.S.D.E.C, 2004a). Se añade, principalmente, a alimentos infantiles para hacerlos más similares a la leche humana (U.S.D.E.C., 2004a).

En cuanto a sus propiedades tecnológicas no se ve afectada por la pasterización, aunque con el tratamiento UHT pierde su actividad antimicrobiana. Su presencia en alimentos con hierro y alto contenido graso es aconsejable porque parece que es capaz de proteger a los ácidos grasos insaturados contra la oxidación lipídica (Korhonen y Manila, 2003).

La leche de cabra también presenta otras proteínas minoritarias que pueden estar presentes en el suero, como son la transferrina, una proteína capaz de unirse al hierro, pero con una afinidad menor que la que posee la lactoferrina y que presenta unos niveles de 20-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en la leche de cabra; la prolactina que se encuentra en concentraciones $\sim 44 \mu\text{g}/\text{ml}$ en la leche de cabra y una glicoproteína que se une al folato, la cual es una vitamina esencial que previene la aparición de la espina bífida y otros defectos del tubo neural. Esta última proteína se encuentra en mayor concentración en la leche de cabra que en la leche de vaca (Haggarty, 2003; Tziboula-Clarke, 2003; Park, 2006).

También pueden existir otras proteínas y enzimas asociadas a la membrana del glóbulo graso, como la lactoperoxidasa (Tziboula-Clarke, 2003). La lactoperoxidasa es una enzima presente no sólo en el suero sino también en la leche, que provoca la rotura del peróxido de hidrógeno. El sistema lactoperoxidasa (formado por esta proteína y dos cofactores: peróxido de hidrógeno e iones de tiocianato) es una parte importante de la actividad antimicrobiana de la leche, por lo que se ha sugerido su uso como agente conservador natural (Walzem et al., 2002; U.S.D.E.C., 2004a).



2.5.3. LÍPIDOS

La leche de cabra contiene 97-99% de lípidos libres y 1-3% de lípidos ligados a otras sustancias (Park, 2006).

Los lípidos libres están constituidos por triglicéridos o triacilgliceroles, diglicéridos o diacilgliceroles y monoglicéridos o monoacilgliceroles, mientras que los lípidos ligados lo constituyen lípidos neutros (principalmente triglicéridos) y lípidos polares (fosfolípidos y glicolípidos) (Tabla 5).

Tabla 5: Distribución cuantitativa de lípidos en la leche de cabra

LÍPIDOS	% del total lipídico
Lípidos libres	97 - 99 %
Triglicéridos	96,8%
Diglicéridos	2,2%
Monoglicéridos	0,9%
Lípidos ligados	1 - 3 %
Lípidos neutros	46,8%
Glicolípidos	8,5 %
Fosfolípidos	44,7%

Fuente: Park (2006)

Prácticamente toda la materia grasa de la leche se encuentran en los glóbulos grasos (Walstra et al., 2006) siendo el diámetro medio de los glóbulos grasos de la leche de cabra (2,76 μ m) menor que los de la leche de vaca (3,51 μ m) (Tziboula-Clarke, 2003). El pequeño tamaño de los glóbulos implica una mejor dispersión y una mezcla más homogénea de la grasa en la leche, aunque presente una peor capacidad para desnatarse (Park, 2006). Además los glóbulos grasos de la leche de cabra no experimentan coalescencia a temperaturas de refrigeración por la ausencia de la aglutinina, que es la responsable de la agregación de los glóbulos grasos en la leche de vaca (Tziboula-Clarke, 2003).

Los lípidos presentes en el suero están asociados con la membrana del glóbulo graso (Walzem et al., 2002) y los fosfolípidos son los principales lípidos de dicha membrana (Walstra et al., 2006). Sin embargo, los triacilgliceroles son los principales lípidos en los CPS, seguido por los fosfolípidos, diacilgliceroles, ácidos grasos libres, ésteres de colesterol, colesterol y monoacilgliceroles (Vaghela y Kilara, 1996b), lo cual puede ser consecuencia de la presencia en el suero de pequeños glóbulos grasos (De Wit et al., 1986).

La concentración de lípidos en el suero es baja (Walzem et al., 2002). Suele ser de 0,5-1%, aunque depende del tipo de leche, del tipo de queso y de la eficiencia en el proceso de fabricación quesera (Jelen, 1992). En la mayoría de quesos ácidos como el cottage o el quark es casi insignificante el contenido lipídico debido a que el tipo de leche usada es normalmente desnatada (Scott, 1991; Jelen, 1992).

Introducción

La composición en ácidos grasos de los lípidos de la leche caprina (tabla 6), y por lo tanto del suero, se caracteriza principalmente por presentar altos niveles de ácidos grasos saturados de cadena corta (C4:0 -C12:0), principalmente ácido caproico (C6:0), ácido caprílico (C:8:0) y ácido cáprico (C:10:0), que se encuentran en mayor proporción que en la leche de vaca, debido a una polimerización diferente del acetato producido por las bacterias del rumen (Tziboula-Clarke, 2003).

Tabla 6: Composición de ácidos grasos de lípidos totales de la leche de cabra, vaca y humana (g/100g de grasa)

ÁCIDOS GRASOS	Leche de Cabra	Leche de Vaca	Leche Humana
4:0	2,6-4,8	2,5-6,2	-
6:0	1,7-3,0	1,5-3,8	Tr
8:0	1,5-3,6	1,0-1,9	Tr
10:0	6,4-11,1	2,1-4,0	1,3
10:1	Tr	Tr	Tr
12:0	2,5-5,0	2,3-4,7	3,1
12:1	Tr	Tr	Tr
13:0	Tr	Tr	Tr
13:1	Tr	Tr	Tr
14:0	8,5-11,2	8,5-12,8	5,1
14:1	Tr	0,6-1,5	Tr
15:0	Tr	Tr	Tr
15:1	Tr	Tr	Tr
16:0	24,6-38,4	24,0-33,3	20,2
16:1	0,7-1,7	1,3-2,8	5,7
17:0	Tr	Tr	Tr
18:0	5,9-14,9	6,2-14,6	6,0
18:1	15,6-28,2	19,7-31,2	46,4
18:2	1,8-4,0	1,5-5,2	13,0
18:3	Tr	1,8	1,4

Fuente: Adaptada de Park (2006)

Tr: Trazas

Muchos autores los consideran responsables del característico "sabor a cabra" (Tziboula-Clarke, 2003), aunque otros lo relacionan con la fracción de ácidos grasos libres (Park, 2006).

En los lípidos del lactosuero, tanto ácido como dulce (tabla 7), la fracción que se encuentra en mayor proporción ($\geq 66\%$) es la de los ácidos grasos saturados, seguida de la de los ácidos grasos monoinsaturados ($\sim 29\%$), y en último lugar la de los ácidos grasos poliinsaturados, que presenta la menor concentración.

Tabla 7: Composición en ácidos grasos de los lípidos del lactosuero.

	Suero dulce ^{a,b}		Suero ácido ^a
SFA	66,86	66,90	66,28
MUFA	29,61	29,70	29,07
PUFA	3,52	3,40	4,65

Fuente: ^aU.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service (2004); ^bSaxholt et al. (2009)

SFA: Ácidos grasos saturados; MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados.

En relación al contenido de colesterol, es menor que en otras especies y que en la leche humana (Park, 2006).

2.5.4. MINERALES

Los minerales constituyen el tercer componente mayoritario del contenido sólido total del suero (Jelen, 1992). Aunque el contenido en sales suele ser bastante constante, su composición mineral varía en función del tipo de suero obtenido, y depende de otros factores relacionados con los métodos de fabricación quesera empleados, especialmente de la adición a la leche de cloruros de sodio o de calcio (Scott, 1991; Jelen, 1992). Sin embargo las diferencias principales entre ambos tipos de suero se deben a la distinta manera de producir la coagulación de las caseínas (Jelen, 1992).

Los sueros ácidos presentan mayor contenido en calcio y fósforo debido a la solubilización del fosfato cálcico coloidal de las micelas de caseína durante la acidificación; sin embargo en los sueros dulces no se produce la separación del calcio de las micelas, por lo que la mayoría del calcio permanece retenido en el queso y no se

Introducción

pierde en el suero (Renner, 1992; Jelen, 1992). Los sueros ácidos son también más ricos en magnesio y zinc (Renner, 1992; Walzem, 2004) y citrato (Morr y Ha, 1993).

Los principales macrominerales en la leche de cabra son el calcio, fósforo, potasio y cloro, con un contenido mayor que en la leche de vaca, y sobre todo, con relación a la leche humana (Park, 2006) El calcio parece ser importante en términos de estabilidad al calor, mientras que el sodio y potasio son responsables del sabor salado, y junto con la lactosa de la osmolaridad del suero (Jelen, 1992).

Durante el procesado del suero se puede alterar la concentración de minerales, al poder disminuir su contenido mediante electrodiálisis, nanofiltración o intercambio iónico (Walzem, 2004). Durante la ultrafiltración (UF) los minerales unidos a las proteínas (por ej. calcio, fósforo, magnesio) se retienen en la membrana y se concentran junto con ellas, mientras que los solubles (sodio, potasio, citrato) pasan al permeado (Renner, 1992).

2.5.5. VITAMINAS

La riboflavina (B_2) es la vitamina más abundante del suero. Es una proteína soluble en agua, estable al calor y sensible a la luz. Es la responsable del color verdoso del suero. Puede ser retenida mediante ósmosis inversa, pero no a través de las membranas de UF por lo que los permeados de UF pueden tener también este color (Jelen, 1992).



La leche de cabra, y por lo tanto en el suero, presenta cantidades mayores de vitamina A que la leche de vaca, porque la cabra convierte todo el β -caroteno en vitamina A, mientras que posee deficiencias en ácido fólico y vitamina B_{12} si se compara con la leche de vaca. Ambas leches son deficientes en piridoxina (B_6), vitamina C y D (Park, 2006)

Las vitaminas hidrosolubles que están presentes en la leche permanecen en el lactosuero en proporciones variables: 40-70% de la vitamina B_{12} , 55-75% de la B_6 y ácido pantoténico, 70-80% de la riboflavina y biotina, 80-90% de la tiamina, ácido nicotínico, ácido fólico y ácido ascórbico. La concentración de vitamina C se reduce durante el procesado, por lo que el suero no se considera una buena fuente de esta proteína. De todas las vitaminas liposolubles, la más abundante es la A (Renner, 1992; Walzem, 2004). Durante la UF las vitaminas liposolubles se retienen en el concentrado al separarse con los lípidos, mientras que de las vitaminas solubles, sólo se retiene el ácido fólico y la vitamina B_{12} (Renner, 1992; Walzem, 2004).

3. TECNOLOGÍA DE APROVECHAMIENTO DEL LACTOSUERO

Para reducir el alto poder contaminante que posee el lactosuero y sobre todo por las propiedades funcionales y nutritivas que ofrece (ver apartados 4 y 5), se ha visto que la recuperación de los componentes sólidos del suero lácteo es muy importante, por lo que la solución más ventajosa, para resolver este problema ecológico y aprovechar esta funcionalidad, es procesar el suero para la obtención de productos alimenticios y farmacéuticos (Ostojic et al., 2005; Bonnaillie y Tomasula, 2008). En la figura 3 se recogen los principales tratamientos y los productos obtenidos a partir del lactosuero:

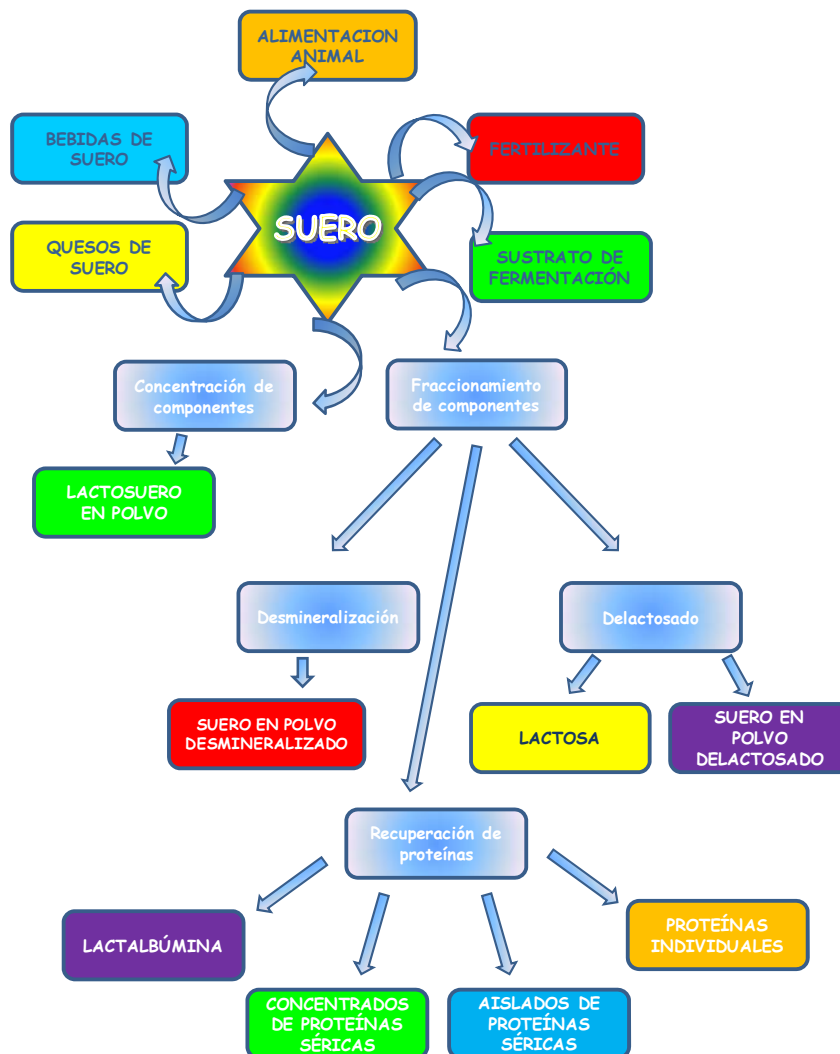


Figura 3: Esquema del procesado del lactosuero y los productos obtenidos

Introducción

La mayoría del suero se procesa como lactosuero en polvo. En el año 2000 la Unión Europea y Estados Unidos produjeron 1,8 millones de toneladas de suero en polvo, 400.000 toneladas de suero en polvo desmineralizado, 109.000 toneladas de CPS con 35% de proteína, y 16.500 toneladas de aislados de proteínas séricas (APS o WPI) con 80% de proteína (Foegeding y Luck, 2003).

3.1. TRATAMIENTOS PREVIOS

Tras el corte de la cuajada, el suero drenado contiene finos de caseína, lípidos, ácido láctico, minerales, microorganismos y otros componentes de la leche que no han sido retenidos en la cuajada, por lo que se suele realizar una serie de tratamientos (eliminación de finos, desnatado y tratamiento térmico) previos a su posterior utilización (Smith, 2004).

Para la eliminación de los finos o partículas de caseína aún presentes en el suero se puede realizar un tamizado y/o centrifugación. Estos finos, si se separan inmediatamente, pueden recircularse de nuevo a la cuba de quesería para retornar a la fabricación del queso (Madrid, 1981; Smith, 2004). La eliminación de los finos es necesaria porque la turbidez de muchos productos con suero se debe a estas partículas de caseína (Jelen, 1992).

A continuación, se puede realizar un desnatado o separación de la grasa del suero mediante centrifugación. El producto obtenido tras eliminar los lípidos se conoce como la nata del lactosuero, y se puede utilizar para la fabricación de mantequilla o nata (Madrid, 1981; Smith, 2004). El rendimiento normal de este proceso es de unos 13,6 Kg de mantequilla por cada 4.500 litros de suero (Scott, 1991). La eliminación tanto de la grasa como de los finos mejora la calidad del suero (Smith, 2004).

El suero también puede tener presentes microorganismos que participan en la fabricación quesera y son los responsables de transformar la lactosa en ácido láctico. Esta fermentación es indeseable en el lactosuero, por lo que para evitarla se suele o bien pasteurizar inmediatamente el suero o incluso se enfría a una temperatura por debajo de 7°C, para parar la producción de ácido, y luego se pasteuriza. El tratamiento térmico mínimo y más común es el de 72°C durante 15 segundos, y asegura la eliminación de patógenos, la inactivación de los cultivos iniciadores y de otras bacterias que puedan estar presentes en el suero (Smith, 2004). Si se pretende conservar el suero durante un período de 24 horas, éste es sometido a un enfriamiento a unos 4°C, mientras que si se prevé un almacenamiento más largo, se

debe pasteurizar y enfriar, o combinar el uso de conservantes (como el peróxido de hidrógeno) con un enfriamiento a 4°C, para evitar o minimizar la desnaturalización proteica como consecuencia del tratamiento térmico (Madrid, 1981).

Un tratamiento previo adecuado para el suero incluye: filtración, pasteurización, separación de la grasa y enfriamiento en la industria láctea en un período de 1 hora tras su producción (Philippopoulos y Papadakis, 2001).

Tras la pasteurización y la eliminación de los finos y grasa, el suero está preparado para su conversión en diversos productos mediante diferentes tratamientos (Smith, 2004).

3.2. USO DIRECTO

3.2.1. ALIMENTACIÓN ANIMAL

Una de las principales alternativas a emplear el suero en la cadena alimentaria humana, es la utilización del mismo para la alimentación animal, sobre todo en rumiantes y cerdos (Jelen, 2003, U.S.D.E.C., 2004a; Smithers, 2008). Para alimentar a los cerdos se recomienda no administrar más de 12-15 litros de suero, mientras que las cerdas reproductoras presentan una gran necesidad de vitamina B, de manera que el suero les aporta cantidades suficientes de vitamina B₂ y ácido pantoténico, pudiendo ingerir hasta 15-25 kg/día. Los terneros, por el contrario, hasta que no tienen 4 meses no son capaces de ingerir 10-15 kg/día, y el uso de suero es beneficioso, por lo menos hasta que tienen 15 meses (Veisseyre, 1988; Westergaard, 2010).



El uso directo del suero como alimento animal es únicamente posible cuando la granja y la quesería están cerca, porque un transporte demasiado largo del suero sin tratar conduce a un crecimiento microbiano, por lo que en muchos casos, resulta más fácil deshidratar el suero para conservarlo más tiempo, conseguir concentraciones de sólidos más constantes y evitar las variaciones estacionales.

3.2.2. FERTILIZANTE

Rociar los pastos y campos con suero es una práctica habitual en algunas zonas rurales que aprovechan el poder fertilizante del suero, suponiendo un beneficio tanto para la industria quesera como para el granjero (Jelen, 1992; Westergaard,

Introducción

2010). El suero aporta nutrientes y agua para promover el crecimiento de plantas (Morr, 1992b).

La cantidad de suero que se puede usar como fertilizante depende del pasto y de la lluvia, pero está limitada a 45-90 toneladas/acre o 7m³/ha/día. Si se exceden los límites, podría causar problemas de salinidad y acidez excesivas (Radford et al., 1986; Morr, 1992b; Westergaard, 2010).

3.2.3. QUESOS DE SUERO

La elaboración de queso a partir de suero es una técnica antigua que se emplea en todo el mundo (Scott, 1991) generalmente siguiendo una elaboración tradicional y a pequeña escala (Pintado et al., 2001).

Es una de las formas más directas de recuperación de las proteínas séricas, las cuales acompañadas de cierta grasa residual, se desnaturalizan y coagulan tras la aplicación de un tratamiento térmico (Philippopoulos y Papadakis, 2001). Como regla general, si se calienta el suero a más de 70°C a pHs por debajo de 3,9, las proteínas séricas precipitan y, para que esta precipitación sea completa, el suero debe calentarse al menos hasta valores de 90°C y mantenerlo a esta temperatura durante varios minutos (Jelen, 1992).

Los quesos de suero reciben diferentes nombres en función del país y de la región donde se produzcan: en España se denomina Requesón; en Noruega, Mysost Primost, Gjestost o Grubransdalsost; en Portugal, Requeijão; en Italia, Ricotta; en Francia, Serac, Brousse, Broccio, Greuil; en Grecia, Manouri, Myzithra, Anthotyros; en Suiza, Schottenziegr, Hudelziger, Mascarpone; en Israel, Urda; siendo el Ricotta el más importante y más conocido suero de queso del mundo (Pintado et al., 2001), junto con el Mysost (Jelen, 2003). Los quesos de suero son significativamente diferentes unos de otros, en cuanto su composición química debido principalmente a las variaciones en el origen y el tipo de suero, así como a la forma de elaboración (Pintado et al., 2001).



Estos quesos se elaboran con sueros tanto de origen ovino como caprino y bovino. En los países mediterráneos se basan normalmente en suero ovino debido a la importancia económica de estos rumiantes en esta zona y por su mayor contenido proteico que los sueros caprinos y bovinos, los cuales tienen un menor rendimiento quesero (Pintado et al., 2001). Este tipo de quesos se caracteriza por presentar una buena digestibilidad, ser ricos en proteínas y un alto valor nutritivo, porque contienen

todos los aminoácidos esenciales (especialmente metionina y cisteína) en cantidades suficientes para cubrir las necesidades humanas (Kalantzopoulos, 1993).

Aunque la elaboración de este tipo de productos es diferente según la variedad de queso, de forma general, se puede describir de la siguiente forma: el suero sólo o con adición de leche o nata, se calienta directamente, apareciendo las primeras partículas coaguladas a 80-85°C, continuando el tratamiento térmico hasta valores de 85 y 95°C. La cuajada debe permanecer unos minutos a estas temperaturas para reducir el contenido de humedad e incluso producir un pardeamiento, si se desea. A continuación se traslada a moldes, donde permanecen durante aproximadamente 4 horas a temperatura ambiente para permitir el drenaje. Tras este período el queso se almacena a 4°C (Pintado et al., 2001). En algunos casos se añaden sales o ácidos orgánicos previamente, sobre todo para sueros dulces con pH > 6 que requieren una acidificación parcial o en aquéllos con un bajo contenido en calcio que presentan menos capacidad de precipitación (Jelen, 1992; Kalantzopoulos, 1993; Pintado et al., 2001)

Los métodos tradicionales de elaboración apenas requieren más utillaje que una cuba que permita el calentamiento para provocar la precipitación de las proteínas séricas, mientras que existen métodos más sofisticados que incluyen equipos para la concentración por evaporación de la mezcla de suero y otros componentes antes del cuajado (Scott, 1991).

3.2.4. BEBIDAS DE SUERO

Las bebidas de suero junto con los quesos de suero constituyen dos tipos de alimentos tradicionales que permiten el uso directo del suero a pequeña escala (Jelen, 2003).

De forma general este tipo de bebidas no han tenido mucho éxito entre los consumidores modernos, salvo ciertas excepciones, como es el Rivella, refresco carbonatado de origen suizo y producido desde 1950, con un sabor agridulce y un pH ácido de 3,7, que contiene solamente un 33% de suero modificado y el resto es agua, aunque esta bebida en su publicidad se vende como "el placer natural con lactosuero".



Actualmente se venden tres variedades de esta bebida: la versión original, la baja en calorías y otra variedad aromatizada con extractos de té verde (De Wit, 2003; Jelen, 2003; Smithers, 2008). El sabor "desagradable" del suero crudo puede explicar la falta de aceptación de este tipo de productos. Otros países europeos, como Finlandia,

Introducción

Austria y Holanda, también han tenido en el mercado productos similares que han tenido éxito durante algún tiempo, incluso se comercializaron bebidas con suero para ocasiones especiales, como por ejemplo "la bebida oficial de los juegos olímpicos de Sarajevo de 1984", sin embargo los intentos por desarrollar un mercado internacional con este tipo de productos han fallado (Jelen, 2003).

Hoy en día las bebidas que más se acercan al concepto de bebida de suero, son aquellas que resultan de la combinación del lactosuero con zumos de frutas, especialmente cítricos que son muy compatibles con el sabor característico del suero o bebidas de yogurt con suero (Jelen, 2003).

3.2.5. SUSTRATO DE FERMENTACIONES

El suero posee un alto contenido de lactosa, que puede ser usado como sustrato para fermentaciones microbianas, obteniéndose no sólo productos alimenticios, sino también productos no comestibles (Jelen, 2003).

Se puede obtener alcohol de grado industrial o alimentario, bebidas alcohólicas, siendo uno de los mejores ejemplos el licor de crema irlandés Bailey´s o la mayoría de licores neozelandeses. No obstante el uso del suero crudo para la producción de otras bebidas, como vino o cerveza, no ha tenido el éxito esperado, ya que entre otras razones la lactosa no es fermentada por todos los microorganismos sino experimenta una serie de tratamientos previos (Jelen, 2003). Durante el período de escasez en la segunda guerra mundial, en Alemania se produjo cerveza de suero (Jelen, 1992). Se utiliza también para la producción de antibióticos, ácido láctico, bacteriocinas (nisina), para propagar los cultivos iniciadores lácticos en la fabricación de queso, como sustrato para la producción de biomasa empleada en alimentación animal y para generar biogás, una fuente de energía renovable (Jelen, 2003).



3.3. CONCENTRACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES: LACTOSUERO EN POLVO

La tecnología más simple para convertir el suero en un producto industrial valioso es la deshidratación o secado que permita eliminar la mayoría del contenido acuoso (93-94%) y obtener así lactosuero en polvo (Jelen, 1992; 2003), ya que se consigue, en un volumen reducido, un producto nutritivo de gran interés.

El procesado tradicional consiste en la concentración en evaporadores de efectos múltiples a vacío hasta un contenido sólido total entre 40-70%, seguido de una cristalización de la lactosa con el fin de que este disacárido se transforme en su



forma cristalina a monohidratada, y de este modo, poder minimizar sus efectos de higroscopicidad (es decir reducir su absorción de agua), y finalmente una deshidratación mediante secado por atomización (Morr, 1992a; Jelen, 2003). Se puede realizar una pasterización previa a la concentración (U.S.D.E.C., 2004a). También se puede aplicar ósmosis inversa para preconcentrar el suero previo a la evaporación. La concentración del suero por esta técnica está limitada por la viscosidad del retenido, por este motivo la ósmosis inversa no puede reemplazar por completo a la evaporación (Pearce, 1992a).

3.4. FRACCIONAMIENTO DE COMPONENTES

El suero líquido, independientemente de si proviene de la elaboración de queso o de industria de las caseínas, no proporciona un buen balance de nutrientes porque contiene grandes cantidades de lactosa, baja cantidad de proteínas y muy poca grasa (si se separa previamente). Esta bajo porcentaje de proteínas no permite la expresión de sus propiedades funcionales, y el alto contenido de sales y lactosa del suero lo hace inadecuado para muchas aplicaciones alimentarias. De este modo, para conseguir aumentar su potencial como ingrediente funcional en alimentos, se han desarrollado numerosas técnicas que permiten la desmineralización y delactosado del suero y otras que favorecen la concentración de las proteínas séricas con relación a los componentes no proteicos (Pearce, 1992b; Zayas, 1997). Dentro de estas técnicas, la tecnología de separación por membranas es la más importante.

Los procesos de separación de membranas se aprovechan para concentrar o fraccionar un líquido, que se hace pasar a través de una membrana semipermeable, tras crear un gradiente de presión (que actúa como la fuerza conductora) y separa el fluido con partículas en dos corrientes de diferente composición (Smith, 2004; Lewis, 2008; Onwulata 2008): el retenido y el filtrado.

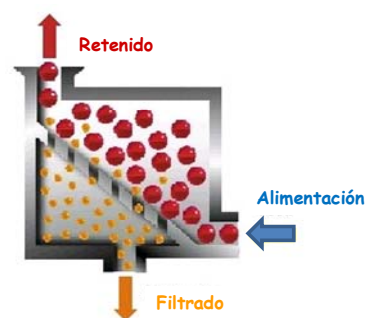


Figura 4: Esquema del proceso de filtración

Introducción

✓ Retenido o concentrado: contiene aquellas moléculas más grandes que no son capaces de pasar a través de la membrana.

✓ Permeado o filtrado: es la corriente líquida que contiene las moléculas que si son capaces de atravesar la membrana por efecto de la presión.

Esta tecnología es particularmente ventajosa, porque no expone el suero a temperaturas mayores de 55°C, no daña ni desnaturaliza las proteínas, ni degrada los nutrientes del suero, y permiten la producción de concentrados de proteína séricas (CPS) entre 34 y 90% de proteína (Onwulata, 2008; Smith, 2004). La filtración permite separar o concentrar los componentes del suero usando membranas de distinto tamaño de poro, de manera que se basa principalmente en el tamaño molecular y, en menor medida, en la forma y la carga (Smith, 2004; Lewis, 2008).

Se pueden distinguir cuatro procesos principales: ósmosis inversa (OI), nanofiltración (NF), ultrafiltración (UF) y microfiltración (MF).

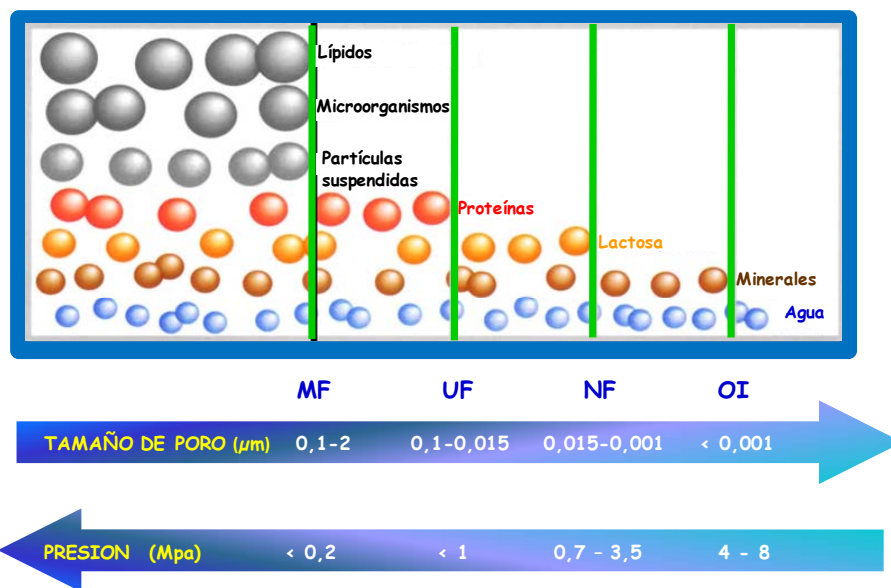


Figura 5: Separación de los componentes de la leche
(Glover, 1985; Mistry y Maubois, 1993; Rosenberg, 1995; Nelly, 2003)

La figura 5 muestra la separación de los componentes de la leche que poseen los distintos procesos de membrana según el tamaño de las moléculas, el diámetro de poro de las membranas y las presiones de trabajo utilizadas.

La diafiltración (DF) es una modificación de la ultrafiltración en la que el retenido se diluye con agua para concentrar en mayor grado los compuestos que no son capaces de atravesar la membrana. La electrodiálisis (ED) puede ser también considerada como un proceso de membrana bajo la aplicación de un campo eléctrico en vez de la presión.

3.4.1. DESMINERALIZACIÓN

Para conseguir que el suero sea un ingrediente más adecuado para su utilización en diferentes alimentos, sobre todo en fórmulas infantiles y helados, es necesario reducir el contenido mineral (Burling, 2003). Por regla general, el suero contiene 8-15% de sales minerales del contenido sólido total (Burling, 2003; Jelen, 1992; 2003), y se necesita una reducción del 90-95% para poder utilizarlo en alimentos infantiles, de forma que imite la composición mineral de la leche humana y siendo especialmente importante disminuir la cantidad de P, Cl, K y Na. Para la elaboración de helados se necesita disminuir el contenido mineral en un 50-70% para evitar la aparición de sabores salados (Burling, 2003).

Los métodos más aplicados para conseguir la desmineralización son la electrodiálisis, diafiltración y el intercambio iónico, aunque también se puede usar una nanofiltración para una desmineralización parcial previa a la desmineralización total por intercambio iónico o electrodiálisis (Burling, 2003; Kelly, 2003; U.S.D.E.C., 2004a).

3.4.2. RECUPERACIÓN DE LACTOSA Y OBTENCIÓN DE SUERO DELACTOSADO

La lactosa se puede obtener a partir del lactosuero o del permeado de UF (un coproducto de la producción de CPS) (U.S.D.E.C., 2004b).

En primer lugar se concentra el lactosuero o el permeado de UF por evaporación para sobresaturarlos de lactosa, produciendo a continuación su cristalización (Smith, 2004; U.S.D.E.C. 2004b). La lactosa presenta una baja solubilidad, por lo que al concentrar el contenido sólido del suero hasta valores de 36-38% y enfriarlo, se forman cristales de lactosa. Esta cristalización es la base de la obtención de la lactosa, siendo éste el método tradicional de recuperación de este disacárido de sueros muy concentrados (típicamente de 65-70% de contenido sólido), sin o con una eliminación previa de las proteínas séricas (Jelen, 1992; Smith, 2004), porque la cristalización no desnaturaliza las proteínas (Smith, 2004). Los cristales obtenidos se separan por centrifugación del suero (delactosado). A continuación se

Introducción

pueden secar o se refinan y se secan. Finalmente se someten a una molienda y tamizado para logran diferentes tipos de lactosa que difieren en el tamaño de las partículas, variando desde lactosa superfina a cristales más gruesos (Jelen, 1992, U.S.D.E.C., 2004b).

El suero delactosado puede concentrarse y/o deshidratarse para obtener un producto en polvo (U.S.D.E.C., 2004a; Pesta et al., 2007).

3.4.3. TECNOLOGÍA PROTEICA

Las técnicas que permiten concentrar las proteínas séricas en relación a los componentes no proteicos del suero, y poder, de este modo, explotar las propiedades de las proteínas séricas, se pueden dividir en 2 categorías: la recuperación de proteínas séricas que permite concentrar las proteínas séricas sin selectividad aumentando el contenido proteico del lactosuero (obtención de lactalbúmina y de concentrados y aislados de proteínas séricas) y el fraccionamiento proteico del lactosuero para la separación individual o de grupos de moléculas proteicas. En la mayoría de los casos, la recuperación precede al fraccionamiento (Pearce, 1992b; Bonnaillie y Tomasula, 2008).

3.4.3.1. Lactalbúmina

El procedimiento más sencillo para el aislamiento de la fracción proteica del suero consiste en la obtención de la lactalbúmina, que es una mezcla de proteínas recuperadas mediante precipitación después de un tratamiento térmico intenso (más de 90°C y 10 minutos) y a pH ácido (< 3) con lo que la fracción de proteínas solubles se desnaturaliza de manera irreversible y precipita (Riera et al., 1996b). El precipitado obtenido se separa por decantación y centrifugación, se lava para eliminar el exceso de sales y lactosa. Se vuelve a centrifugar para recuperar el producto y finalmente se deshidrata (Pearce, 1992b).

Este tipo de técnica de separación aprovecha el hecho de que la mayoría de las proteínas séricas presentan una estructura globular que puede ser fácilmente desnaturalizada a temperaturas por encima de 65°C. Además es necesario ajustar las propiedades físicas para conseguir la insolubilidad, ya que las proteínas a pHs próximos al pI y con baja fuerza iónica, tienen más posibilidades de agregarse. Esta práctica es útil en la queserías donde el precipitado obtenido se añade de nuevo a la cuba para aumentar los rendimientos queseros. Sin embargo, la lactalbúmina como consecuencia del drástico tratamiento térmico que experimenta, pierde prácticamente todo su valor desde el punto de vista funcional, debido a los cambios

conformacionales que experimenta la proteína (Jelen, 1992; Pearce, 1992b; Riera et al., 1996b; Etzel, 2004). Este hecho condicionando su uso a exclusivamente alimentario (Castillo et al., 1996), sobre todo en productos donde sea necesario enriquecer el contenido proteico y no sean muy importantes las propiedades funcionales, como por ejemplo en galletas y productos horneados (Pearce, 1992b).

La lactalbúmina se caracteriza por ser insoluble en agua, estable al calor, con una gran capacidad de unir agua (Huffman y Harper, 1999) y un alto contenido proteico (78-90%) (Huffman y Harper, 1999; Walstra et al., 2006). Debido a su baja insolubilidad en agua, se ha limitado su aplicación, y apenas se emplea (Fox, 2001).

3.4.3.2. Fracciones de proteínas individuales

El fraccionamiento, a diferencia de la concentración, divide la mezcla de proteínas en diferentes porciones, cada una de las cuales presenta distintas cantidades de cada proteína comparada con la solución de partida (Etzel, 2004).

Existen muchas técnicas para la separación de las proteínas del suero que aprovechan diferentes características de las proteínas (Bonnaillie y Tomasula, 2008).

- ✓ Su capacidad de desnaturalizarse: adición de sales, tratamiento térmico y ajuste de pH.
- ✓ Su naturaleza iónica: electroforesis, cromatografía de intercambio iónico.
- ✓ Variaciones en la forma y tamaño de las proteínas: filtración de membrana, permeación en gel, cromatografía de exclusión por tamaño.
- ✓ Diferencias de polaridad: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- ✓ Reactividad química (complejación).

Kilara y Vaghela (2004) han propuesto una clasificación de los métodos de separación a pequeña escala en función de la efectividad que poseen en aislar las proteínas séricas. Para las proteínas mayoritarias, los métodos más eficientes para la α -LA son HPLC de fase reversa, HPLC de exclusión por tamaño y electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), mientras que para la β -LG son HPLC de fase reversa y electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS). Los mejores métodos para la BSA son HPLC de exclusión de tamaño y PAGE, entretanto para las Igs se prefieren PAGE-SDS y HPLC de afinidad proteica. Huffman y Harper (1999) señalan que la lactoferrina y la lactoperoxidasa se pueden preparar comercialmente por intercambio iónico, al igual que el GMP (U.S.D.E.C, 2004a).

Introducción

Si se hablan de métodos de separación a gran escala, aquellos procesos que usan altas presiones o CO_2 supercrítico son alternativas de creciente interés (Bonnaillie y Tomasula; 2008).

De forma general las técnicas que producen fracciones enriquecidas de α -LA, también generan fracciones ricas en β -LG (Huffman y Harper, 1999)

La filtración por membranas para el fraccionamiento proteico es posible si las proteínas presentan grandes diferencias de peso molecular (por ejemplo la α -LA vs. Ig G), de carga y de tamaño (Etzel, 2004).

3.4.3.3. Obtención de concentrados y aislados de proteínas séricas

Los concentrados proteicos son mezclas de proteínas en las mismas proporciones que están en el lactosuero, pero en las que se ha aumentado su porcentaje sobre extracto seco (Riera et al., 1996b; Etzel, 2004).

Los principales derivados del suero que poseen un alto contenido en proteínas séricas son los concentrados de proteínas séricas (CPS o WPC) y los aislados de proteínas séricas (APS o WPI) (Foegeding y Luck, 2003).



Los CPS se caracterizan por contener 20-80% de proteína, mientras que los APS presenta contenidos proteicos $\geq 90\%$, $< 1\%$ de lípidos y alrededor del 2% de cenizas. Por cada kg de polvo de APS producido, se necesita emplear 150 kg de suero y eliminar al menos 149 kg de agua y sólidos por diferentes procedimientos (Huffman y Harper, 1999; Foegeding y Luck, 2003; Kelly, 2003). El porcentaje de proteína que se puede conseguir en los CPS depende del contenido de lípidos residuales presentes en el suero de partida, ya que éstos se concentran junto con la proteína (Kelly, 2003).

Mientras que la lactalbúmina ya se producía en los años 40, los CPS y APS son productos más recientes, que se desarrollaron tras la introducción de las técnicas de membrana y de intercambio iónico a finales de los años 60 y principios de los 70 (Huffman y Harper, 1999).

Para conseguir aislados o concentrados de proteínas séricas se saca partido de procesos como las tecnologías de membrana, electrodiálisis, cromatografía de intercambio iónico o cristalización (Foegeding y Luck, 2003; Smith, 2004). También se suelen realizar tratamientos térmicos para inactivar los microorganismos (Foegeding y Luck, 2003). Los CPS con fines comerciales son producidos principalmente por UF y

MF, mientras que los APS se producen por adsorción en resinas de intercambio iónico seguido de lavado, elución de las proteínas adsorbidas, limpieza y regeneración de las resinas (Zayas, 1997; Onwulata, 2008).

El uso de la UF para fraccionar y concentrar el suero seguido de evaporación y secado por atomización es un proceso que se usa a nivel comercial para producir CPS (Pal, 1993b).

La aplicación de la tecnología de membranas permite obtener CPS con muy buenas propiedades funcionales: alta solubilidad (incluso a pHs ácidos), buenas propiedades espumantes, buena coagulación por calor combinado con una buena capacidad de retención de agua en estado desnaturalizado por calor (Jelen, 1992). Los CPS mantienen sus propiedades funcionales intactas, facilitando su uso en numerosos productos alimentarios (Castillo et al., 1996).

Las propiedades funcionales de los APS son incluso superiores a las de los CPS, debido al bajo contenido en lactosa, lípidos y sales, aunque los altos costes de producción limitan su elaboración (Castillo et al., 1996).

A nivel comercial se venden principalmente CPS con 35, 60 y 80% de proteína. El CPS 80% es el producto más usado y el más valorado, cuyo origen reside en la UF hasta un 20-25% de sólidos seguido de una evaporación hasta el 40 % (Písecký, 2004). CPS 35% proteína es el más barato de producir (Zayas, 1997). Para elaborar el CPS con 35% de proteína, el suero con su bajo contenido proteico (en torno a 0,7%) se concentra inicialmente por UF, obteniéndose un retenido de 3-4% de proteína y ~ 9% de extracto seco, que posteriormente se concentrará por evaporación previo a la deshidratación por atomización. Para producir CPS con mayor contenido proteico (50-80%) es necesario realizar una etapa de DF en combinación con la de UF (Kelly, 2003).

En la tabla 8 se muestra la composición de CPS y APS comerciales.

Tabla 8: Composición general (% de extracto seco) y proteica (% del total proteico) de los CPS y APS de sueros comerciales

	CPS 35% b,d,e	CPS 60% e	CPS 80% b,d,e	CPS c	CPS a	APS c,b,d,e	APS a
<i>Composición general</i>							
Proteína	34,0-36,0	60,0-62,0	80-82,0	50,0-85,0	72,0-76,6	85,0-96,0	88,6-92,7
Nitrógeno no proteico	-	-	-	-	0,93-4,6	-	0,29-0,34
Lactosa	48,0-54,5	25,0-30,0	4,0-8,0	<1	2,1-5,8	0,5-2,0	0,42-0,46
Lípidos totales	3,0-5,0	1,0-7,0	4,0-8,0	8,0-40,0	3,3-7,4	0,4-8	0,39-0,67
Fosfolípidos	-	-	-	-	-	-	0,11-0,31
Humedad	3,0-4,5	3,0-5,0	3,0-4,5	-	4,1-6,0	4,0-5,5	2,4-5,6
Cenizas	3,1-8,0	4,0-6,0	3,0-8,0	1,0-6,0	2,5-6,0	1,0-6,0	1,4-2,2
Sodio	-	-	-	-	0,15-1,7	-	0,36-0,42
Calcio	-	-	-	-	0,23-1,1	-	0,20-0,24
<i>Composición proteica</i>							
β-lactoglobulina	-	-	-	-	40,4-76,9	-	67,6-74,8
α-lactalbúmina	-	-	-	-	14,5-24,8	-	8,3-17,5
Inmunoglobulinas	-	-	-	-	3,8-15,4	-	5,9-7,5
Seroalbúmina	-	-	-	-	5,8-19,6	-	7,2-10,9

Fuente: ^a Morr y Foegeding (1990), ^b Huffman y Harper (1999); ^c Walstra et al., (2006); ^d Foegeding y Luck, (2003), ^e U.S.D.E.C., (2004a)

Hay enormes variaciones de composición entre los CPS y APS producidos en todo el mundo. Estas diferencias están relacionadas principalmente con la composición de la leche de partida y las condiciones elaboración de los quesos (Schmidt et al., 1984) junto con las diferentes condiciones y tecnologías aplicadas durante el tratamiento del suero y de los CPS. Procesos como el pretratamiento del lactosuero, grado de fraccionamiento por DF y UF, condiciones de deshidratación por atomización o los procesos de membrana alteran la composición del CPS. Incluso pequeñas variaciones en estas condiciones podrían producir grandes diferencias de las propiedades funcionales de los CPS (Morr y Ha, 1993).

No obstante, las principales diferencias entre la composición proteica, y por lo tanto en la funcionalidad, son los factores relacionados con la obtención del queso o la caseína ácida más que el procesado de CPS y APS (De la Fuente et al., 2002)

La composición de los CPS y APS se puede controlar si se utilizan tratamientos previos, fraccionamientos y otros métodos para eliminar lípidos residuales, calcio, lactosa y otros componentes de bajo peso molecular, pero las condiciones de elaboración deben de ser cuidadosamente controladas para minimizar efectos como la desnaturalización proteica, agregación e interacciones entre proteína y lactosa (Morr y Ha, 1993).

La figura 6 recoge los pasos generales para la obtención de concentrados de proteínas de lactosuero a partir de sueros dulces y sueros ácidos.

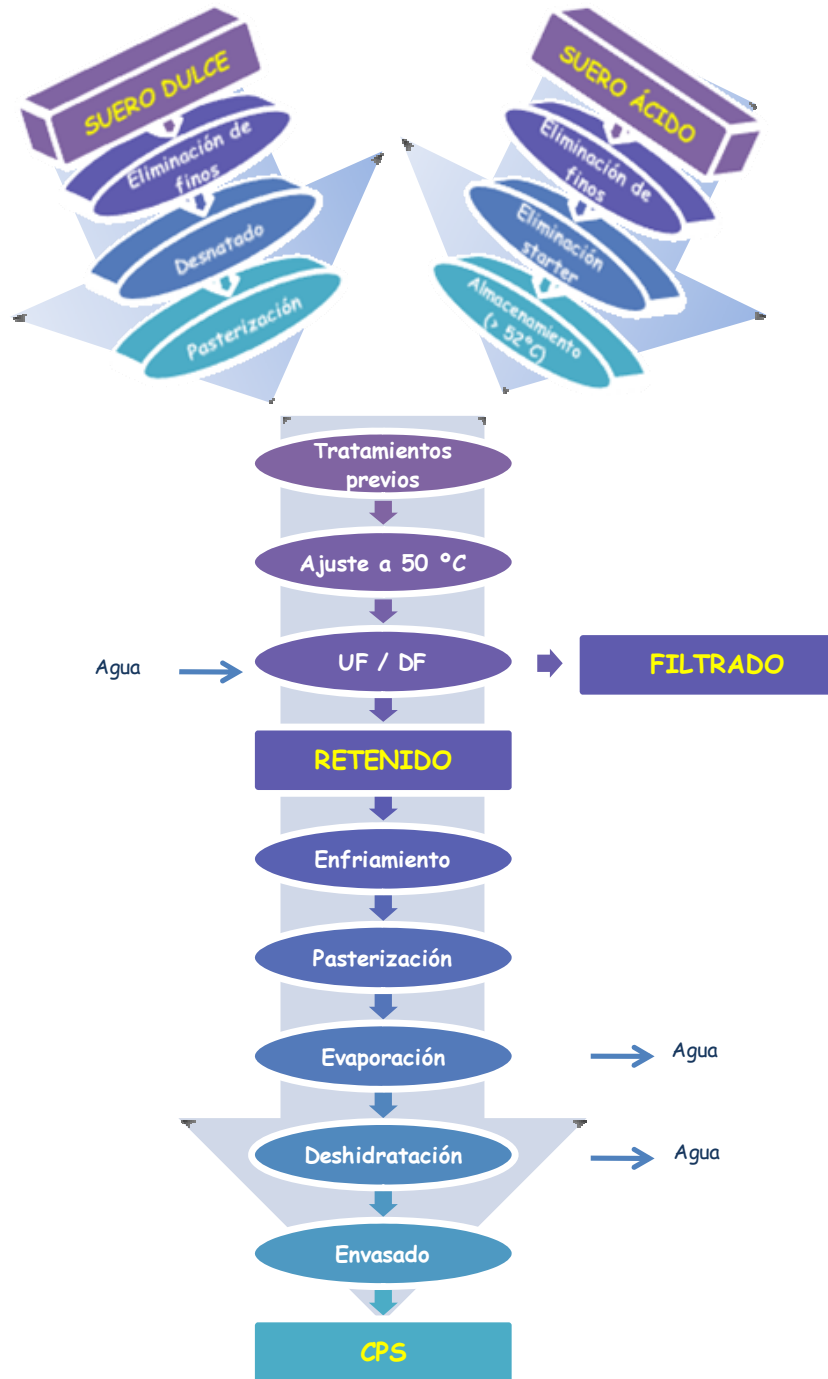


Figura 6: Diagrama de elaboración de concentrados de proteínas de suero lácteo (Adaptado de Nielsen, 1988)

A) Tratamientos previos

Tal como se describió en el apartado 3.1., antes de ultrafiltrar el suero y sobre todo para poder obtener CPS que contengan más del 75% de proteína, es necesario eliminar los finos de caseína y la grasa. Para ello se utilizan filtros rotatorios y separadoras centrífugas (Hobman, 1992).

A continuación se pasteriza para destruir aquellos microorganismos (patógenos, cultivos iniciadores y otras bacterias) que puedan estar presentes. El tratamiento térmico mínimo y más común es el de 72°C durante 15 segundos. Luego puede ser almacenado a temperaturas de refrigeración hasta que se produzca el procesado posterior (Hobman, 1992; Smith, 2004). Por el contrario los suero ácidos generalmente no se pasterizan porque este tipo de tratamiento térmico acompañado del pH natural del suero (~4,6) puede ocasionar la desnaturalización de las proteínas. En este caso, en el proceso anterior (filtración y centrifugación) se han eliminado parte de las bacterias. Se puede almacenar a temperaturas superiores a 52°C, que son suficientemente inhibitorias del crecimiento de microorganismos, evitando así la necesidad de usar pasterización, y son menos perjudiciales para las proteínas (Hobman, 1992).

El suero puede someterse a otros tratamiento alternativos como la desmineralización, el delactosado (tal como se describió en los apartados 3.4.1 y 3.4.2), modificaciones enzimáticas o eliminación de lípidos residuales no eliminados por centrifugación.

La presencia de lípidos residuales (principalmente fosfolipoproteínas) supone un efecto negativo para la funcionalidad de las proteínas séricas, sobre todo para la propiedad espumante (Pearce, 1992b). Las proteínas séricas se encuentran en bajas concentraciones en el suero, por lo que la UF se usa para poder concentrarlas, pero la presencia de estos lípidos limita el flujo de UF por sus propiedades anfóteras y anfipáticas que permiten que se adsorban con fuerza a los materiales de membrana, disminuyendo la velocidad de concentración y conduciendo a la colmatación de las membranas de UF (Pearce, 1992b; Morr y Ha, 1993). Por estos motivos es muy ventajoso eliminar las lipoproteínas mediante una prefiltración por membranas de MF previa a la UF o por agregación termocálcica según el método descrito por Fauquant et al. (1985). Este método se basa en la formación de agregados entre las lipoproteínas a través de puentes de calcio cuando el suero se somete a un tratamiento térmico moderado. Finalmente los agregados se separan por MF o por centrifugación, aunque este último método es menos eficiente que la MF (Pearce et

Introducción

al., 1991). Al separar los lípidos por MF se generan dos fracciones: el filtrado rico en proteína y el retenido rico en lípidos. Debido a un alto contenido en fosfolípidos, el retenido de MF es un buen agente emulsionante que se puede usar en la industria alimentaria o en cosmética, después de purificarlo, y probablemente, fraccionarlo (Rosenberg, 1995).

También se considera deseable estabilizar el fosfato cálcico antes de la UF, para reducir la colmatación de las membranas. Esto normalmente se consigue calentando el suero a una temperatura por encima de la usada durante la UF (típicamente 50°C), que se mantiene durante un tiempo, hasta enfriar el suero a la temperatura deseada de UF (Hobman, 1992).

El suero también podría preconcentrarse previamente a la UF (Hobman, 1992). Las ventajas de esta etapa para la producción de CPS son, entre otras, la disminución de los costes de transporte, de almacenamiento y de energía, aumentar el contenido de sólidos en CPS con baja proteína, aumentar los sólidos del permeado o filtrado y reducir la cantidad de agua que se eliminará posteriormente mediante evaporación y/o deshidratación (Nielsen, 1988).

B) Ultrafiltración

Tras la realización de estos tratamientos previos, el suero se somete a UF, para aumentar su contenido sólido total, principalmente de proteínas. Las membranas poseen un tamaño de poro mayor que las de OI o NF, entre 0,015 y 0,10 μm y separa partículas con un peso molecular entre 1 y 200 kDa (Mistry y Maubois, 1993; Rosenberg, 1995). Se retienen las macromoléculas (proteínas y grasas) mientras que a través de la membrana pasan las moléculas con bajo peso molecular (lactosa, sales, vitaminas, nitrógeno no proteico y agua).

Al retener y concentrar las proteínas, las membranas de UF se han convertido en la herramienta más útil para obtener CPS con diferentes concentraciones proteicas, de forma que cuanto mayor sea la pérdida de lactosa y sales, mayor será el contenido proteico de los CPS (Kelly, 2003; Smith, 2004).

La UF utiliza presiones de trabajo más pequeñas que la OI o la NF con presiones transmembranarias de 70-170 kPa (Kelly, 2003), siendo por regla general menores de 1 MPa (Glover, 1985; Mistry y Maubois, 1993).

Las ventajas que presenta la UF son numerosas: recuperación de casi el 100% de las proteínas séricas, manteniendo sus propiedades nativas y funcionales prácticamente intactas porque la UF se lleva a cabo a temperaturas bajas (en torno a

50°C), reducción del contenido en lactosa, requerimientos energéticos mínimos para eliminar el agua comparados con otras técnicas y combinada con la OI, la DBO del suero se puede rebajar alrededor de un 98% (Pal, 1993b).

Como la viscosidad del suero aumenta paralelo al incremento del contenido proteico, se puede diluir el retenido añadiéndole agua para continuar con la separación hasta lograr una eliminación de soluto satisfactoria y al mismo tiempo conseguir un mayor "lavado" de lactosa y minerales. Este proceso, como se señaló anteriormente (apartado 3.4) se conoce como diafiltración (DF). Se emplea para mejorar la recuperación de solutos permeables durante los procesos de UF o MF y para conseguir CPS con mayor contenido proteico y menor contenido en lactosa (Pal, 1993b; Rosenberg, 1995; Kelly, 2003; Smith, 2004).

Una de las principales limitaciones que presentan estos métodos de filtrado es la colmatación o ensuciamiento, que limita el flujo a través de las membranas semipermeables (Pal, 1993b), que ocurre cuando las sustancias a filtrar se acumulan en las membranas con el consiguiente descenso del caudal. Se pueden distinguir dos fases básicas en la disminución del flujo a través de la membrana: el fenómeno de polarización de la concentración y el ensuciamiento propiamente dicho por obturación de los poros. Aunque no están causados por el mismo fenómeno, es habitual que el primero preceda al segundo durante la filtración.

Generalmente, los solutos rechazados por la membrana se suelen depositar en su superficie en forma de una capa viscosa y gelatinosa. Cuando la concentración de solutos de la capa de gel alcanza el punto de sobresaturación, el ensuciamiento o colmatación de la membrana se inicia (Pal, 1993a). El desarrollo de un gradiente de concentración de los componentes retenidos cerca de la membrana es lo que se denomina polarización por concentración.

De hecho el suero es uno de los más notables "colmatantes" de todos los fluidos lácteos, aunque es posible tomar ciertas precauciones para evitar o por lo menos atenuar este fenómeno (Pal, 1993b):

1. El suero debería ser clarificado y desnatado antes de ser procesado para eliminar finos de caseínas y lípidos.
2. De forma general, el flujo es menor en el pI de las proteínas séricas, y es mayor a medida que el pH se desvía de este valor. Resulta muy útil para los sueros ácidos, si se combina un tratamiento térmico de 80-85°C durante 15 segundos seguido de un ajuste de pH a 3 o 7. En el caso de los sueros dulces no es necesario ajustar el pH.

Introducción

3. Las sales, particularmente el fosfato cálcico, amplifican el problema de la colmatación. La adición de agentes secuestrantes, como el EDTA, la sustitución de calcio por sodio o su eliminación por un proceso de desmineralización tienen un efecto beneficioso sobre el flujo.

La temperatura preferida de UF es la de 50°C (máximo 55°C). A estos valores se obtienen flujos aceptables, y se evitan problemas de colmatación de las membranas, crecimiento de microorganismos y desnaturalización térmica de las proteínas (Hobman, 1992). Se podría trabajar a temperaturas menores (por ejemplo 10°C), de forma que la solubilidad del calcio es mayor, por lo que sería innecesario realizar un tratamiento térmico previo a la UF, pero se reduciría el flujo a través de la membrana y el suero sería más susceptible a contaminación microbiana (Nielsen, 1988).

Para obtener productos con un contenido proteico superior de 50-60% es necesario realizar una DF tras la UF para eliminar la mayor cantidad posible de lactosa y sales minerales. Se pueden realizar varias etapas de DF (Hobman, 1992; Smith, 2004).

El retenido de UF y/o DF obtenido puede someterse más tarde a un nuevo tratamiento térmico (66-72°C durante 15 segundos), ya que las bacterias que puedan permanecer en el suero se pueden concentrar durante la UF (Nielsen, 1988).

Además del retenido, se obtiene un subproducto que es el permeado de UF que tiene un 59% mínimo de lactosa, 10% máximo de proteína y 27% máximo de cenizas. El permeado es una fuente de sólidos de origen lácteo que se obtiene por la eliminación de proteína, algunos minerales y lactosa del suero durante la UF y DF. Este permeado se pasteuriza, se concentra, se cristaliza la lactosa y se deshidrata, con lo que se obtiene un producto en polvo que se puede usar en la industria alimentaria o en la alimentación animal (U.S.D.E.C., 2004a).

C) Deshidratación

Para poder obtener un producto en polvo se lleva a cabo la deshidratación. Se puede realizar una etapa de evaporación para concentrar el retenido obtenido previamente a la deshidratación, para minimizar los costes tanto de transporte como de almacenamiento con la eliminación del agua y mejorar las propiedades físicas del producto final. Se evapora hasta 25-50% de sólidos totales. Se suelen emplear evaporadores a vacío empleando temperaturas en torno a los 50°C para evitar la desnaturalización proteica. Si durante la producción o almacenamiento de los

concentrados de proteínas séricas se produce una desnaturalización proteica, ésta puede conducir a la formación de enlaces disulfuro que pueden ser muy perjudicial conduciendo a una baja solubilidad y a una posible no funcionalidad del producto (Morr y Ha, 1993). Las condiciones del evaporador se seleccionan para minimizar el daño a las proteínas. Sin embargo esta etapa se puede evitar si se diseñan adecuadamente los equipos de UF, obteniéndose productos con un nivel de sólidos apropiado (Hobman, 1992; Smith, 2004).

Finalmente, se realiza la deshidratación del retenido para obtener el producto en polvo. Existen varios tipos de aparatos pero se suele realizar en secadores por atomización empleando aire caliente con una temperatura de entrada de 160-180°C y una de salida menor de 80°C, y, a veces, después se emplea un secador de lecho fluidizado para finalizar la deshidratación (Hobman, 1992). El uso combinado de ambos tipo de secado junto con la evaporación a vacío, es un buen método de eliminar el agua sin afectar a las propiedades funcionales (Písecký, 2004). El secado por atomización rinde productos con excelente solubilidad, sabor y color (Smith, 2004). También se puede emplear la liofilización.



Como el polvo obtenido es poco denso y fino, podría perderse con facilidad en el aire de salida, por lo que suele ser necesario colocar un filtro textil después del primer separador ciclónico (Hobman, 1992).

El producto en polvo elaborado se envasa en sacos de 20-25 kg con varias capas de papel y polietileno (Hobman, 1992).

4. PROPIEDADES NUTRITIVAS Y TERAPÉUTICAS DEL SUERO

Desde los tiempos más antiguos, se ha reconocido el valor nutricional del suero. En el año 460 a.C., Hipócrates recomendaba beber considerables cantidades de suero durante largos períodos, porque había observado que poseía aplicaciones terapéuticas (Jelen, 2003). Durante la Edad Media muchos doctores prescribían el suero contra varias enfermedades (Holsinger et al., 1974). A mediados del siglo XVII el suero se convierte en la bebida de moda en las ciudades inglesas, abriéndose numerosas "whey houses", análogas a los actuales "coffee shops" (Tunick, 2008). Durante el siglo XIX fueron muy populares los baños de suero en los "spas" (Tunick, 2008); en los años 40 en los spas de Centro Europa muchas enfermedades, como anemia, tuberculosis,

Introducción

artritis, uremia, etc., se trataban con la ingestión de hasta 1,5 kg de suero/diarios (Holsinger et al., 1974).

Todas estas anécdotas históricas ilustran la importancia del suero por su valor nutritivo y/o terapéutico, aunque las investigaciones más serias no empezaron hasta finales del siglo XIX (Tunick, 2008).

El suero es una buena fuente de nutrientes biodisponibles, proporcionando proteína de alta calidad, lactosa, minerales, vitaminas hidrosolubles (especialmente riboflavina) y componentes bioactivos (Jelen, 1992; Staples, 2006).

Desde el punto de vista nutricional las proteínas son el principal foco de interés (Jelen, 2003) porque son una excelente fuente nutricional, al ser fácilmente digeribles y contener todos los aminoácidos esenciales en las proporciones adecuadas y similares a las proteínas del cuerpo humano (Walzem, 2004; Huth et al., 2008). Las proteínas séricas poseen la más alta biodisponibilidad de todas las proteínas, con lo que nuestro cuerpo puede metabolizarlas de manera más eficiente (Pordesimo y Onwulata, 2008).

Las proteínas séricas, a diferencia de las caseínas, durante la digestión pasan rápidamente desde el estómago al intestino delgado, donde se hidrolizan más lentamente mientras que sus aminoácidos se absorben con mayor rapidez que los aminoácidos de las caseínas (Mahe et al., 1996; Boirie et al., 1997). Por este motivo, las proteínas séricas se pueden usar como emulsionantes en la formulación de alimentos para disminuir el tiempo de tránsito intestinal, mejorando de este modo la digestibilidad y absorción de los nutrientes (Staples, 2006). Poseen un alto valor biológico, comparado con el de otras proteínas de la dieta, gracias a su alto contenido en aminoácidos esenciales (principalmente la α -LA y la β -LG) y especialmente lisina, triptófano, metionina y cisteína (Renner, 1992; Zayas, 1997; Walzem et al., 2002). El aporte elevado de algunos aminoácidos esenciales (lisina, treonina, metionina e isoleucina) permite que se puedan usar el suero como un suplemento de las proteínas vegetales (Renner, 1992; Walzem et al., 2002; Walzem, 2004).

Presentan un alto contenido de aminoácidos azufrados, como la cisteína y la metionina, y son especialmente ricas en aminoácidos de cadena ramificada, isoleucina, leucina y valina (Walzem et al., 2002; Walzem, 2004; Huth et al., 2008). Los aminoácidos azufrados parecen estar relacionados con el incremento de la inmunidad y de la capacidad antioxidante a través de la modulación del tripéptido glutatión (Bounous y Gold, 1991), mientras que los aminoácidos ramificados deben estar presentes en las células musculares para impulsar la síntesis proteica, e incluso

pueden ser metabolizados en el músculo para ser usados como fuente de energía (10-15% del total) durante el ejercicio físico prolongado (Pasin y Miller, 2000; Walzem et al., 2002; Walzem, 2004). Existen evidencias de que la ingestión de este tipo de proteínas estimula la síntesis proteica en el cuerpo humano, fundamentalmente, a nivel muscular, y particularmente, la leucina, la cual se ha demostrado que, de forma independiente estimula la síntesis proteica muscular (Huth et al, 2008).

Las proteínas séricas son también uno de los principales ingredientes en productos infantiles, aunque requieren algunos tratamientos adicionales, como la hidrólisis enzimática, para minimizar el carácter alergénico de la β -LG, cuyo contenido en la leche materna humana es prácticamente nulo (Riera et al., 1996a; Jelen, 2003).

El suero presenta bioactividad, que se atribuyen a las proteínas séricas y a otros compuestos nitrogenados (péptidos bioactivos), que son aquellos fragmentos proteicos obtenidos por proteólisis tras la acción de enzimas gastrointestinales. Para que un péptido tenga un efecto biológico endógenamente, debe ser resistente a la degradación durante el tránsito intestinal y poder ser transportado a través de la mucosa intestinal resistiendo la acción de las peptidasas epiteliales (Morris y FitzGerald, 2008).

Esta actividad biológica tiene un efecto positivo en las funciones y condiciones corporales, y en último lugar en la salud. Al ser una de las fuentes más ricas de material bioactivo, las proteínas séricas presentan beneficios más allá de la simple nutrición. Estos efectos son, entre otros, propiedades antimicrobianas, reducción de la proliferación de células cancerosas, potenciación inmune, reducción de la hipertensión, actividad antioxidante y antitrombótica, disminución de niveles de colesterol,... , con lo que presentan efectos beneficiosos en el cáncer, enfermedades renales, osteoporosis, obesidad... Algunos de estos péptidos bioactivos derivados de las proteínas séricas son las lactoforinas y las lactorfinas, de la α -LA y la β -LG, las casoplatelinas, procedentes del GMP, la seroforina y la albutensina A, derivadas de la BSA y la lactoferrina y lactoferroxinas de la lactoferrina (Jelen, 2003; Korhonen y Pihlanto, 2006; Morris y FitzGerald, 2008; Pordesimo y Onwulata, 2008).

Existen ciertos ácidos grasos como el linoleico o el araquidónico, que son esenciales en la dieta, ya que no somos capaces de sintetizarlos, y están presentes en la grasa del suero, aunque en pequeña cantidad. Además los lípidos de origen caprino se digieren más fácilmente que los bovinos, por el menor tamaño de sus glóbulos grasos, y porque tienen un mayor contenido en ácidos grasos de cadena corta, que son

Introducción

más fácilmente atacados por las lipasas (Jenness, 1980). Los esfingolípidos y los productos de su hidrólisis son también compuestos bioactivos (Walzem et al., 2002).

La lactosa se caracteriza por hidrolizarse lentamente durante la digestión, convirtiéndose en una fuente prolongada de energía, y por aumentar la absorción intestinal de algunos minerales (calcio, magnesio y zinc). Debido a su lenta metabolización, parte de la lactosa alcanza el colón, donde contribuye a la formación de una flora intestinal saludable, al estimular el crecimiento de bacterias lácticas beneficiosas, tales como las *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, e inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas. De hecho la lactosa actúa como sustrato para la producción de compuestos prebióticos, como la lactulosa o los lactoligosacáridos. Desde el punto de vista de la salud, posee un bajo índice glucémico (65 frente al 138 de la glucosa, 104 de la miel y 87 de la sacarosa) siendo así útil para diabéticos. Si se compara con otros azúcares su capacidad para producir caries es mínima (Renner, 1992; McBean, 2004). A pesar de todas las ventajas que exhibe, existen individuos que presentan intolerancia a la lactosa, debido a que posee bajos niveles en la mucosa intestinal de la enzima encargada de su hidrólisis (lactasa), originándose problemas digestivos, como cólicos, diarreas... (Renner, 1992; McBean, 2004).

El alto nivel de proteínas y lactosa estimula la producción de enzimas encargadas de la hidrólisis de los macronutrientes de la dieta (Staples, 2006).

El suero es también una buena fuente de vitaminas del grupo B, especialmente riboflavina y de minerales, como el calcio, principalmente en sueros ácidos (Jelen, 1992), que es fácilmente asimilable por el cuerpo humano, y no sólo es esencial para la formación y desarrollo de los huesos, sino que también participa en la regulación de la función celular, conducción nerviosa, contracción muscular, coagulación sanguínea y su consumo disminuye el riesgo de padecer enfermedades como osteoporosis, hipertensión, enfermedades cardiovasculares ... (Bastian, 2004), o como el magnesio, que actúa como catalizador en muchas reacciones enzimáticas (Staples, 2006).

5. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS SÉRICAS

5.1. INTRODUCCIÓN

Además de poseer buenas propiedades nutricionales, las proteínas séricas presentan unas propiedades funcionales o tecnológicas, que las hacen muy útiles como ingredientes en la industria alimentaria (Rosenberg, 1995). Morr y Ha (1993) definen

las propiedades funcionales de las proteínas como aquellas características físico-químicas que influyen en la estructura, apariencia, textura, viscosidad y sabor de los productos, mientras que Pour-El (1981) las define como aquellas características de los alimentos o de sus ingredientes que sin ser nutricionales afectan a su utilización.

La habilidad de las proteínas para llevar a cabo cada una de las propiedades funcionales depende (tabla 9) no sólo de sus características intrínsecas, tanto físico-químicas como estructurales (Damodaran, 1996), sino también de factores extrínsecos, como pH, fuerza iónica, temperatura, concentración de iones, proteínas, azúcares... (Morr y Ha, 1993), y de las condiciones utilizadas durante la obtención y utilización de las proteínas (tratamientos físicos, químicos, térmicos y biológicos) (Robin et al., 1993).

Tabla 9: Algunos de los factores que afectan a las propiedades de las proteínas en los alimentos

FACTORES INTRÍNSECOS	FACTORES AMBIENTALES	CONDICIONES DE TRATAMIENTO
Tamaño	pH	Calor
Forma	Estado de óxido-reducción	Deshidratación
Composición y secuencia aminoacídica	Sales	pH
Carga neta y su distribución	H ₂ O	Fuerza iónica
Relación hidrofobia/hidrofilia	Hidratos de Carbono	Agentes reductores
Conformación	Lípidos	Condiciones de almacenamiento
Enlaces intra y interpéptidos	Surfactantes	Modificaciones físicas
Rigidez o flexibilidad molecular	Sabores y aromas	Modificaciones químicas

Fuente: Adaptada de Damodaran (1996)

Las propiedades funcionales de las proteínas se pueden clasificar en las siguientes categorías (Morr y Ha, 1993; Ordóñez et al., 1998; Singh, 2003):

- ☆ Propiedades de hidratación que dependen de las interacciones de las proteínas con el agua: solubilidad, viscosidad, gelificación, dispersabilidad, absorción y retención de agua, adhesión, hinchamiento y precipitación.

Introducción

- ☆ Propiedades ligadas a las características de superficie: capacidad emulsionante, capacidad espumante, y la adsorción en las interfases aire-agua y aceite-agua.
- ☆ Propiedades que no encajan en las 2 categorías anteriores: difusión, desnaturalización y uniones proteína-proteína, proteína-ión y proteína-ligando.

Las propiedades hidrodinámicas están más influidas por la conformación y tamaño de la proteína, mientras que las propiedades ligadas a las características de superficie se ven más afectadas por la composición, distribución aminoacídica y el modelo de plegamiento (Morr y Ha, 1993; Damodaran, 1996).

No se conoce suficientemente la relación entre la estructura y funcionalidad de las proteínas en alimentos, debido a que, fundamentalmente, los conocimientos sobre las propiedades funcionales de las proteínas se basan en estudios del comportamiento de proteínas en agua, y a veces los resultados obtenidos fallan en su predicción del comportamiento de estas proteínas en alimentos preparados industrialmente. También influye la falta de métodos estándar para medir las propiedades funcionales (Damodaran, 1996). Por este motivo a la hora de valorar las propiedades funcionales es necesario tener en cuenta diversas variables en las condiciones de aplicación utilizadas, que se resumen en la tabla 10.

Tabla 10: Variables que influyen en las condiciones usadas para medir algunas propiedades funcionales.

PROPIEDAD FUNCIONAL	pH	T°	Tiempo	Método mezcla ¹	Velocidad Centrifugación	Otras variables
Solubilidad	✓	✓	✓	✓	✓	Tiempo de centrifugación, tiempo de mezcla
Capacidad emulsionante y estabilidad	✓	✓	✓	✓	-	La estabilidad se mide en un amplio rango de tiempos
Gelificación	✓	✓	✓	-	-	La T° de calentamiento varía, forma de medir la fuerza del gel

¹: Se refiere al método usado para mezclar las fases (por ejemplo forma de añadir el aceite a la emulsión).

Fuente: Adaptada de Hall (1996)

Predecir la funcionalidad de los CPS y APS obtenidos es difícil porque la complejidad, no sólo de la composición, sino también de las condiciones de elaboración y tecnologías utilizadas, impactan en la funcionalidad. Incluso pequeñas variaciones en las condiciones de elaboración pueden suponer grandes diferencias en las propiedades funcionales (Morr y Ha, 1993). En la tabla 11 se resume la funcionalidad del suero y de algunos productos obtenidos del suero.

Tabla 11: Visión general de la funcionalidad del suero dulce, CPS y APS

PROPIEDAD FUNCIONAL	SUERO DULCE	CPS ^a	APS ^b
Solubilidad	Buena	Buena	Buena
Viscosidad	Baja	Baja	Baja
Capacidad de unir agua	Media	Alta	Muy alta
Coagulación	> 65°C	> 65°C	> 65°C
Estabilidad al pH	Media	Alta	Alta
Capacidad emulsionante	Media	Alta	Alta
Propiedad espumante	Baja	Alta	Muy alta
Gelificación	Baja	Alta	Muy alta

^a : 34-80 % de proteína; ^b : >80% de proteína.

Fuente: Bouzas (2004a)

La mayoría de los alimentos procesados son emulsiones, espumas o geles, y la capacidad de las proteínas para desarrollar estas estructuras se relaciona con su solubilidad (Damodaran, 1996; Zayas, 1997). Seguidamente se describen las principales propiedades funcionales de las proteínas séricas que se relacionan con su uso y aplicación en la industria alimentaria.

5.2. SOLUBILIDAD

La solubilidad de una proteína se puede definir como el porcentaje de proteína que se mantiene en disolución o dispersión coloidal bajo condiciones específicas y que no sedimenta a fuerzas centrífugas moderadas. Para que una proteína sea soluble debe interactuar con el disolvente, por ello, también se puede definir la solubilidad, como el equilibrio entre las interacciones proteína-proteína y proteína-disolvente (Ordóñez et al., 1998).

Introducción

La solubilidad puede ser un buen indicador de otras propiedades funcionales (Zayas, 1997; Singh, 2003) pues destaca por su influencia en el resto de propiedades, ya que las proteínas empleadas por su funcionalidad deben poseer una alta solubilidad, que permita obtener unas buenas propiedades gelificantes, emulsionantes y espumantes (Vojdani, 1996). Aunque la solubilidad total no es necesaria, pues se ha observado que en un amplio rango de solubilidad (35-95%) esta propiedad no es el factor principal que determina la funcionalidad proteica (Mangino, 1992b).

La solubilidad proteica también refleja las condiciones utilizadas durante el procesado (tratamientos térmicos y mecánicos, secado, pH usado en la precipitación, extracción...) o durante el almacenamiento, que pueden insolubilizar a las proteínas. De este modo se podría usar la solubilidad para predecir la utilidad de los concentrados de proteínas séricas en la industria alimentaria (De Wit, 1989; Robin et al., 1993; Zayas, 1997). Es necesario tener cuidado y evitar o minimizar cualquier factor que pueda provocar la desnaturalización proteica para poder mantener unas propiedades funcionales óptimas (Vojdani, 1996; Zayas, 1997).

Una buena solubilidad presenta la ventaja de permitir una dispersión rápida y completa de las proteínas, lo que implica un sistema disperso con una estructura homogénea (Ordóñez et al., 1998). Desde el punto de vista alimentario, el uso de ingredientes solubles y fáciles de dispersar, mejora la consistencia de un producto y simplifica su elaboración. La solubilidad proteica es importante en alimentos tales como bebidas (sobre todo en las ácidas, como son las de frutas), sopas y salsas para así evitar que se formen precipitados o sedimentos proteicos. En contraste a las proteínas puras, la solubilidad de las proteínas en los alimentos permanece casi constante en un amplio rango de concentraciones proteicas (Morr y Ha, 1993).

Las proteínas del lactosuero son altamente solubles, especialmente si se las compara con los caseinatos o la proteína de soja, en un amplio intervalo de concentraciones, valores de pH, temperatura, actividad de agua y condiciones iónicas (Morr, 1989). Esta propiedad funcional depende no sólo de factores intrínsecos (Vojdani, 1996; Zayas, 1997), sino también del pH, temperatura, fuerza iónica, polaridad del solvente y de las condiciones de elaboración (Damodaran, 1996; Zayas, 1997).

La solubilidad de una proteína depende del pH de la disolución (Vojdani, 1996). A valores de pH por encima y por debajo del pI, las proteínas poseen cargas netas y se repelen entre sí, pudiendo establecer más puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, y por lo tanto, ser más solubles. Sin embargo a medida que nos acercamos al

pI, disminuye la diferencia de cargas entre ellas, las fuerzas electrostáticas son mínimas, y hay menos moléculas de agua que interaccionan con ellas. Cuando esta diferencia de carga llega a ser lo suficientemente pequeña, las proteínas pueden aproximarse entre sí, contactar, formar agregados y, posiblemente, precipitar (Vojdani, 1996; Ordóñez et al., 1998). Por tanto, la solubilidad mínima generalmente es cuando el pH se corresponde con el pI, por lo que a esos valores la mayoría de proteínas presentes en alimentos son insolubles.

En general la solubilidad de las proteínas séricas es pH dependiente (Morr y Ha, 1993): decrece a medida que el pH disminuye de valores de 7 a 5 ó 4 (Zayas, 1997). Sin embargo, a diferencia de otras proteínas, estas proteínas permanecen solubles en su pI, y especialmente la β -LG, son muy solubles en un rango de pH de 3-9 y se pueden emplear en su pI (Mangino 1992b; Damodaran, 1996; Vojdani, 1996). Esto se debe a que la superficie de las proteínas séricas contienen un alto número de grupos hidrofílicos, que se hidratan creando una fuerza de repulsión suficiente para evitar la agregación vía interacciones hidrofóbicas (Damodaran, 1997a). La α -LA y la β -LG son solubles, respectivamente, al 68% y al 90% a su pI que está alrededor de pH=5,0 (Vojdani, 1996). Aunque los CPS son menos solubles en su pI, la solubilidad siempre excede el 68% (Hung y Zayas, 1992). A valores extremos de pH también disminuye la solubilidad, porque las proteínas puede desplegarse con lo que hay menos enlaces peptídicos y se exponen más grupos hidrófobos (Vojdani, 1996).

La solubilidad aumenta con la temperatura entre 0 y 40-50°C. Cuando se eleva por encima de estos valores durante un tiempo dado, la mayoría de las proteínas tienden a desnaturalizarse (reversiblemente o irreversiblemente), lo que provoca un incremento de los grupos hidrófobos en la superficie de la proteína (que en estado nativo están orientados hacia el interior de la molécula), y que interaccionan, reduciendo la unión con el agua. En el caso de desnaturalización irreversible aumentan las interacciones entre proteínas pudiendo formar agregados y precipitar, lo que conlleva una pérdida de solubilidad (Robin et al., 1993; Vojdani, 1996; Zayas, 1997; Ordóñez et al. 1998). De todos modos la temperatura a la que una proteína se desnaturaliza varía con cada proteína, y depende del pH y de la fuerza iónica (Vojdani, 1996).

Si las proteínas séricas se encuentran desnaturalizadas (total o parcialmente) debido a un tratamiento térmico, disminuye su solubilidad a valores de pH entre 3 y 5 (Harper, 1992; Singh, 2003; Burrington, 2004a); pero por el contrario si se encuentran parcialmente desnaturalizadas, pueden ser muy solubles a pH > 6 (Harper, 1992).

Introducción

La fuerza iónica afecta a la solubilidad. La presencia de iones de sales neutras aumenta la solubilidad de las proteínas (salting-in), sobre todo para globulinas y algunas albúminas (Vojdani, 1996). Los iones pueden reaccionar con las cargas de las proteínas, disminuyendo la atracción electrostática entre las cargas de distinto signo de las moléculas proteicas vecinas, lo que implica una mayor disolución proteica, y por lo tanto, una mayor solubilidad. Sin embargo, tras alcanzar un máximo, un mayor incremento de sales solo provoca la disminución de la solubilidad (salting-out), porque las proteínas y los iones (que no están enlazados a proteínas) compiten por unirse a las moléculas de agua, con lo que se neutralizan las cargas, disminuyendo las fuerzas repulsoras y las proteínas pueden formar agregados y precipitar (Vojdani, 1996; Ordóñez et al. 1998).

En la bibliografía, el efecto de las sales sobre esta propiedad resulta un poco ambiguo. Patel y Kilara (1990) relacionan el alto contenido tanto de cenizas como de calcio con una mejor solubilidad, en tanto que Morr (1987) señala que los CPS con alto contenido en cenizas exhiben una baja solubilidad y que, en concreto, el calcio está relacionado negativamente con esta propiedad (Zayas, 1997). Por el contrario, Robin et al. (1993) matizan que la solubilidad de las proteínas séricas no se ven muy afectadas por las sales.

Los lípidos interactúan con las proteínas en los sistemas biológicos, como es el caso de las membranas celulares, sin embargo las interacciones hidrofóbicas que se establecen entre lípidos y proteínas, reducen la solubilidad de las mismas en agua (Vojdani, 1996).

La solubilidad de las proteínas de CPS comerciales es muy variable (Liao y Mangino, 1987; Damodaran, 1996), pudiendo verse reducida como resultado de una desnaturalización parcial ocurrida durante la elaboración de CPS o de APS (Damodaran, 1996; Singh, 2003). La solubilidad de las proteínas está afectada por el calor, y dependiendo del tratamiento térmico aplicado, la desnaturalización de las proteínas séricas varía desde 12 a valores superiores al 90% (Zayas, 1997). Según varios investigadores, los CPS preparados por diferentes métodos son solubles en un rango de pH amplio (3-8) (Zayas, 1997), por lo que poseen una capacidad de unir agua relativamente baja (Cayot y Lorient, 1997; Burrington, 2004a). Los CPS pueden presentar una solubilidad baja incluso a pH neutro, lo que se atribuye a la desnaturalización proteica que tiene lugar a cuando la ultrafiltración del suero ocurre a temperaturas y presiones elevadas (Damodaran, 1996) o cuando se utilizan pH extremos y temperaturas excesivas en la elaboración de CPS (Zayas, 1997).

Los CPS preparados por UF y ósmosis inversa, por UF o por filtración de membrana o por gel presentan una alta solubilidad (Zayas, 1997), no obstante el efecto de los tratamientos térmicos en el suero durante la elaboración de CPS es una fuente de contradicción entre diversos autores. Algunos destacan que la pasteurización del suero (78,2°C 15 segundos ó 62,4°C durante 30 minutos) produce un 20% de desnaturalización proteica (McDonough et al., 1974; Singh, 2003) con la consecuente pérdida de solubilidad. Por el contrario, otros autores señalan que la solubilidad proteica de los CPS no se ve influida por la pasteurización del suero (Mangino et al., 1987; Morr, 1987) o de la leche (Mangino et al., 1987) e incluso con un tratamiento térmico de 65°C durante 30 minutos, la solubilidad de CPS no disminuye (Schmidt et al., 1986).

Un almacenamiento prolongado (Zayas, 1997), la oxidación o las reacciones de Maillard, también pueden conducir a la pérdida de solubilidad proteica (Morr y Ha, 1993; Thomas et al., 2004).

La liofilización puede disminuir la solubilidad, por aumentar la hidrofobicidad, al favorecer la interacción entre ácidos grasos y las proteínas (Zayas, 1997), mientras que Casper et al. (1999) asocian este método de deshidratación con un bajo grado de desnaturalización.

5.3. PROPIEDADES DE SUPERFICIE

Las espumas y las emulsiones son dispersiones coloidales de dos fases (líquido-gas o líquido-líquido respectivamente) inmiscibles entre sí. La fase continua no posee ningún "deseo" termodinámico de mezclarse con la fase dispersa, porque existe una tensión entre ambas fases, de manera que al dispersar, por ejemplo el aceite en agua, aumenta no sólo la tensión interfacial sino también la energía libre del sistema. De acuerdo con la leyes de la termodinámica, un sistema debería estar en su estado de mínima energía, con lo que estas dispersiones coloidales tras mezclarse por agitación, rápidamente se separan tal como dice el dicho "como agua y aceite" para minimizar el área de contacto y la energía libre (Robin et al. 1993; Ordóñez et al., 1998; Damodaran, 2005).

Esa dispersión es inestable a menos que se añadan sustancias anfifílicas en la interfase que disminuyan la tensión interfacial y que eviten la coalescencia de las gotas dispersas. Estas sustancias que, actúan como agentes tensoactivos, pueden ser las proteínas, que son capaces de estabilizar la interfase al disminuir la tensión superficial y formar una película proteica (Damodaran, 1996; Ordóñez et al., 1998).

Introducción

Las proteínas, al poseer ese carácter anfipático, pueden migrar y difundir hacia la interfase, creada durante la homogeneización o batido, donde se desdoblán y extienden rápidamente para disminuir la tensión. Al entrar en contacto con la interfase los aminoácidos no polares se orientan hacia la fase no acuosa permitiendo la adsorción proteica. Las proteínas parcialmente desdobladas y adsorbidas a la interfase experimentan un reordenamiento molecular e interacciones intermoleculares para formar una capa o película fuerte, resistente, cohesiva y elástica capaz de proteger los glóbulos de las emulsiones o las burbujas de aire (Morr y Ha, 1993; Ordóñez et al., 1998) (véase figura 7).

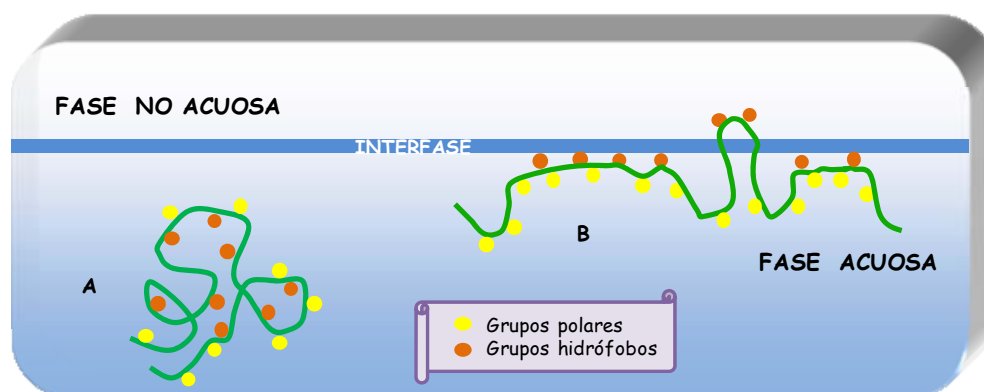


Figura 7: Representación de la conformación de una proteína en la interfase.
A: Proteína en la solución acuosa. B: Proteína desplegada y absorbida a la interfase, formando una monocapa.
(Adaptada de Ordóñez et al. (1998))

Para que una proteína posea unas buenas características emulsionantes y/o espumantes, debe presentar una buena hidrofobicidad y un alto grado de flexibilidad (Ordóñez et al., 1998). Además son importantes otras propiedades físico-químicas como el número y distribución de residuos con carga, residuos sulfhidrúlicos, residuos hidrófilos e hidrófobos (Morr y Ha, 1993).

Las caseínas poseen mejores propiedades de superficie que las proteínas séricas, principalmente en la formación de emulsiones, aunque el desplegamiento por tratamiento térmico de las proteínas del lactosuero mejora la propiedad emulsionante (Lorient et al., 1991).

Que una proteína sea un buen agente espumante, no implica necesariamente que sea un buen agente emulsionante (Ordóñez et al., 1998). A pesar de ello se espera que

tanto los factores de elaboración como de composición que modifican las propiedades espumantes también afectan a las emulsionantes (Schmidt et al., 1984).

5.3.1. PROPIEDAD ESPUMANTE

Las espumas son dispersiones o sistemas de fases que contienen burbujas de gas (aire o CO_2) separadas por una capa continua líquida (Zayas, 1997; Ordóñez et al., 1998). Para formar una espuma es necesario aportar una energía mecánica, que permita crear una interfase, y agentes de superficie que disminuyan la tensión superficial y que eviten la coalescencia de las burbujas de gas. Las proteínas ayudan a la estabilización de la fase gaseosa formando una barrera o película protectora elástica entre las burbujas de gas atrapadas (Ordóñez et al., 1998; Singh, 2003). Las espumas más estables se forman con proteínas solubles que pueden interactuar y formar películas viscosas y gruesas (Zayas, 1997).

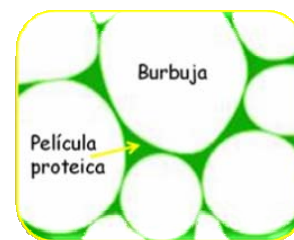


Figura 8: Representación de la estructura de una espuma (Adaptada de Wilde y Clark (1996))

La estructura típica de una espuma se muestra en la figura 8.

Para que una proteína sea un buen agente espumante debe poseer las siguientes características (Zayas, 1997):

- ✓ Estabilizar rápidamente y efectivamente a las espumas a bajas concentraciones.
- ✓ Actuar como un buen agente en un amplio rango de pHs y con presencia en el medio de inhibidores de espumas, tales como grasa, alcohol o sustancias responsables del sabor.

En la propiedad espumante se pueden distinguir 2 conceptos (Patel y Kilara, 1990):

- ↳ Capacidad espumante: Es la habilidad de la proteína para ayudar a la dispersión del aire en la fase continua líquida.
- ↳ Estabilidad de la espuma: Describe la habilidad de las proteínas para formar una película fuerte y cohesiva alrededor de las burbujas que resista la difusión de aire desde las burbujas, estabilizando la espuma.

Es importante señalar que las características que favorecen la formación de la espuma y las necesarias para una buena estabilidad, se deben a diferentes propiedades, que a veces pueden ser antagónicas (Ordóñez et al., 1998), lo que sugiere que las propiedades que son buenas para la formación de espumas no

Introducción

confieren estabilidad a las espumas creadas (Damodaran, 1996). De hecho, proteínas como la β -caseína presentan una mejor capacidad de formar espumas que la BSA o la lisozima, sin embargo éstas forman espumas más estables (Damodaran, 1996). Si una proteína es flexible, lo que le permite extenderse rápidamente en la interfase, y presenta un alto grado de hidrofobicidad, lo que le proporciona mejorar su orientación en la interfase, presenta una buena capacidad espumante. Por otro lado para que la espuma sea estable es necesario que se forme una película proteica espesa, continua, elástica e impermeable al aire alrededor de cada burbuja de aire (Ordóñez et al., 1998). La estabilidad de las espumas también se ve potenciada por una baja tensión entre las 2 fases y por una gran viscosidad de la fase líquida (Damodaran, 1996; Ordóñez et al., 1998). Además se necesita un equilibrio adecuado entre la flexibilidad y la rigidez molecular para que no sólo una espuma se forme, sino también para que sea estable (Damodaran, 1996).

Las proteínas del lactosuero presentan buenas propiedades espumantes (Cheftel et al., 1989; Zayas, 1997) y estabilizan las espumas mediante el incremento de la viscosidad (Zayas, 1997). Las proteínas séricas son capaces no sólo de formar estructuras cohesivas alrededor de las burbujas de aire, sino también aportar excelentes propiedades superficiales (Singh, 2003). La capacidad espumante de las proteínas séricas se ve incrementada al aumentar la solubilidad de los CPS, porque para ser un buen agente espumante, las proteínas séricas deben ser solubles en solución acuosa y capaces de desdoblarse en la interfase (Zayas, 1997).

Los CPS pueden formar excelentes espumas, aunque su estabilidad es generalmente pobre (Mangino, 1992b). La concentración y tipo de proteína, el pH, la presencia de lípidos, péptidos, sales y azúcares y el tratamiento térmico previo son algunos de los factores que influyen en las propiedades espumantes (Singh, 2003).

La capacidad espumante aumenta con la concentración proteica hasta un nivel máximo, a partir del cual vuelve a descender. El máximo para las espumas con CPS se ha observado entre 8 y 12% de proteína (Singh, 2003). Al aumentar la concentración de proteína, se incrementa no sólo la viscosidad de la fase líquida sino también el espesor de la película proteica, y esto se traduce en un aumento de la estabilidad de la espuma (Ordóñez et al., 1998).

De todas las proteínas séricas, la que se encuentra en mayor proporción, la β -LG, es la que manifiesta la mejor capacidad espumante pero la α -LA y la BSA también son capaces de formar espumas (De Wit et al., 1988). La β -LG es una proteína con una buena capacidad espumante, proporcionando mejor estabilidad espumante que la α -LA

o los CPS (Cayot y Lorient, 1997; Herceg et al. 2007). Las proteosomas peptonas por el contrario tienen un efecto negativo disminuyendo tanto la capacidad como la estabilidad de las espumas (Phillips et al., 1987; Zhu y Damodaran, 1994b). La eliminación de estas proteínas mejoraría las propiedades espumantes de las proteínas séricas (Zhu y Damodaran, 1994b; Cayot y Lorient, 1997).

El pH es otro de los factores que afecta a esta propiedad. A valores de pH entre 4 y 5 se obtiene una buena capacidad y estabilidad espumante (Singh, 2003; Marinova et al., 2009). Esto se debe a que en el pI de las proteínas o próximo a él, la repulsión electrostática entre las moléculas es mínima, lo que permite que se adsorban más proteínas en la interfase, formándose así una película más fuerte y cohesiva que estabiliza la estructura (Phillips et al., 1990; Cayot y Lorient, 1997; Zayas 1997; Singh, 2003; Marinova et al., 2009). A valores de pH diferentes del pI, la estabilidad es menor aunque la formación de espuma es buena (Ordóñez et al., 1998).

La presencia de algunos componentes en los CPS perjudica la propiedad espumante (Zayas, 1997). Los lípidos en general, pero sobre todo los lípidos polares como los fosfolípidos y ácidos grasos insaturados, pueden provocar la ruptura de la espuma, como consecuencia de su alta actividad superficial y su efecto adelgazante en la película proteica (Damodaran, 1996; Zayas, 1997; Singh, 2003). Además también influyen negativamente sobre la hidrofobicidad superficial de las proteínas, porque compiten por los lugares de unión de la proteína, con lo que si los grupos hidrófobos están ocupados por los lípidos, no participan en la formación de interacciones hidrofóbicas (Zayas, 1997). Los lípidos también presentan una actividad de superficie mayor que las proteínas, con lo que se adsorben más rápido a la interfase e inhiben la adsorción proteica (Boutin, 2004). La eliminación de los lípidos residuales de los sueros, se ha visto que mejora considerablemente las propiedades espumantes de los CPS (Pearce et al., 1991).

Los péptidos de bajo peso molecular, al igual que los fosfolípidos, compiten con las proteínas por la adsorción en la interfase, disminuyendo la estabilidad de la espuma (Damodaran, 2005). Por este motivo los hidrolizados de proteínas séricas presentan poca capacidad espumante (Mutilangi et al., 1996).

El efecto de las sales sobre la estabilidad y la capacidad espumante es contradictorio. Algunos autores señalan el efecto perjudicial de la adición de NaCl (Phillips et al., 1991, Zhu y Damodaran, 1994b) o de calcio, en las propiedades espumantes (Schmidt et al., 1984; Morr y Ha, 1993). Un aumento de la fuerza iónica decrece tanto la estabilidad (Zhu y Damodaran, 1994b) como la capacidad espumante

Introducción

de las proteínas séricas (Zhu y Damodaran, 1994b; Johansen et al., 2002), ya que una fuerza iónica alta puede debilitar las uniones electrostáticas intermoleculares, con lo que se perjudica la formación de la película interfacial (Morr y Ha, 1993). Por otro lado, otros autores (Peltonen-Shalaby y Mangino, 1986; Patel y Kilara, 1990; Vaghela y Kilara, 1996a) señalan que las cenizas están positivamente correlacionadas con la propiedad espumante, pero especialmente el calcio (Patel y Kilara, 1990; Vaghela y Kilara, 1996a; Ye y Singh, 2000) y la adición de NaCl (Halling, 1981). Zhu y Damodaran (1994a) destacan que la máxima capacidad y estabilidad espumante se observaba si la formación de las espumas con APS se realiza inmediatamente tras la adición de sales (CaCl_2 o MgCl_2), pero disminuyen si se permite un tiempo de incubación, porque estos cationes divalentes favorecen cierta desnaturalización y polimerización de las proteínas en la interfase, con lo que si existe demasiado tiempo se produciría una excesiva agregación que impediría la adsorción de las proteínas en la interfase. Esto sugiere que las sales que están presentes de forma natural en la interfase de la espuma podrían actuar de manera diferente.

El efecto de los azúcares resulta también paradójico. Varios autores (Zhu y Damodaran, 1994b; Zayas, 1997; Ordóñez et al., 1998; Herceg et al., 2007) destacan que la adición de azúcares como sacarosa, glucosa o hasta un 20% de lactosa, mejora la estabilidad porque incrementa la viscosidad reduciendo así la pérdida de líquido y formando una película interfacial más cohesiva que estabiliza la estructura. Sin embargo no mejora la capacidad de formación, porque la adición de sacarosa a soluciones de CPS disminuye la formación de espumas debido al incremento de la viscosidad (Morr y Ha, 1993; Zayas, 1997). Si se añade sacarosa a pH 6 se mejora la estabilidad de espumas preparadas con proteínas séricas, pero a pH 8 inhiben la desnaturalización en la interfase con lo que disminuye la estabilidad (Cayot y Lorient, 1997). La adición de almidón disminuye ligeramente la estabilidad (Herceg et al., 2007).

Un tratamiento térmico suave y una desnaturalización parcial de las proteínas por calor, mejoran las propiedades espumantes de los CPS, siendo el efecto mayor en la estabilidad que en la capacidad espumante, pero una excesiva desnaturalización y agregación proteica perjudica la propiedad espumante de CPS (Cayot y Lorient, 1997; Singh, 2003). Un tratamiento térmico suave se puede relacionar con la formación de complejos lipoproteicos, que precipitan y facilitan la formación de espumas. Sin embargo a temperaturas altas ($\approx 80^\circ\text{C}$), se reduce esta propiedad, debido a abundantes interacciones que pueden causar una excesiva agregación proteica y una disminución de la formación de la película (Zayas, 1997; Damodaran, 2005).

Las modificaciones enzimáticas se usan también para mejorar las propiedades espumantes (Foegeding y Luck, 2003; Damodaran, 2005). La hidrólisis enzimática de las proteínas mediante proteasas incrementa el volumen de espuma pero reduce la estabilidad (Zayas, 1997), pero si se combina un calentamiento a 55-70°C junto con una hidrólisis limitada de los CPS, se consigue una excelente capacidad y estabilidad espumante, siempre que el pH se encuentre entre 7 y 8 antes de que se forme la espuma (Singh, 2003). En general, bajos niveles de hidrólisis se asocian con una mejora en esta propiedad (Foegeding y Luck, 2003).

La capacidad de formar espumas de las proteínas séricas varía en función del método de obtención utilizado: de este modo APS obtenidos a partir de suero ácido y dulce que no han sufrido tratamiento previo presentaban una pobre capacidad espumante. Si se eliminan mediante centrifugación o filtración partículas insolubles que producen un detrimento en esta propiedad se mejora un poco la capacidad espumante, pero si a continuación se microfiltra mejora considerablemente, porque se eliminan moléculas como las lipoproteínas (Hawks et al., 1993).

5.3.2. PROPIEDAD EMULSIONANTE

Las emulsiones son sistemas dispersos de dos líquidos poco solubles o insolubles entre sí (Ordóñez et al., 1998). Pueden ser de 2 tipos (Ordóñez et al., 1998; Damodaran, 2005):

- **O/W:** Emulsiones donde la fase dispersa es el aceite y la fase continua es el agua (leche, mayonesa).
- **W/O:** Emulsiones donde la fase dispersa es el agua y la fase continua es el aceite (margarina, mantequilla).

Para evaluar las propiedades emulsionantes se usan varios conceptos (Zayas, 1997; Singh, 2003):

✓ **Capacidad emulsionante:** Es la habilidad de la proteína para emulsificar o dispersar el aceite. Se puede medir de diversas formas. Una de ellas se expresa como la máxima cantidad de aceite emulsionado por una dispersión proteica justo antes de que se produzca la inversión. Otra, muy común, es la determinación del índice de actividad emulsionante, que se refiere a la máxima área interfacial por unidad de proteína de una emulsión estabilizada en sistemas bien definidos (De Wit et al., 1988).

Introducción

✓ Estabilidad emulsionante: Es la habilidad de las gotas de la emulsión de permanecer dispersas sin separarse, es decir que una emulsión permanezca sin cambios por un cierto período de tiempo y bajo determinadas condiciones (Hill, 1996).

Las propiedades emulsionantes al igual que las espumantes dependen de la habilidad de las proteínas de migrar hacia la interfase, desplegarse y orientarse de manera que los residuos hidrófobos se asocian con el aceite, y los hidrofílicos con el agua (Schmidt et al., 1984). Las proteínas lácteas al tener una alta actividad superficial, se pueden adsorber rápidamente a la interfase de aceite-agua y ayudan a romper las gotas de grasa para facilitar la formación de gotas más pequeñas durante la emulsificación o homogeneización, al disminuir la tensión superficial entre el aceite y el agua y produciendo una película que estabiliza a las gotas de grasa frente a diferentes mecanismos (figura 9) que desestabilizan las emulsiones (Zayas, 1997; McClements, 2008; Sullivan et al., 2008).

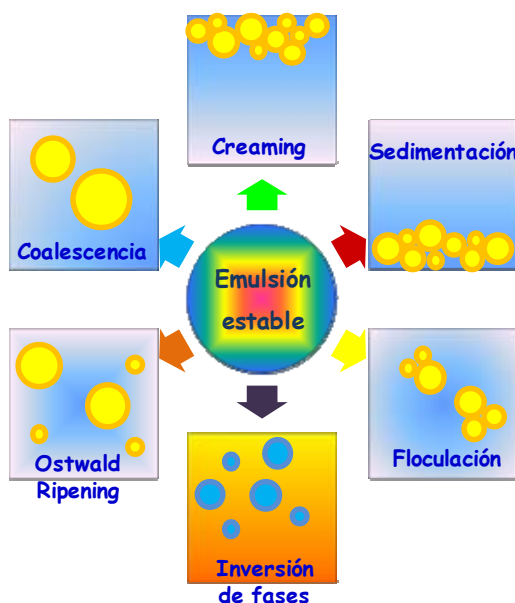


Figura 9: Mecanismos que desestabilizan las emulsiones
(Adaptado de McClements, 2008)

Las proteínas con mejores propiedades emulsionantes son aquellas que presentan una gran solubilidad, buena hidrofobicidad y una gran flexibilidad, que les permite disociarse, desplegarse y formar una película interfacial (Zayas, 1997; Ordóñez et al., 1998; Damodaran, 2005). Las proteínas poco solubles o demasiado hidrofóbicas pueden precipitar en la interfase, lo que desestabilizaría las emulsiones (Damodaran, 2005).

Las proteínas séricas poseen una buena capacidad y estabilidad emulsionante porque son proteínas globulares, con dominios en su estructura lo suficientemente flexibles, que forman películas rápidamente y disminuyen la tensión superficial (Zayas, 1997).

Las emulsiones formadas con proteínas séricas son algo menos estables que aquéllas que usan como agentes emulsionantes a las caseínas, bajo las mismas condiciones (Singh, 2003). Que las proteínas séricas sean consideradas peores emulgentes se debe a la ausencia de un balance apropiado entre los grupos hidrófobos e hidrofílicos. Estos grupos están distribuidos uniformemente en la estructura primaria, pero en las caseínas están concentrados en regiones concretas (Schmidt et al., 1984). Aunque los caseinatos son mejores emulgentes que las proteínas séricas (Ordoñez et al., 1998), éstas sin embargo son unas eficientes estabilizadoras de emulsiones (Cayot y Lorient, 1997).

La concentración y tipo de proteína, la competencia entre proteínas, el pH, la fuerza iónica, el contenido de lípidos, y el tratamiento térmico, entre otros, son algunos de los factores que influyen en las propiedades emulsionantes.

La concentración proteica influye positivamente en la capacidad emulsionante. Al incrementar la concentración el tamaño de las gotas de grasa disminuye (Pearce y Kinsella, 1978) y mejora la estabilidad (Yamauchi, 1980). Si no hay la cantidad suficiente de emulgente para cubrir completamente la interfase habrá huecos vacíos alrededor de las gotas, con lo que puede producirse la coalescencia de la gotas (McClements, 2008), pero incluso con pequeñas concentraciones, las proteínas séricas son eficientes en crear emulsiones estables (Cayot y Lorient, 1997).

Las principales proteínas del suero (β -LG, BSA, α -LA) son proteínas globulares con actividad de superficie que se emplean como emulgentes (McClements, 2008). La capacidad emulsionante de la β -LG es superior a la de las otras dos proteínas (Klemaszewski et al., 1992; Zayas, 1997), que se explica por el hecho de que, tanto la BSA como la α -LA poseen una integridad estructural que les impide una rápida dispersión en la interfase, con lo que se origina una película más débil. La β -LG por el contrario es más flexible y produce gotas más pequeñas y películas más fuertes. A nivel individual, se ha observado que a pH 7 y a 4 la capacidad emulsionante sigue este orden β -LG > BSA > α -LA, mientras que a pH 5 BSA > β -LG > α -LA (Klemaszewski et al., 1992). Kim et al. (1987) señalan que el contenido en β -LG está significativamente correlacionado con la capacidad emulsionante. De hecho, emulsiones preparadas con CPS y fracciones enriquecidas con β -LG exhiben propiedades emulsionantes aceptables y comparables, pero si las fracciones están enriquecidas con α -LA presentan peores propiedades emulsionantes (Slack et al., 1986).

En los alimentos suele haber mezclas de varias proteínas (Damodaran, 1997a). Si están presentes caseinatos y proteínas de lactosuero, se origina una competición

Introducción

para la adsorción en la interfase de agua-aceite. De este modo se ha demostrado que en mezclas de ambos tipos existe una preferencia de adsorción de los caseinatos frente a las proteínas séricas. Aunque entre las diferentes caseínas, sí se observa esta competencia, entre la β -LG y la α -LA no. Una vez que la moléculas de β -LG se adsorben, se despliegan parcialmente en la interfase y se unen lentamente por uniones intermoleculares (disulfuro), formándose una película que continua haciéndose irreversiblemente más fuerte con el tiempo (Singh, 2003). La β -LG y la BSA requieren más tiempo para formar la película interfacial que la β -caseína (Zayas, 1997). Las proteínas presentan el siguiente orden a la hora de disminuir la tensión superficial: caseínas > β -LG > α -LA > BSA (Zayas, 1997). La adsorción de las proteínas séricas a las gotas de grasa es muy selectiva (Zayas, 1997). En emulsiones estabilizadas con APS, existe una adsorción selectiva de la β -LG y la α -LA sobre la BSA y las Igs (Monahan et al., 1993). Además es más difícil de desplazar la β -LG por la α -LA en una interfase de aceite/agua, mientras que lo contrario es más fácil, porque en mezclas de ambas proteínas la β -LG está más fuertemente unida a la película que la α -LA (Cayot y Lorient, 1997).

Klemaszewski et al. (1992) señalaron que las proteínas séricas, con la excepción de la β -LG, presentaban un comportamiento emulsionante independiente del pH. Sin embargo, el pH también tiene un papel destacado en la adsorción, porque los cambios conformacionales de las proteínas son pH-dependientes (Zayas, 1997). Así, la adsorción de la β -LG a pHs entre 3 y 5 es baja mientras que la adsorción de la α -LA predomina a estos valores (Yamauchi et al., 1980). A pH entre 7 y 9 en la película interfacial predomina fundamentalmente la β -LG (Shimizu et al., 1981; Zayas, 1997) (Tabla 12).

Tabla 12: Abundancia relativa de las proteínas séricas adsorbidas en la superficie de las gotas de grasa a varios pHs. La fracción de suero proteico contenía pequeñas cantidades de caseína

PROTEÍNAS SÉRICAS	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
α -LA	48,3	24,4	11	9,9
β -LG	12,9	16,6	46,1	61,6
Caseína + Cadena ligera Ig	31,8	33,0	27,9	18,6
Cadena pesada Ig	2,3	7,0	3,4	1,5
Seroalbúmina	1,0	10,6	2,7	1,0
Transferrina + Lactoferrina	3,7	8,4	8,9	7,4

Fuente: Shimizu et al. (1981)

El pH afecta a la solubilidad, la cual está relacionada con las propiedades emulsionantes (Nakai, 1983). La solubilidad influye en las propiedades emulsionantes, ya que permite una rápida difusión y adsorción de las proteínas a la interfase (Cayot y Lorient, 1997). Sin embargo no se requiere un valor del 100%, pero si cierto grado de solubilidad para formar una película estable, ya que la presencia de proteínas insolubles, que pueden precipitar en la interfase, puede favorecer la coalescencia (Damodaran, 1997a). Cerca del pI de las proteínas del suero (entre pH 4 y 5) se puede observar un descenso de sus propiedades emulsionantes debido a la disminución de su solubilidad. Sin embargo, en el pI la capacidad emulsionante puede aumentar por el aumento de enlaces hidrofóbicos entre lípidos y proteínas (Borderías y Montero, 1988).

La relación entre la hidrofobicidad superficial y el pH también influye en la capacidad emulsionante de las proteínas. A pHs ácidos la β -LG posee una hidrofobicidad superficial mayor que a pH neutro, presentando una baja actividad superficial y baja capacidad emulsionante (Shimizu et al., 1985). El efecto del pH en las propiedades emulsionantes de esta proteína se debe a los cambios conformacionales que experimenta. Esto se explica porque a pHs ácidos su conformación es más rígida y resistente a la desnaturalización que a pH 7, donde aumenta su flexibilidad y presenta más actividad superficial (Shimizu et al., 1985), formándose una película más fuerte, y por lo tanto una emulsión más estable (Zayas, 1997).

Cuando la fuerza iónica es baja, al igual que a pHs alejados del pI, se forma una película proteica más fuerte, que proporciona mayor resistencia frente a la coalescencia (McClements, 2008); sin embargo cuando la fuerza iónica es alta o a pHs próximos al pI, las gotas están muy próximas entre sí (Kim et al., 2002), ya que la repulsión electrostática entre ellas no es lo suficientemente fuerte para vencer a las fuerzas de atracción (Kim et al., 2002; McClements, 2008) y también disminuyen las interacciones entre proteínas (Robin et al., 1993), con lo que se puede inhibir la capacidad emulsionante de los CPS (Johansen et al., 2002).

La influencia del calcio en las propiedades emulsionantes es bastante contradictoria. Algunos autores señalan que tanto el calcio como las cenizas (Patel y Kilara, 1990) están positivamente correlacionadas con estas propiedades, mientras que para Karleskind et al. (1996), el contenido de calcio no está correlacionado con estas propiedades. Por el contrario, para McCrae et al. (1999), el calcio puede provocar la floculación de la emulsión.

Introducción

Se ha señalado que los lípidos tienen efectos negativos sobre las propiedades emulsionantes de las proteínas. Así, se ha indicado que tanto la grasa libre como la ligada están negativamente relacionadas con las propiedades emulsionantes (Patel y Kilara, 1990). Karleskind et al. (1996) observaron que los CPS con bajo contenido en lípidos presentan emulsiones más estables. Blecker et al. (1997), tras la hidrólisis enzimática de la grasa residual, observaron mejoras en las propiedades emulsionantes de CPS a pH 4 y 7. Dentro de los lípidos, se ha señalado que los fosfolípidos, mono y diglicéridos, etc. (que son también surfactantes) pueden alterar la estabilidad de emulsiones que utilizan proteínas como emulgentes, ya que difunden rápidamente pudiendo, por un lado, competir con las proteínas por su unión a la interfase y, por otro lado, unirse directamente a las proteínas, de manera que pueden inducir inestabilidad o promover la agregación (Damodaran, 2005; McClements, 2008). Un tratamiento térmico no superior a 70°C hace más difícil de desplazar la β -LG de la interfase por surfactantes no iónicos (Dickinson y Hong, 1994).

Cuando se añaden carbohidratos, que mejoren o no las características emulsionantes, depende del tipo de hidrato de carbono incorporado: si se agrega glucosa o sacarosa se mejoran las propiedades emulsionantes, mientras que si se añade almidón o inulina disminuye la actividad y estabilidad emulsionante (Herceg et al., 2007).

Los tratamientos térmicos de aproximadamente 70°C o mayores, pueden afectar negativamente a las propiedades emulsionantes (Schmidt et al., 1984). Las variaciones en las propiedades emulsionantes de las proteínas séricas comerciales está muy relacionada con los procesos de elaboración que causan desnaturalización y la pérdida de solubilidad (Zayas, 1997). Si se calientan las dispersiones de CPS por encima de 70°C antes o después de la emulsificación se produce la agregación de las proteínas séricas (De Wit, 1989; Damodaran, 1997b), de manera que no pueden adsorberse rápidamente a la interfase (Cayot y Lorient, 1997), disminuye la hidrofobicidad superficial (Zayas, 1997) y la solubilidad (Damodaran, 1997b; Cayot y Lorient, 1997), lo que tiene un efecto negativo en estas propiedades (Zayas, 1997). Un tratamiento térmico moderado (y una desnaturalización limitada), que no produzca insolubilización, puede mejorar las propiedades emulsionantes de las proteínas séricas, probablemente debido al desplegamiento proteico y la exposición de grupos hidrófobos y sulfhídricos, que favorece no solo la atracción hidrofóbica, sino también la formación de puentes disulfuro entre las proteínas (Dickinson y Hong, 1994; Damodaran, 1997b; Zayas, 1997; Kim et al., 2002). La habilidad de la proteína de perder su estructura terciaria se considera normalmente un atributo positivo para un

emulgente, por lo tanto no es tan sorprendente de que la desnaturalización proteica mejore la capacidad emulsionante, siempre que la solubilidad no disminuya (Hill, 1996).

La modificación enzimática de las proteínas mejora la propiedad emulsionante (Damodaran, 2005), aumentando la estabilidad de la emulsión. Bajos niveles de hidrólisis se asocian con una mejora en esta propiedad (Foegeding y Luck, 2003).

5.4. GELIFICACIÓN

Aunque la termolabilidad es indeseable cuando se quiere preparar un producto rico en proteínas séricas, se puede explotar esta característica para la elaboración de geles mediante calor con proteínas séricas, ya que éstas poseen unas propiedades gelificantes excelentes (Mulvihill, 1992).

Los geles son coloides sólidos en líquido, en el que la fase sólida forma una estructura que inmoviliza el líquido (Tabilo-Munizaga y Barbosa-Cánovas, 2005). Exhiben un comportamiento tipo sólido (Aguilera, 1995), aunque retienen muchas de las propiedades de los componentes de los fluidos (Mulvihill y Kinsella, 1987).

La gelificación puede definirse como el fenómeno de agregación proteica en el cual las interacciones proteína-proteína y proteína-agua están tan equilibradas que se forma una red tridimensional, capaz de inmovilizar grandes cantidades de agua y de otros componentes (De Wit et al., 1988). Las propiedades del gel son el resultado de las interacciones entre la red molecular y el solvente, el agua, el cual influye en la naturaleza y la magnitud de las fuerzas intermoleculares que mantienen la integridad de la matriz, mientras que ésta retiene al agua e impide que se escape (Oakenfull et al, 1997).

La formación de geles proteicos tiene lugar en 2 etapas (véase figura 10) (Mangino, 1984; Cheftel et al., 1989; Mangino, 1992a,b; Morr y Ha, 1993; Robin et al., 1993; Matsumura y Mori, 1996; Zayas, 1997; Ordóñez et al., 1998, Sullivan et al. 2008):

1. **DESNATURALIZACIÓN:** Al calentar una proteína, los enlaces que mantienen su estructura secundaria y terciaria (puentes de hidrógeno y disulfuro), se debilitan y a cierta temperatura rompen. La ruptura de estos enlaces intramoleculares desencadena la alteración de la estructura proteica, es decir, su desnaturalización. Cuando ocurre esta desnaturalización por calor, se modifica la conformación nativa de las proteínas (a nivel de estructura secundaria, terciaria y cuaternaria), pero no va acompañada de la ruptura de los enlaces peptídicos implicados en la estructura

Introducción

primaria, produciéndose el desplegamiento de las moléculas proteicas, quedando al descubierto y disponibles para enlaces intermoleculares, grupos hidrófobos y residuos de cisteína que en la proteína nativa se encuentran orientados hacia el interior estabilizando la molécula. No se requiere una desnaturalización total (Aguilera, 1995; Oakenfull et al., 1997), que raramente ocurre por debajo de 100°C (Aguilera, 1995).

2. **AGREGACIÓN:** Se produce la asociación o polimerización entre las moléculas proteicas previamente dissociadas y desnaturalizadas, formándose una red tridimensional de proteínas, capaz de inmovilizar la mayoría del solvente, y que constituye el gel.

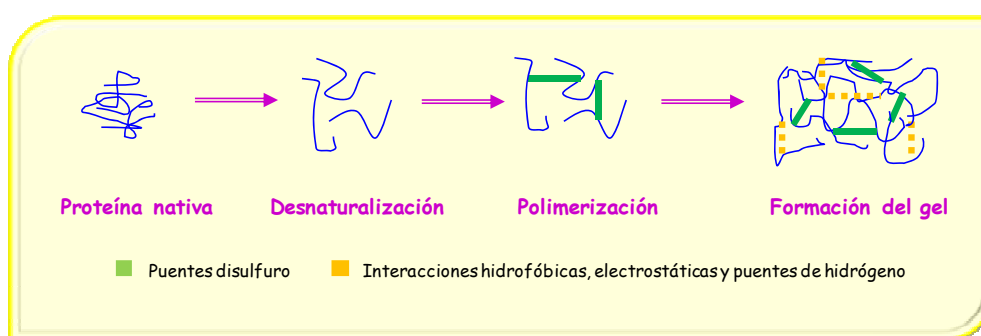


Figura 10: Representación esquemática del proceso de gelificación
(Basado en Sullivan et al. (2008))

El proceso de gelificación se completa mediante enfriamiento y conservación a bajas temperaturas, que permiten que las proteínas continúen polimerizando e interaccionando con el agua (Morr y Ha, 1993) con lo que aumenta la fuerza del gel formado y se intensifican las interacciones con el solvente (Morr y Ha, 1993).

La gelificación requiere un equilibrio entre las fuerzas de atracción (encargadas de formar la red) y las de repulsión (evitan el colapso y así ayudan a retener el agua) entre las proteínas y con el agua (Mangino, 1992a,b; Cayot y Lorient, 1997; Zayas, 1997). Si predominan las fuerzas de atracción (las interacciones proteína-proteína son muy fuertes) se forma un coágulo, se colapsará la red formada y el agua será expulsada de la estructura, pero si por el contrario predominan las fuerzas de repulsión (las interacciones entre proteínas son débiles), aumentará la viscosidad pero no se formará ningún gel verdadero (Mangino, 1992a,b; Robin et al., 1993; Matsumura y Mori, 1996). A mayor número de enlaces, mayor será la fuerza del gel formado (Damodaran, 1996; Zayas, 1997).

Los geles presentan una gran capacidad de retención de agua, que está relacionada con el tiempo invertido en la etapa de agregación con respecto a la de desnaturalización (Ordóñez et al., 1998). La velocidad con que se desarrollan ambas etapas durante el calentamiento puede jugar un rol importante en el tipo de gel formado (Damodaran, 1996; Ordóñez et al., 1998):

✓ Agregación rápida (mayor que la desnaturalización): Se produce una agregación al azar formándose un gel con baja capacidad de retención de agua, desordenado, poco elástico, y opaco.

✓ Agregación lenta (menor que la desnaturalización): Se formará un gel ordenado, transparente, elástico, con alta capacidad de retención de agua, y estable a la sinéresis y exudación.

Los geles obtenidos con proteínas séricas pueden presentar diferencias en su dureza, color, cohesividad, viscosidad y en su apariencia, de manera que puede variar, desde fluidos viscosos, a estructuras quebradizas similares a cuajadas, o geles elásticos y translúcidos (Zayas, 1997). Los geles translúcidos, débiles y elásticos se obtienen a bajas temperaturas (55-70°C) y bajas concentraciones proteicas (3-5%), mientras que a temperaturas mayores (≈ 90 °C), a altas concentraciones proteicas y en presencia de iones, se forman geles más firmes, opacos y rígidos (Schmidt y Morris, 1984; Morr y Ha, 1993; Zayas, 1997; Burrington, 2004a).

La estructura de los geles de proteínas séricas se puede clasificar en función de la carga neta de las proteínas y de la naturaleza de los agregados que forman (Figura 11) (De Wit, 1989; Doi, 1993; Kitabake y Doi, 1993):

✓ Agregados particulados: Se forman debido a una falta de repulsión electrostática entre las moléculas, particularmente, cerca del pI o por la adición de sales, con lo que se pueden originar enlaces en cualquier punto de la superficie proteica, formándose agregados esféricos de gran tamaño. Se caracterizan por ser ópticamente opacos porque las partículas son de un tamaño que dispersan fuertemente la luz.

✓ Agregados filamentosos o que forman una cadena ordenada de "cuentas": A valores de pH alejados del pI o con un nivel bajo de sales, existe una gran repulsión electrostática entre las moléculas, con lo que la mayor parte de la superficie proteica es incapaz de formar enlaces, aunque si puede unirse mediante interacciones hidrofóbicas (por la exposición de los aminoácidos no polares con el calor.) Se agregan formando estructuras filamentosas que se unen entre sí en sitios fijos de los extremos de las moléculas. Son transparentes, presentan una estructura lineal con una mejor capacidad de retención de agua que los anteriores.

Introducción

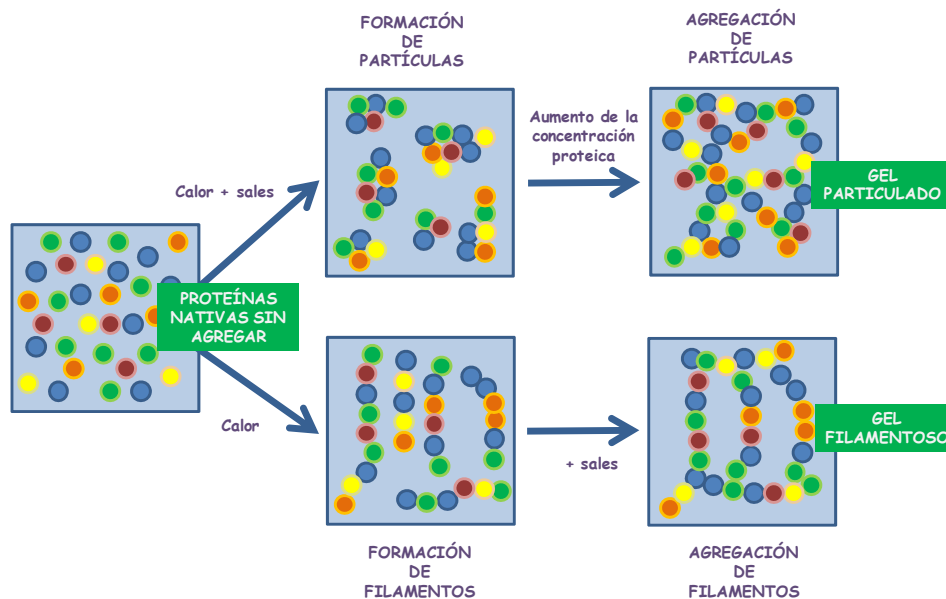


Figura 11: Esquema de los tipos de estructura de los geles proteicos (Bryant y McClements (1998))

Los geles de β -LG y de proteínas séricas se caracterizan por presentar una agregación al azar con una apariencia más turbia, a diferencia de los geles de seroalbúmina, insulina, lisozima, ovoalbúmina... que son de tipo "hilera de cuentas" con una apariencia más transparente o translúcida (Matsumura y Mori, 1996; Oakenfull et al., 1997).

Al igual que sucede en otras propiedades funcionales, en la gelificación proteica inducida por calor, influyen diversos factores, como el tipo de proteína (Kim et al., 1987; Singh, 2003) y su concentración (Mangino, 1984; Paulsson et al., 1990; Boye et al., 1995; Cayot y Lorient, 1997; Zayas, 1997; Ordóñez et al., 1998; Blecker et al., 2000; Singh, 2003), la hidrofobicidad proteica y su contenido de sulfhidrilos libres (Mangino, 1992a), factores ambientales [pH, fuerza iónica (Mangino, 1984; Paulsson et al., 1990; Mangino, 1992a; Boye et al., 1995; Cayot y Lorient, 1997; Zayas, 1997; Ordóñez et al., 1998; Singh, 2003), tipo de sal (Kuhn y Foegeding, 1991; Mulvihill y Kinsella, 1988), minerales (Brandenberg et al., 1992), concentración de calcio (Mangino, 1984; Mulvihill y Kinsella, 1988; Mangino, 1992a), lípidos (Joseph y Mangino, 1988b), lactosa (Brandenberg et al., 1992; Singh, 2003), péptidos (Brandenberg et al., 1992)] y las condiciones de elaboración [temperatura (Mangino, 1984; Boye et al., 1995; Damodaran, 1996; Zayas, 1997; Ordóñez et al., 1998), la velocidad de calentamiento (Paulsson et al., 1990; Damodaran, 1996; Zayas, 1997) y de

enfriamiento (Paulsson et al., 1990; Zayas, 1997), tiempo de calentamiento (Boye et al., 1995)].

La β -LG no sólo es la proteína más abundante en el suero, sino también el principal agente gelificante (Gunasekaran, 2008). Aunque la β -LG es la proteína fundamental que forma los geles por calentamiento, la seroalbúmina también tiene esa capacidad. Tal como se apuntó con anterioridad, la β -LG como la BSA, presentan un grupo tiol libre y 2 y 17 puentes disulfuro, respectivamente. Estos puentes disulfuro son importantes en la formación de geles de proteínas séricas (Shimada y Cheftel, 1989; Karleskind et al., 1995b), ya que durante el calentamiento se rompen, y quedan disponibles los grupos SH para la formación de enlaces covalentes intermoleculares, siendo así, los responsables de la formación de geles irreversibles de proteínas séricas (Cheftel et al., 1989). Por estos motivos, no es de extrañar, que tanto la β -LG como la BSA, están consideradas las principales agentes gelificantes en el suero, pero como la primera se encuentra 10-20 veces en mayor abundancia que la seroalbúmina, se califica a la β -LG como la proteína gelificante fundamental del lactosuero (Aguilera, 1995).

La capacidad gelificante de la β -LG mejora con la presencia de otras proteínas, y la gelificación no se produce independientemente del resto de proteínas. Bajo el efecto del calor la β -LG al desnaturalizarse puede formar complejos con otras proteínas lácteas. En mezclas de β -LG y α -LA se ha observado, que la α -LA participa en el proceso de gelificación (Gezimati et al., 1997). Los geles de α -LA son más débiles a igual concentración que geles de β -LG (Hines y Foegeding, 1993). Sin embargo, algunos autores señalan que la α -LA puede actuar sinérgicamente con la β -LG y la seroalbúmina, con lo que la α -LA y la β -LG juntas (Matsudomi et al., 1992) o mezclas de α -LA y BSA (Paulsson et al., 1986; Matsudomi et al., 1993) o entre la β -LG y la BSA (Hines y Foegeding, 1993; Matsudomi et al., 1994) forman geles más firmes que si actúa la β -LG o la BSA en solitario.

La concentración proteica determina la probabilidad de que se forme el gel y las características que tendrá. Si se encuentra por debajo de la concentración crítica no se producirá la gelificación, porque predominan las interacciones intramoleculares a las intermoleculares (Robin et al., 1993; Zayas, 1997). Por lo tanto, una concentración mínima de proteína es necesaria para que se desarrolle esta propiedad funcional, y a medida que aumenta la concentración, se producen más interacciones intermoleculares, con lo que se incrementa la fuerza del gel y disminuye, no sólo el tiempo requerido para la formación del gel (Morr y Ha, 1993; Zayas, 1997; Singh, 2003), sino también la temperatura a la que empieza a gelificar (Paulsson et al., 1986).

Introducción

La concentración mínima de proteína de los CPS para formar geles oscila entre 6 y 8% (Steventon et al., 1991; Tang et al., 1994; Britten y Pouliot, 1996; Oakenfull et al., 1997), aunque varía con factores tales como el pH de la disolución: a pH 4,5 4%, a pH 6 6-8% y a pH 7,5 8-12% (Morr y Foegeding, 1990).

La fuerza de los geles está directamente relacionada con la concentración de β -LG (Kim et al., 1987; Morr y Ha, 1993; Cayot y Lorient, 1997), mientras que con la α -LA no se encontró una relación significativa (Kim et al., 1987).

El tipo de gel formado depende del pH, que influye en el tipo y número de interacciones entre las proteínas séricas (Damodaran, 1996; Zayas, 1997) afectando a su habilidad para agregarse vía interacciones electrostáticas. A un pH óptimo (generalmente 7-8 para la mayoría de las proteínas), que permita un buen balance entre las interacciones proteína-proteína y proteína-solvente, se formará un gel con gran fuerza y buena capacidad de retención de agua. Los CPS tienen excelentes propiedades gelificantes a pH 7 (Schmidt e Illingworth, 1978). De hecho, los geles de proteínas séricas formados a pH 6-7 son más fuertes que aquéllos formados a pH 4 (Damodaran, 1996), porque a valores próximos al pI [4 -(5,5-6)], tienen carga neta 0 y tiende a agregarse vía interacciones hidrofóbicas, formándose un gel tipo coágulo o cuajada; este gel se caracteriza por ser turbio, opaco, blando y sujeto a sinéresis (baja capacidad de retención de agua), debido a la falta de fuerzas de repulsión entre las proteínas. A pHs ≥ 6 (6-7,5) se forman geles translúcidos, elásticos, con gran fuerza y resistentes, debido a la alta carga neta negativa que hay entre las moléculas, lo que les da tiempo necesario para alinearse antes de asociarse (Mangino, 1992b; Morr y Ha, 1993; Damodaran, 1996; Cayot y Lorient, 1997; Singh, 2003; Sullivan et al., 2008). A pHs por debajo de 4 (Singh, 2003) y por encima de 7 (Schmidt e Illingworth, 1978) se forman geles más débiles y quebradizos.

Las proteínas del lactosuero presentan buenas propiedades gelificantes a temperaturas de 70-90 °C. El tratamiento térmico a temperaturas $\geq 65^\circ\text{C}$ produce la desnaturalización seguida de agregación, siendo el orden aparente de desnaturalización de cada proteína individualmente: Ig > BSA > β -LG > α -LA (Schmidt et al., 1984; Morr y Ha, 1993). En general, el gel será más firme cuanto más lenta sea la velocidad de calentamiento, ya que se produce una mayor absorción del calor y las proteínas tienen tiempo suficiente para desplegarse y agregarse (Damodaran, 1996; Singh, 2003), y cuanto mayor sea la temperatura que se aplica, porque se favorece la formación de puentes disulfuro y las interacciones entre proteínas frente a las interacciones agua-proteína. Esto sucede hasta que alcanza un punto óptimo, porque

una temperatura excesiva ocasiona la escisión de los enlaces peptídicos, lo que impide la formación del gel (Damodaran, 1996; Ordóñez et al., 1998).

La presencia de lípidos puede impedir la gelificación (Mulvihill y Kinsella, 1987) al interferir en la polimerización proteica por la formación de enlaces intermoleculares hidrofóbicos (Morr, 1992a), provocando al mismo tiempo un incremento del tiempo de coagulación (Sternberg et al., 1976; Zayas, 1997). La propiedad gelificante está influenciada por la hidrofobicidad proteica (Zayas, 1997), y por ello, si los grupos hidrófobos están ocupados por los lípidos, entonces no participan en la formación de interacciones hidrofóbicas.

La lactosa y otros azúcares estabilizan y protegen a las proteínas séricas contra la desnaturalización proteica (Morr y Ha, 1993; Bordenave-Juchereau et al., 2005), aumentando la temperatura de desnaturalización de las proteínas séricas (Rich y Foegeding, 1990) o de la β -LG (Kulmyrzaev et al., 2000a; Yamul y Lupano, 2003), y por lo tanto, incrementando el tiempo y la temperatura requerida para la gelificación (Rich y Foegeding, 1990). Además los azúcares reductores, como la lactosa, con el calentamiento, pueden reaccionar con grupos aminos de las proteínas, que es lo que se conoce como reacción de Maillard (Cheftel et al., 1989).

La adición de sales promueve la agregación, vía interacciones hidrofóbicas, debido a que disminuyen la repulsión electrostática (Cayot y Lorient, 1997), ayudando a equilibrar las fuerzas de atracción y de repulsión entre las moléculas proteicas (Morr y Ha, 1993) especialmente a valores de pH lejos del pI (Singh, 2003). Los iones como el calcio, sodio y magnesio influyen positivamente en la gelificación de las proteínas séricas, favoreciendo la agregación proteica durante el tratamiento térmico, siendo el calcio el que destaca especialmente (Varunsatian et al., 1983). Este ión posee una mayor afinidad para ligarse a sitios de unión específica, protege las interacciones electrostáticas y forma puentes de calcio entre proteínas (Singh, 2003).

Los tratamientos empleados durante la elaboración de CPS y APS afectan a esta propiedad. La UF influye en la capacidad gelificante al cambiar las proporciones lactosa/proteína e iones/proteína (Zayas, 1997). La DF, utilizada para eliminar la mayoría de componentes no proteicos (lactosa e iones), se puede utilizar para producir geles más firmes, cohesivos y translúcidos (Schmidt et al., 1984) y en general mejorar la capacidad gelificante de los CPS (Zayas, 1997). Además el almacenamiento prolongado incrementa la concentración de polímeros de β -LG, como de los copolímeros de la β -LG con la α -LA (Cayot y Lorient, 1997).

Introducción

La hidrólisis enzimática de las proteínas séricas también puede usarse para cambiar las condiciones requeridas para la gelificación junto con las propiedades físicas de los geles, de forma que, al aumentar el grado de hidrólisis, los productos son más estables al tratamiento térmico y son menos propensos a la agregación. Una hidrólisis moderada mejora esta propiedad (Foegeding y Luck, 2003).

6. APLICACIONES DE LOS CONCENTRADOS Y AISLADOS DE PROTEÍNAS SÉRICAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

6.1. INTRODUCCIÓN

Los CPS y los APS se utilizan ampliamente en la industria alimentaria, no sólo por sus buenas propiedades nutricionales, sino también por las funcionales y por sus beneficios para la salud humana (Figura 12).

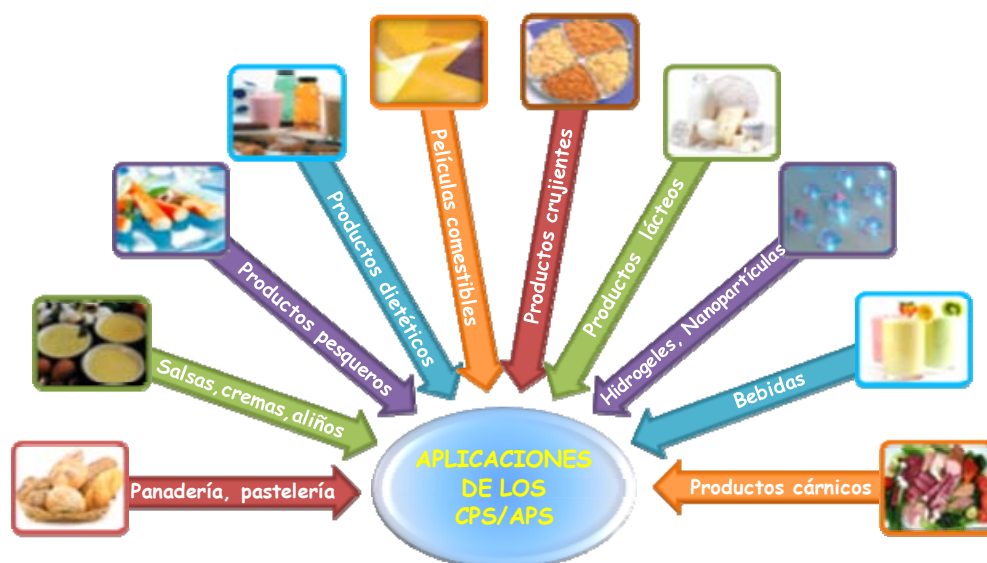


Figura 12: Aplicaciones de los concentrados y aislados de proteínas séricas

6.2. PRODUCTOS DE PANADERÍA, PASTELERÍA Y CONFITERÍA

La mayoría de propiedades funcionales que presentan las proteínas séricas son importantes en la elaboración de pan, pasteles, galletas, bizcochos, etc., al mejorar la textura, la apariencia, el volumen de la masa, el tostado de la corteza, el color, el

sabor, al conseguir una estructura de la miga más blanda e incluso retrasar el endurecimiento del pan manteniendo más tiempo su frescura (De Wit, 2003; Burrington, 2004b).

La proteína del huevo se utiliza ampliamente en la formulación de este tipo de productos. Las proteínas séricas tienen muchas propiedades en común con las proteínas del huevo pudiendo reemplazarlas parcial o totalmente en la elaboración de panes, pasteles, e incluso, en los merengues. Esto ofrece importantes ventajas económicas y una mayor aceptación por parte del consumidor (De Wit, 2003; Burrington, 2004b).



La lactosa y las proteínas del suero son un sustrato ideal para las reacciones de Maillard porque contribuyen positivamente al color en la preparación de estos productos (Jelen, 1992; De Wit, 2003) favoreciendo la aparición de un color similar al del caramelo ("marrón - dorado") (Morr, 1992b) y permitiendo durante la cocción un desarrollo más rápido del color (Burrington, 2004b). La lactosa también contribuye al sabor de estos productos particularmente durante la cocción (De Wit, 2003).

La capacidad de ligar agua que poseen es menor que la de la harina, aunque la absorción de agua aumenta a medida que se incrementa el nivel de desnaturalización proteica (Burrington, 2004b). De manera general se añade 1-2% de sólidos del lactosuero a la harina (De Wit, 2003).

Las proteínas séricas gracias a sus propiedades espumantes se utilizan en la producción de productos "con aire" como los merengues (De Wit, 2003). Aunque los CPS pueden formar excelentes espumas, su estabilidad es generalmente pobre. Así en productos como pasteles y merengues, la espuma se puede romper durante el tratamiento térmico y colapsarse (Mangino, 1992b).

Desde el punto de vista nutricional, las proteínas séricas presentan un alto contenido en lisina, mientras que las proteínas del trigo son deficientes. Si se aumenta la proporción de proteínas séricas frente a las del trigo, se mejora el perfil aminoacídico de los productos de panadería (Burrington, 2004b).

Los derivados del suero pueden reemplazar a la leche en polvo como ingredientes en la elaboración de productos como chocolate con leche, chocolates con licor, barritas y envolturas con aroma a chocolate (Morr, 1992b; Burrington, 2004b).

6.3. BEBIDAS

Las bebidas que utilizan proteínas séricas en su formulación se pueden dividir según Jelen (1992) en bebidas refrescantes, combinaciones con frutas y bebidas lácteas. Las proteínas séricas son solubles en sus pI y pueden emplearse en esos pHs, lo que hace que sean únicas para ser añadidas a bebidas ácidas, aunque también se aprovechan en bebidas con pH próximo a la neutralidad (Mangino, 1992b).

La buena solubilidad y el sabor suave de las proteínas nativas del suero en un amplio rango de pH son características importantes que permiten hacer uso de las mismas en la elaboración de bebidas refrescantes (De Wit, 2003). Como ya se comentó en el apartado 3.2.4, una de las bebidas más representativas que usan suero es el refresco carbonatado Rivella.

Además el sabor del suero es compatible con el de las frutas, especialmente los cítricos, lo que permite la elaboración de bebidas que mezclen ambos ingredientes. De este modo, se combinan los beneficios nutricionales de las proteínas séricas, junto con el contenido en calcio y riboflavina del suero con una buena fuente de vitaminas presentes en las frutas. Ejemplos de este tipo de bebidas son: Djoez y Talski de Holanda, Big M y Mango Molke Mix de Alemania, Latella de Austria o el Hedelmatarha de Finlandia (Jelen, 1992). Sin embargo pueden producirse problemas de sedimentación, debido a que las proteínas séricas manifiestan una baja estabilidad al calor y puedan interaccionar con algunos componentes de las frutas, como las pectinas (Jelen, 1992). Un requerimiento funcional para elaborar estas bebidas es que, al valor de pH y concentración deseados deben permanecer dispersas las proteínas, después del tratamiento térmico y durante el posterior almacenamiento (Foegeding y Luck, 2003). Aunque las proteínas séricas nativas presentan una mayor solubilidad que las caseínas a bajo pH, si se combina el calor y acidez se puede producir la precipitación de las proteínas. La estabilidad al calor es baja en el rango de pH 3,5-5,5, de manera que, si se acidifica las bebidas a pH 3,5 o inferior se reduce la tendencia a la precipitación proteica durante la pasteurización o la esterilización (Huginin, 2004).



Se usan tanto en la elaboración de bebidas lácteas como en los yogures bebibles (Jelen, 1992). En este tipo de bebidas proporcionan mayor cuerpo y suavidad, presentan una capacidad tampón que favorece la supervivencia de bacterias probióticas en el estómago, reducen los costes de fabricación, mejoran el sabor,

especialmente en productos bajos en grasas, sustituyen a otros estabilizantes y aumentan el contenido de proteína y calcio (Lagrange y Pasin, 2004).

6.4. SALSAS, CREMAS, MAYONESAS Y ALIÑOS

En la elaboración de salsas y cremas se puede utilizar como ingredientes las proteínas séricas, debido a su papel como emulsificantes y estabilizantes.

La principal proteína sérica, la β -LG, posee la habilidad de adsorberse en la interfase agua-aceite contribuyendo de esta manera a la formación de la salsa, aliño o crema al disminuir la tensión superficial y estabilizando el film formado en la interfase (Christiansen et al., 2004).



Hoy en día los consumidores demandan cada vez más alimentos con bajo contenido graso, lo que ha llevado a la industria alimentaria, a usar, entre otros, principalmente CPS con 34% y 80% de contenido proteico, como "mimetizadores" de grasa (ingredientes que reemplazan la grasa y tienen una estructura química diferente a ésta, como son las proteínas o carbohidratos) (Johnson, 2000). Se usan en la elaboración de salsas de bajo contenido graso que se benefician de su excelente capacidad emulsionante, su eficiente capacidad de dispersar la grasa y su alta capacidad de retención de agua, generando un producto con una buena viscosidad y opacidad, la cual se vería reducida si se disminuyese el contenido graso. Además, gracias a sus buenas propiedades gelificantes, se mejora la cremosidad y la textura de sopas y salsas con bajo contenido graso (Johnson, 2000).

Incluso presentan una buena solubilidad y propiedades emulsionantes en medios ácidos, lo que es importante para la elaboración de algunos aliños o salsas ácidas (Renner y Abd El-Salam, 1991; Johnson, 2000). También pueden reemplazar el uso de la yema del huevo en la elaboración de este tipo de productos, reduciendo de esta manera los costes económicos (Johnson, 2000).

6.5. PRODUCTOS LÁCTEOS

La industria láctea produce un amplio grupo de productos que utilizan concentrados de proteínas séricas en su formulación. Su utilización se ha incrementado significativamente, de hecho, en los Estados Unidos, el sector lácteo adquirió en los últimos años aproximadamente el 50-70% de los derivados de suero en polvo destinados al consumo humano (Tong, 2004).

Introducción

Los concentrados de proteínas séricas se utilizan como fuente de sólidos lácteos, permitiendo, no sólo aumentar el contenido sólido lácteo total de algunos productos (Lagrange y Pasin, 2004), sino también disminuir los costes económicos de usar leche en polvo en la elaboración de productos lácteos (Tong, 2004). Incluso los productos con proteínas séricas se pueden aprovechar para estandarizar el contenido proteico de la leche de partida para fabricar diferentes productos lácteos. Su sabor es complementario al de la mayoría de ellos (Tong, 2004)



Se ha señalado que los CPS se pueden añadir a la leche semi o desnatada para mejorar su calidad sensorial, la cual se puede ver mermada por el bajo contenido lipídico o de sólidos totales (Renner y Abd El-Salam, 1991).

Se pueden incorporar las proteínas séricas, tanto de forma nativa como desnaturada, en la elaboración de quesos de manera tradicional (Lawrence, 1993), lo que permite incrementar el rendimiento y el valor nutritivo, aunque en ocasiones puedan aparecer sabores y texturas poco agradables (Jameson y Lelievre, 1996). La adición en los quesos procesados y cremosos mejora la textura, siendo ésta más cremosa y con más cuerpo, mejora la apariencia y el color e incrementa el valor nutritivo al aumentar el contenido proteico y de calcio (Young, 2004a).

En la elaboración de helados pueden servir como sustitutos de otros emulsionantes, favoreciendo la incorporación de aire, proporcionando mayor estabilidad durante la descongelación, modificando el punto de congelación y permitiendo reducir los costes de elaboración al reemplazar los sólidos provenientes de la leche (Young, 2004b).



6.5.1. YOGURES

De todos los alimentos lácteos, donde se hace uso de CPS, cabe resaltar los geles de leches ácidas o los productos lácteos acidificados, que son unos de los alimentos más antiguos y populares, que se producen y consumen en el mundo. Dentro de este tipo de productos, destacan los quesos frescos de coagulación ácida (Cottage, Quarg, Tvorog, Frais), kéfir, kumiss, pero, fundamentalmente, el yogur.

La composición de la leche varía dependiendo de la raza, de la etapa de lactación, edad del animal, estación del año, alimentación... (Tamime y Robinson, 2007). Además, el nivel de caseínas presentes en la leche de vaca (~2,6%) no es suficiente para producir un gel con la fuerza necesaria que proporcione una consistencia

satisfactoria al producto (Robinson, 2003). A raíz de estos motivos, surge la necesidad de elevar el contenido de sólidos no grasos de la leche, la cual es una práctica habitual en la elaboración del yogur. Normalmente, se aumenta la concentración de proteína a 4-5% (Sodini et al., 2005, 2006) (equivalente a un 13-14% de sólidos totales) (Robinson, 2003).

Tradicionalmente, para elevar el contenido de sólidos de la leche, ésta se hervía antes de la fermentación (Park y Guo, 2006; Tamime y Robinson, 2007) para reducir el volumen hasta dos terceras partes de su valor original (Tamime y Robinson, 2007) y así concentrar la leche y modificar las propiedades de las caseínas, lo que mejoraba la viscosidad del producto final (Park y Guo, 2006). La evaporación de agua era suficiente para alcanzar el efecto deseado (Robinson, 2003), pero es un método inexacto, que aún se utiliza en algunas comunidades rurales donde la producción de yogur se produce a escala pequeña (Tamime y Robinson, 2007). Hoy en día existen disponibles otros sistemas alternativos: adición de diferentes productos lácteos en polvo (leche en polvo desnatada, mazada o suero de mantequilla en polvo, suero en polvo, CPS, caseinatos) a la leche líquida, lconcentración mediante evaporación a vacío o mediante membranas de filtración (UF, ósmosis inversa) y suplementación con proteínas no lácteas (soja, proteínas del huevo ...) (Robinson, 2003; Tamime y Robinson, 2007). En general, cuanto mayor es el nivel de sólidos de la leche de partida, mayor es la viscosidad, la consistencia (Park y Guo, 2006) y la firmeza de los yogures (Walstra et al., 2006).

Aunque de forma habitual, en el yogur, se hace uso de la leche en polvo desnatada para enriquecer la leche antes de la fermentación (Remeuf et al., 2003; Sodini et al., 2005), la utilización de CPS puede suponer una alternativa rentable (Sodini et al., 2005), ya que gracias a su bajo coste junto con su buenas propiedades nutritivas y funcionales (Schorsch et al., 2001), pueden reemplazar la leche en polvo desnatada en la formulación de yogures (Sodini et al., 2006).

Se conoce de sobra que la fortificación de la leche afecta a la firmeza y sinéresis del gel del yogur (Tamime y Robinson, 2007), pero de manera particular, la suplementación con productos del suero, fundamentalmente CPS, en la formulación de yogures y geles ácidos presenta numerosas ventajas y beneficios, tales como:

- ✓ Se enriquece nutricionalmente (Huginin, 2004), se mejoran los atributos sensoriales (Tamime y Robinson, 2007), el sabor, la textura y la consistencia (Huginin, 2004) adquiriendo una textura más suave y una mejor apariencia que los yogures fortificados con caseínas o leche en polvo desnatada (Huginin, 2004).

Introducción

✓ Aumenta la viscosidad, la firmeza y se reduce la sinéresis (Hugunin, 2004; Tamime y Robinson, 2007).

✓ Aportan no sólo, efectos nutracéuticos debido a los péptidos bioactivos generados durante la fermentación, sino también efectos prebióticos, al manifestar una alta capacidad tampón a bajos valores de pH y una baja capacidad tampón a altos valores, con lo que se minimiza la destrucción de las bacterias probióticas en el estómago y se incrementa la actividad enzimática en el tracto gastrointestinal (Hugunin, 2004).

✓ Reducen el tiempo de gelificación, aumenta el pH de gelificación y se incrementa el valor del módulo elástico de los geles ácidos (Lucey et al., 1999).

A pesar de todas estas ventajas, la adición de proteínas séricas, si no va acompañada de un tratamiento térmico previo de la leche, no resulta eficaz. Las proteínas séricas desnaturalizadas, al contrario que las proteínas séricas nativas, son insolubles en su pI, por ello juegan un papel importante en la estructura del gel formado durante la acidificación (Bikker et al., 2000; Graveland-Bikker y Anema, 2003; Anema et al., 2004; Anema, 2008).

Durante la acidificación, las proteínas séricas desnaturalizadas, tanto unidas a la micelas de caseína como las que están disueltas en el suero (Lucey et al., 1997a, Lucey y Singh, 1998), pueden agregarse a medida que el pH de la leche se aproxima a su pI, y contribuir a la estructura del gel (Lucey et al., 1997a; Lucey y Singh, 1998, Bikker et al., 2000; Graveland-Bikker y Anema, 2003; Anema et al., 2004). Esto provoca un aumento de la firmeza y viscosidad del gel, la reducción del tiempo de gelificación, minimiza la sinéresis, aumenta el tamaño de las micelas y estabiliza el gel (Tamime y Robinson, 2007).

Así la adición de proteínas séricas a la leche (por ejemplo mediante la adición de CPS) previa a su tratamiento térmico, provoca que las proteínas séricas desnaturalizadas puedan interaccionar con las micelas de caseína o con las proteínas séricas nativas de la leche (Lucey et al., 1999).

6.6. PRODUCTOS CÁRNICOS

En la elaboración de productos cárnicos, las proteínas han de poseer dos propiedades funcionales que son de particular importancia: la capacidad de retener agua y la capacidad de formar y estabilizar emulsiones (De Wit, 2003), siendo muy común el uso de ingredientes de origen lácteo en la preparación de productos cárnicos para reemplazar o suplementar las proteínas cárnicas.

En los productos tratados por calor, las propiedades gelificantes de los CPS son importantes para la formación de una red que atrapa el agua y los lípidos, evitando las pérdidas de humedad, y modificando la textura (dureza, elasticidad, cohesividad) (Mangino, 1992b; Keeton, 2004; Kurt y Zorba, 2005). Sin embargo, según Zayas (1997), la incorporación de CPS en carnes procesadas está limitada por las diferencias de las propiedades térmicas entre las proteínas séricas y miofibrilares, puesto que el CPS requiere una temperatura de 80° para la gelificación mientras que los geles de miosina 60°C y, según este autor, a las temperaturas que se produce este tipo de productos cárnicos (68-70°C) no se produce una gelificación efectiva de los CPS (Zayas, 1997). No obstante, hay que tener en cuenta que un producto cárnico es un sistema muy complejo en el que hay que tener en cuenta otros factores como la interacción entre proteínas, presencia de sales, etc. que pueden afectar a la gelificación de las proteínas séricas.



Otros efectos de las proteínas séricas en la elaboración de productos cárnicos son el aumento de viscosidad con el tratamiento térmico, que unido al incremento de la capacidad de unión de agua, proporciona cuerpo y textura a la carne, mejora la jugosidad y las características del loncheado; la mejora de la apariencia visual a través de reacciones de Maillard en productos cárnicos con bajo contenido en grasa o en productos con carne de ave; la mejora del sabor y las mejoras nutritivas por ser una buena fuente de calcio y de aminoácidos esenciales (Keeton, 2004).

En algunos productos cárnicos como las hamburguesas o las salchichas tipo Frankfurt, debido a su alto contenido graso, se han usado proteínas séricas para reemplazar la grasa, con lo que se consigue no sólo mejorar la aceptación al reducir el contenido lipídico sino también la mejora de sus propiedades funcionales y nutricionales (Keeton, 2004).

6.7. PRODUCTOS PESQUEROS



Los productos pesqueros tipo gel, como los derivados del surimi, utilizan las proteínas séricas por su capacidad de formar geles y de retener agua, y así modificar y mejorar su textura. Además son capaces de inhibir las enzimas proteinasas responsables de la hidrólisis de las proteínas miofibrilares. La adición de un 3% de CPS con un 80% de contenido proteico se ha visto que inhibe de forma muy efectiva esta actividad enzimática (De Wit, 2003; Keeton, 2004).

Introducción

En la fabricación de derivados del surimi se puede utilizar también almidón de patata, proteína de plasma bovino o de huevo, que pueden ser reemplazados o complementados por las proteínas del lactosuero, puesto que algunas formas de proteínas del plasma bovino producen sabores desagradables en concentraciones superiores al 1%, el almidón de patata puede producir un color no deseable y las proteínas del huevo, que normalmente son de mayor valor económico, tienden a desencadenar un olor indeseable cuando se usan los niveles requeridos para inhibir las proteasas (Keeton, 2004).

6.8. APERITIVOS Y BARRAS ALIMENTICIAS

La extrusión de los CPS o APS junto con almidón de maíz, almidón de trigo, harina de arroz o harina de cebada se emplea en la fabricación de diferentes productos "crujientes" como son los aperitivos o snacks, los cereales de desayuno o las barras alimenticias (Burrington, 2004a). Dentro del grupo de los snacks podemos incluir productos con un sabor tanto dulce como salado y una textura blanda o crujiente (Johnson, 2004). La percepción general que existe de este tipo de productos, usados como aperitivos o tentempiés, es que contribuyen a la alta incidencia tanto de la diabetes como de la obesidad a nivel mundial por su alto contenido energético y en almidón y por su bajo aporte de nutrientes. Para mejorar el contenido proteico y, por lo tanto el valor nutricional de estos productos, se han incorporado proteínas séricas en su formulación (Pordesino y Onwulata, 2008). Los CPS también pueden mejorar el sabor, la apariencia, la textura y el color de los snacks (Johnson, 2004).



Las barras alimenticias han experimentado uno de los más rápidos y explosivos crecimientos en el mercado alimentario (Bouzas, 2004b). La textura de este tipo de productos está muy influida por el tipo de proteína usado en la formulación (Bouzas, 2004b). De manera tradicional se caracterizaban por ser muy densas y duras, lo que es una característica típica por usar altos niveles de proteína en un producto de humedad intermedia. El desarrollo de la extrusión en la fabricación de productos alimentarios, primero con soja y más recientemente con proteínas séricas, ha contribuido a variar la textura de estos productos (Burrington, 2008). Las barras hechas con proteínas lácteas, especialmente con APS, son más flexibles, moderadamente firmes y crujientes (Bouzas, 2004b; Burrington, 2008).



6.9. PRODUCTOS FUNCIONALES Y DIETÉTICOS

Las proteínas séricas se han convertido en la proteína que se escoge para mejorar el valor nutritivo de muchos productos alimenticios debido a las pruebas que avalan sus beneficios en la salud junto con una adecuada capacidad para formar parte de la formulación de numerosos alimentos (Berry, 2006). Se emplea el lactosuero, principalmente, por ser una fuente de proteína de alta calidad y de péptidos bioactivos (Lloyd, 2004).

La leche humana es el alimento ideal para los recién nacidos. Los alimentos para lactantes se basan generalmente en la leche de vaca como sustituto de la leche humana (De Wit, 2003), sin embargo la leche bovina no tiene la misma composición que la leche humana (Lloyd, 2004). Desde que a principios de los años 70 se descubrió que los productos para lactantes con suero podían simular la leche humana, se han desarrollado muchas fórmulas infantiles que contienen lactosuero (De Wit, 2003). De esta manera se añaden proteínas séricas a la leche de vaca para alcanzar el alto contenido de estas proteínas en la leche humana (la relación proteínas séricas : caseína en la leche humana es de 60:40 frente a 18:82 en la leche de vaca) y también para aumentar el contenido de α -LA (que también se encuentra en mayor proporción en la leche humana) y lactoferrina de la leche de vaca (Lloyd, 2004).



Para niños con alergias a las proteínas de la leche de vaca, se usan hidrolizados de proteínas del suero que impiden la aparición de los síntomas y presentan ciertas ventajas (mejor olor, sabor y proteínas de mayor valor biológico) frente a los hidrolizados de caseínas, utilizados tradicionalmente (Lloyd, 2004). La hidrólisis enzimática produce péptidos con estructuras diferentes a la proteína intacta, con lo que se puede reducir la capacidad alergénica (Foegeding y Luck, 2003).

A medida que la edad avanza, la actividad física disminuye y se necesita menos aporte de energía en la dieta; sin embargo, la incorporación de concentrados de proteínas séricas en alimentos destinados principalmente a personas de edad avanzada se considera muy importante porque son una fuente de proteínas de alta calidad y de calcio biodisponible (De Wit, 2003).

Se utilizan también en la elaboración de productos dietéticos y para deportistas debido a su excelente composición aminoacídica y su bajo contenido de grasa (De Wit, 2003). Poseen además una gran proporción de aminoácidos ramificados que

Introducción

en las células musculares favorecen la síntesis proteica y pueden ser metabolizados en el músculo para ser usados como fuente de energía durante un ejercicio físico prolongado. Por lo tanto se destinan las proteínas séricas habitualmente en la formulación de alimentos y bebidas para deportistas (Walzem, 2004).

6.10. PELÍCULAS COMESTIBLES

Desde hace mucho tiempo se han utilizado películas comestibles en la conservación de alimentos. Las ceras fueron uno de los primeros productos en ser utilizados para este fin, junto con los lípidos y resinas. Hoy en día, se emplean también biopolímeros de hidratos de carbono o proteínas. La principal ventaja que presentan este tipo de películas es que son biodegradables, siendo una alternativa a los envases plásticos respetuosa con el medioambiente (Dangaran y Krochta, 2008).

Las películas a base de proteínas pueden retrasar la pérdida de humedad, presentan una buena barrera contra el oxígeno, muestran una buena fuerza de tensión y una moderada elongación, son flexibles, y generalmente no presentan ningún sabor ni olor (Khwaldia et al., 2004). Entre las proteínas utilizadas destacan las del lactosuero, siendo la β -LG la principal responsable de la formación de estas películas. En la industria alimentaria se utilizan como barreras frente al oxígeno o como transportadores de antioxidantes en productos con nueces o cacahuetes que son susceptibles de oxidación lipídica, para alargar la vida útil de los huevos al actuar como una barrera frente a las pérdidas de humedad y de gases como el CO_2 , para transportar agentes antimicrobianos en los productos cárnicos, para evitar el pardeamiento en frutas y vegetales frescos y cortados y para mejorar el brillo en productos de confitería. También se pueden aplicar a los tradicionales materiales de envasado (papel y plástico) para mejorar sus propiedades, al reducir la permeabilidad al oxígeno o impedir la migración del aceite (Dangaran y Krochta, 2008).

6.11. HIDROGELES Y SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS

Las proteínas séricas se pueden usar como hidrogeles o sistemas de nanopartículas para la encapsulación y la liberación controlada de compuestos bioactivos. Los hidrogeles se pueden definir como una red tridimensional que posee la habilidad de hincharse con el agua, mantener su forma física y retener una fracción significativa de agua dentro de su estructura. Además cuando se someten a pequeñas variaciones medioambientales (pH, temperatura, fuerza iónica...) pueden hincharse, contraerse, doblarse o probablemente degradarse. Las nanopartículas son una densa red polimérica de partículas con un tamaño inferior a $100 \mu m$ en la que se puede

dispersar totalmente una molécula. Las nanopartículas permiten atrapar en su interior drogas o compuestos activos pero que no están unidos químicamente a ellos (Gunasekaran, 2008).

Se pueden usar proteínas séricas en la fabricación de hidrogeles y nanopartículas, porque por un lado, la β -LG es no sólo el componente proteico más importante sino también el principal agente gelificante, estable a bajos pHs y muy resistente a la degradación proteolítica en el estómago y por otro lado, presentan la ventaja de que son totalmente biodegradables y no se necesita la presencia de ningún agente químico que permita la formación de enlaces durante su elaboración. Estas ventajas son dos de los principales requerimientos para el amplio uso de los hidrogeles, tanto en la industria farmacéutica como en la industria alimentaria. Los hidrogeles preparados con proteínas séricas exhiben una capacidad de hincharse sensible al pH, sobre todo por encima del pI. Se han preparado también nanopartículas con β -LG, que al ser más pequeña y menos hidrofóbica que la BSA, es una buena candidata para elaborar este tipo de partículas. Las nanopartículas de β -LG son más estables en condiciones neutras que en ácidas tanto en presencia como en ausencia de enzimas proteolíticas (Gunasekaran, 2008).

La producción de quesos de oveja y cabra origina una elevada cantidad de suero que no se aprovecha para la obtención de estos concentrados y genera un problema de contaminación medioambiental. Los lactosueros de estas especies presentan diferencias importantes en su composición respecto a los de vaca, siendo además también distintos entre sí. De estas diferencias merece la pena destacar las relacionadas con las proteínas séricas, ya que son las responsables de las propiedades funcionales y, por tanto, de su aplicación en la elaboración de alimentos. Así, el suero ovino contiene más proteínas séricas que el resto de sueros (Law, 1995; Casper et al., 1998), siendo las proporciones de las proteínas diferentes según la especie estudiada, lo que puede influir en las propiedades emulsionantes, espumantes y gelificantes. Casper et al. (1998) señalan que, en relación con el lactosuero bovino, el caprino presenta una mayor proporción de α -lactalbúmina y menor de seroalbúmina, inmunoglobulina G y β -lactoglobulina, mientras que en el suero ovino la proporción de β -lactoglobulina es mayor y la de seroalbúmina e inmunoglobulina G es menor que en el del vacuno. Estos autores también señalan diferencias entre los lactosueros ovino y caprino, destacando el alto porcentaje de α -lactalbúmina en el lactosuero caprino, proteína relacionada con buenas capacidades emulsionantes, y la alta proporción de β -lactoglobulina en suero ovino, que puede mejorar las propiedades espumantes, gelificantes y emulsificantes (Casper et al., 1998). Moatsou et al. (2005) comparan los sueros bovinos, ovinos y caprinos, señalando que la principal característica del suero ovino es su menor porcentaje de α -lactalbúmina mientras que los caprinos presentan una baja proporción de β -lactoglobulina. Igualmente, las proteínas tanto de sueros ovinos como caprinos se ha señalado que poseen un valor nutricional mayor si se compara con las del lactosuero bovino (Moulin y Gazly, 1984).

También hay diferencias entre especies en su comportamiento ante el tratamiento térmico, lo cual puede influir en sus propiedades funcionales. Así, se han encontrado diferencias en el ritmo de desnaturalización de las proteínas séricas con el tratamiento térmico entre las proteínas de vacuno, ovino y caprino (Law, 1995; Pintado y Malcata, 1996), las cuales es previsible que se correspondan con comportamientos diferentes en la formación de geles inducidos por calor.

Los concentrados de proteínas de lactosuero (CPS) son ingredientes de elevada utilidad en la elaboración de numerosos alimentos; sin embargo, prácticamente la totalidad de los que se emplean actualmente en la industria son de origen bovino. Si bien los CPS bovinos están bien estudiados, no es el caso de los ovinos y caprinos. De los escasos estudios realizados sobre ellos, se ha observado que sus características son diferentes de las de los CPS bovinos, presentando los CPS de ovino y caprino

Justificación y Objetivos

mejores propiedades funcionales, lo cual se puede atribuir a diferencias en su composición. Pintado et al. (1999) caracterizaron concentrados de proteínas séricas de oveja, vaca y cabra obtenidos por diálisis, encontrando diferencias entre ellos en la composición química y en sus propiedades físicas. Así, los concentrados bovinos presentan menor contenido de proteína y mayor de lactosa, calcio y potasio que los de cabra y oveja. Los de cabra presentan un mayor contenido de lactosa y menor de proteína que los de oveja. También observaron diferencias en las proporciones de las proteínas séricas, mostrando los ovinos la mayor proporción de β -lactoglobulina, los bovinos de α -lactalbúmina y los caprinos de inmunoglobulina G. Estas diferencias en composición (concentración de sales, azúcares, lípidos, proteínas, pH) afectan a las propiedades funcionales de estos concentrados de proteínas séricas como la gelificación, siendo los geles más firmes en los de oveja y cabra que en los de vaca (Pintado et al., 1999). Casper et al. (1999), únicos autores que emplearon la ultrafiltración en la obtención de los concentrados, señalan la superioridad de los CPS de oveja y cabra respecto a los bovinos en lo que se refiere a su capacidad espumante y gelificante.

La aplicación de la ultrafiltración tras un pretratamiento de clarificación del suero (agregación termocálcica seguida de eliminación de estos agregados por decantación, centrifugación o microfiltración) permite obtener concentrados de proteínas de lactosuero de estas especies con propiedades funcionales mejoradas para su uso industrial respecto a los no tratados. El proceso de clarificación genera como subproducto unos agregados con una utilidad potencial en la elaboración de alimentos.

El grupo de investigación donde se ha realizado esta Tesis Doctoral es el único que ha trabajado hasta el momento en la obtención de CPS ovinos mediante clarificación por agregación termocálcica y microfiltración de los sueros previa a la ultrafiltración, así como en el estudio de las propiedades funcionales de los CPS obtenidos y de los retenidos de microfiltración que aparecen como subproducto de clarificación comparándolos con CPS sin clarificar. Este pretratamiento, aplicado originalmente al lactosuero bovino, tiene como finalidad eliminar fosfolipoproteínas, uno de los compuestos causantes del colmatamiento de las membranas de ultrafiltración y de una disminución de su rendimiento, siendo además perjudiciales para algunas propiedades funcionales de los CPS (Pearce et al., 1991; Karleskind et al., 1995a). Se considera además que las fosfolipoproteínas extraídas podrían además tener propiedades funcionales interesantes, principalmente como emulsionantes, según mencionan algunos autores; sin embargo apenas han sido investigadas, ni

siquiera las procedentes de lactosuero bovino (Maubois et al., 1987; Pearce et al., 1991).

Así, se ha estudiado (Pereira et al., 2002) la viabilidad tecnológica de la clarificación de lactosueros de oveja por el procedimiento antes mencionado empleando membranas de microfiltración. Este pretratamiento mejoró el tratamiento de ultrafiltración posterior. También se estudiaron propiedades funcionales de los CPS sometidos a clarificación, comparándolos con los obtenidos de suero sin pretratar, así como las de los retenidos de microfiltración (Díaz et al., 2004; 2006). El tratamiento de clarificación incrementó la solubilidad de los CPS, los cuales presentaron además propiedades espumantes, capacidad de la cual carecen los CPS procedentes de suero sin clarificar. Por otra parte, los retenidos de microfiltración mostraron una aceptable actividad emulsionante. El proceso de clarificación también disminuyó la concentración necesaria para producir geles por calentamiento. Por lo tanto se puede decir que estos CPS y los retenidos de microfiltración muestran propiedades funcionales de interés para su aplicación como ingredientes en la industria alimentaria. Así, se ha observado su utilidad en la adición de los CPS de oveja en el requesón, obteniendo mayores rendimientos sin que se vea afectada la firmeza del producto (Pereira et al., 2007).

Como se ha comentado anteriormente, los trabajos sobre la obtención de concentrados de proteínas séricas de cabra son escasos y no hay estudios sobre la aplicación de la ultrafiltración tras un pretratamiento de clarificación del suero (agregación termocálcica seguida de eliminación de estos agregados) en la obtención de CPS de sueros de cabra, ni sobre su posible aplicación en la industria alimentaria.

Teniendo en cuenta estas premisas, **esta Tesis Doctoral tiene los siguientes objetivos:**

1. Obtener concentrados de proteínas séricas de cabra elaborados mediante ultrafiltración/diafiltración a partir del suero de quesería.
2. Utilizar la precipitación termocálcica seguida de separación de los agregados previa a la ultrafiltración/diafiltración para obtener concentrados de proteínas séricas de cabra a partir de suero de quesería y observar su efecto en los correspondientes flujos de ultrafiltración/diafiltración, comparándolos con los medidos en el proceso realizado en sueros sin clarificar.

Justificación y Objetivos

3. Determinar la composición química general, lipídica y proteica de los concentrados señalados en los objetivos anteriores, con el fin de determinar la influencia en la composición de la realización de la precipitación termocálcica seguida de separación de los agregados, comparando los resultados con un concentrado de proteínas séricas comercial bovino.

4. Estudiar las principales propiedades funcionales o tecnológicas (solubilidad, propiedades emulsionantes y espumantes, capacidad gelificante) de los CPS obtenidos, también comparándolos con las propiedades del concentrado de proteínas séricas comercial bovino.

5. Efectuar las mismas determinaciones señaladas en los objetivos 3 y 4 en los agregados obtenidos (subproductos de la clarificación) para evaluar su posible utilidad en la elaboración de alimentos, lo que aumentaría el interés de aplicar el tratamiento de clarificación.

6. Realizar un primer aprovechamiento de los tres tipos de productos obtenidos a partir del suero de cabra, principalmente de los concentrados de proteínas séricas, en la elaboración de alimentos; para ello se elaboraran geles ácidos con leche (tipo yogur) y salsas, estudiando los efectos de su adición y comparándolos con el concentrado de proteínas séricas comercial de origen bovino analizado anteriormente.

1. MATERIAL DE LABORATORIO

1.1. APARATOS Y MATERIAL GENERAL

La ultrafiltración y la diafiltración tanto del suero clarificado como del que no se clarificó se realizó de forma discontinua usando un equipo formado por un sistema de flujo tangencial "Centramate lab" equipado con una membrana "Omega" de polietersulfona con un área superficial de 0,09 m² y 10 kDa de punto de corte (Pall Corporation, Ann Arbor, MI, USA). Para los experimentos de microfiltración, en el mismo equipo, se utilizó una membrana "Omega" de polietersulfona con un área superficial de 0,093 m² y de un tamaño de poro de 0,65 µm (Pall Corporation, Ann Arbor, MI, USA).

La liofilización de las muestras líquidas se realizó en un liofilizador "Labconco".

Los productos deshidratados obtenidos a partir del suero caprino se envasaron a vacío usando una envasadora "Stephan Alvac" modelo 190.

En la determinación del extracto seco se empleó una estufa "Indelab" modelo IDL AI 80.

Se utilizó un horno mufla "Heraeus" modelo MR 170 para la determinación del contenido de cenizas.

En las homogeneizaciones de las muestras con la mezcla de disolventes para la extracción de la grasa y en la preparación de emulsiones y salsas, se empleó un homogeneizador Polytron mod. 15/30 PT, dotado de un vástago mod. PTA 20 TS (Brikman Instruments, Westbury, USA). Posteriormente en la preparación de las emulsiones se hizo uso de un homogeneizador de presión "Rannie" modelo MINI-LAB tipo 8.30H.

Las centrifugaciones realizadas durante la extracción lipídica, la separación de los agregados del líquido de filtrado, la evaluación de la solubilidad proteica, la determinación de la estabilidad de emulsiones, salsas, y para la sinéresis de los geles ácidos se llevaron a cabo en una centrífuga refrigerada "Hettich" modelo Universal 16R equipada con un rotor angular modelo TT1616.

La determinación del contenido proteico por el método de Kjeldahl se realizó en un equipo de digestión "Büchi" modelo K-424 y la destilación en un aparato "Büchi" modelo B-324.

Material y Métodos

Se utilizó una centrífuga Funke Gerber y un Rotavapor "Büchi" modelo R-210 para la determinación de grasa mediante el método Röse-Gottlieb.

Las medidas espectrofotométricas realizadas para determinar el contenido de calcio, lactatos, proteína por el método de Bradford, turbidez de las emulsiones y evaluar la solubilidad proteica se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV-V "Zuzi" modelo UV-4210/50. Para las lecturas en el espectrofotómetro se usaron cubetas "Kartell" y "Plastibrand".

La determinación del pH se realizó mediante un pHmetro de mesa "Crison" modelo GLP 21 empleando un electrodo "Crison" y una sonda termométrica.

La evaporación de los disolventes tras el fraccionamiento lipídico por extracción en fase sólida se realizó en un concentrador centrífugo a vacío "Univapo 100/150H" conectado a una bomba de vacío "Unijet II" (UniEquip, Munich).

Para la cromatografía de gases se utilizó un cromatógrafo "Hewlett Packard" modelo 5890, provisto de un detector de ionización de llama (FID) y un registrador-integrador "Hewlett Packard" modelo 3394 A. Para la inyección se usaron microjeringas "Hamilton".

Los análisis de RP-HPLC se realizaron en un cromatógrafo líquido "SHIMADZU" que constaba de un módulo de bombas modelo LC-10AT, una válvula de control de gradiente de flujo de baja presión modelo FCV-10 AL VP, un detector espectrofotométrico ultravioleta-visible modelo SPD-10AV y un ordenador para el manejo del sistema y análisis de datos. Para la filtración de las muestras se usaron filtros de jeringa de Nylon "Sartorius" modelo 17846-100 de 0,45 μm de diámetro de poro y 25 mm de diámetro y para los patrones filtros de jeringa "Whatman" de 13 mm de diámetro y 0,45 μm de diámetro de poro. Para la inyección en el RP-HPLC se usaron microjeringas "Hamilton".

El equipo de ultrasonidos "Selecta" modelo Ultrasons-H se aprovechó para la desgasificación de los eluyentes usados en HPLC.

En la formación de espumas se utilizó una batidora "Braun" modelo MR550.

Para las determinaciones reológicas de salsas, geles térmicos y geles ácidos, se recurrió a un reómetro de stress controlado "Haake Fisons" modelo RS 100 Rheostress, equipado con sistema de medición, unidad electrónica de control para el sistema de medidas, sistema de termostatación y ordenador para el manejo del sistema y análisis de datos.

La determinación del color de las salsas, geles térmicos y ácidos se realizó en un espectrocolorímetro X-Rite, modelo SP60.

Para la incubación a 40°C de las muestras de geles ácidos en tubos de centrífuga se empleó una estufa "Indelab" modelo CI-80.

El estudio de la microestructura de los geles térmicos se realizó en un microscopio electrónico de barrido "Jeol" modelo JSM-6360LV. El secado por punto crítico con CO₂ se realizó en un equipo "Bal-Tec", modelo CPD 030 Critical Point Drier y para la metalización con una aleación de Au-Pd se utilizó el aparato "Bal-Tec" modelo SCD 005 Sputter Coater.

Las pesadas de precisión se realizaron en una balanza analítica "A&D Instruments" modelo HR-120 y para las pesadas ordinarias se empleó una balanza electrónica "Heraeus" modelo ADP-360.

Se utilizaron baños "Selecta" con termostato "Selecta" modelo Tectrón 200 y termómetros de alcohol y electrónicos "Oregon Scientific" modelo 5987.

Se hizo uso de agitadores magnéticos con calentamiento "Bibby" modelo HC-502, "Velp Scientifica" modelo ARE y un vortex "Heidolph" modelo REAX 2000.

El agua Milli-Q necesaria para la diafiltración y la preparación de las diferentes disoluciones se consiguió mediante los aparatos "Millipore" modelo Milli-Q academic y modelo Milli-Q PLUS. El agua destilada utilizada durante las extracciones lipídicas, la elaboración de salsas y para la limpieza de la membrana de ultrafiltración y del homogeneizador "Rannie" se obtuvo con el aparato "Millipore" modelo Rios 5.

El hielo necesario para el baño de agua-hielo empleado para el enfriamiento de las muestras durante la clarificación, y en la formación de geles ácidos lo proporcionó la máquina de hielo "Servematic".

La conservación de las muestras en refrigeración se realizó en frigoríficos "Lynx" y "Zanussi" y en cámaras frigorífica "Zanotti", mientras que las muestras mantenidas en congelación se conservaron en arcones "Superser" y "Lynx".

Se utilizaron pipetas automáticas "Nahita", "Gilson" y "Digipette", material general de laboratorio (desecadores, tijeras, pinzas, espátulas...) y material de vidrio "Pirex" y "Alamo".

Material y Métodos

1.2. REACTIVOS Y DISOLVENTES

Todos los productos químicos utilizados en este trabajo fueron de calidad analítica, suministrados por "Panreac", "Sigma-Aldrich" y "Fluka".

1.3. GASES

El nitrógeno utilizado para evaporar los disolventes orgánicos fue suministrado por Air Liquide. Los empleados para cromatografía de gases (nitrógeno, aire e hidrógeno), todos ellos de alto grado de pureza, procedían de la firma Praxair.

1.4. SOPORTES CROMATOGRÁFICOS

Para la separación de las fracciones lipídicas se utilizaron minicolumnas de polipropileno para extracción en fase sólida "Supelclean", rellenas de LC-NH₂ (aminopropil) y de 1 ml de capacidad, suministradas por "Supelco".

Como soporte para la cromatografía en fase gaseosa se empleó una columna capilar de 30 m de longitud y de un diámetro interno de 0,25 mm, empaquetada con OV-225 (0,1 µm) sobre sílica fundida.

Para el RP-HPLC se utilizó como soporte una columna "Source" modelo 15RPC ST 4.6/100 de Amersham Biosciences.

2. MÉTODOS

2.1. ORIGEN DE LAS MUESTRAS

Se usaron 2 tipos de muestras:

☆ Suero de origen caprino procedente de la elaboración de queso de cabra en la quesería Chivaca sita en Currelos (Lugo). La leche de partida provenía de 2 razas: Alpina y Saanen, cuya alimentación consistió en ensilados de hierba, heno, harina de cebada y maíz, pero fundamentalmente, pastoreo al aire libre.

☆ Concentrado de proteínas séricas de origen bovino (CPS bovino). Producto comercial Protarmor 800 de Armor Proteins (Saint-Brice en Coglés, France).

En las tablas 13 y 14 se muestran las características del concentrado proteico comercial (Protarmor 800), proporcionadas por el fabricante.

Tabla 13: Composición (%) del Protarmor 800

COMPOSICIÓN (%)	
Proteína	77,0
Carbohidratos totales	9,0
- <i>Fibra dietética</i>	0,0
- <i>Azúcares</i>	9,0
Lípidos totales	3,5
- <i>Grasas saturadas</i>	1,7
- <i>Grasas poliinsaturadas</i>	0,13
- <i>Grasas monoinsaturadas</i>	0,77
- <i>Colesterol</i>	146 mg

Tabla 14: Contenido de minerales (mg/100g de polvo) del Protarmor 800

MINERALES (mg/100g polvo)	
Sodio	700
Potasio	330
Calcio	400
Magnesio	45
Cloro	400
Hierro	0,8
Fósforo	300

2.2. ELABORACIÓN DEL QUESO DE CABRA Y TOMA DE MUESTRAS

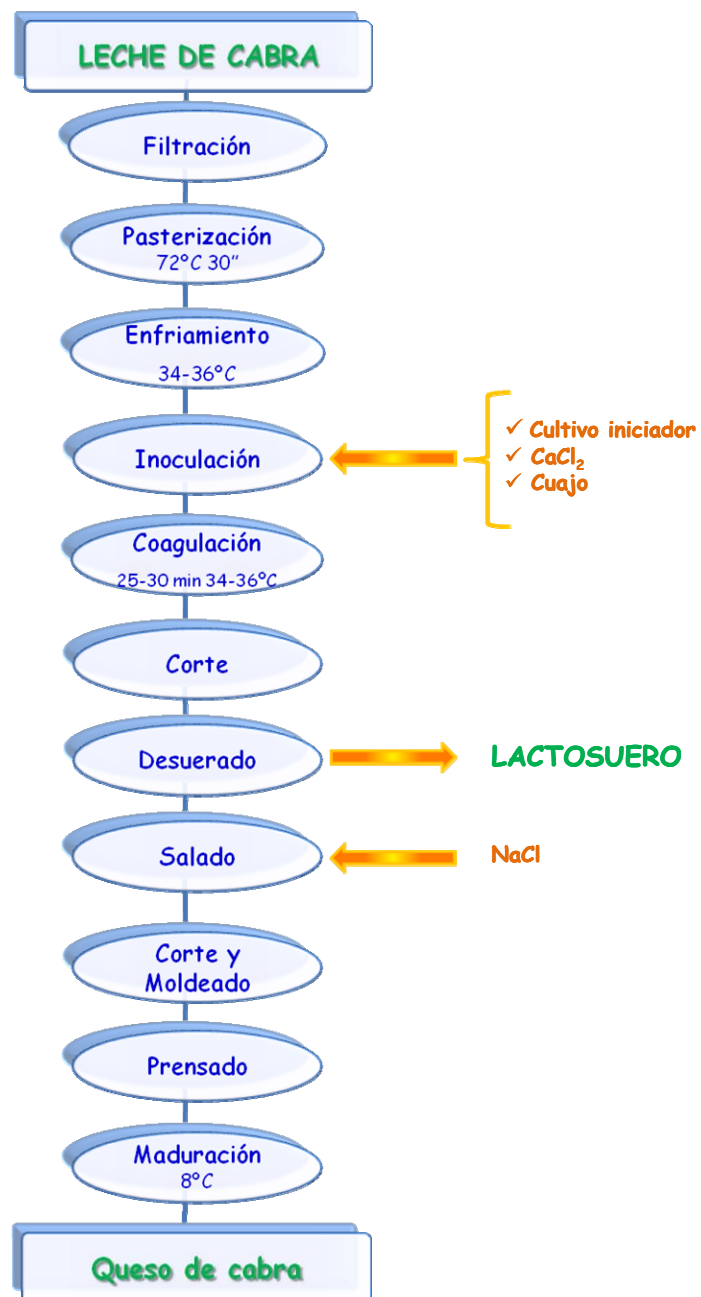


Figura 13: Esquema de elaboración del queso de cabra de la quesería Chivaca.

Tras el ordeño de las cabras, la leche se transportó en cántaras hasta el tanque de almacenamiento donde se almacenó a temperaturas de refrigeración hasta su uso.

Posteriormente la leche se filtró para eliminar impurezas que pudiera acarrear y se sometió a un tratamiento térmico de 72°C durante en 30 segundos en un pasteurizador de intercambiador de placas. Inmediatamente después, la leche se llevó a la cuba de quesería donde se mantuvo en agitación y se añadió el cultivo iniciador, (fermentos lácticos concentrados y liofilizados conservados a 4°C y preparados para poder ser inoculados directamente en la leche). A continuación se añadió CaCl₂. Se mantuvo la leche en constante agitación y controlando en todo momento de que la temperatura no descendiese de 34-36°C. Después de 5 minutos se procedió a agregar el cuajo líquido (cuajo de ternero con la siguiente composición: >70% de Quimosina, < 30% de pepsina bovina, sal común, E-211 y E-202).

Se cambiaron las palas de remover por las liras de cortar, y se dejó que actuara el cuajo. La leche se coaguló en unos 25-30 minutos formando un gel compacto que se cortó con las liras en trocitos del tamaño de un grano de maíz. Tras separar los trozos coagulados de las paredes de la cuba y mezclarlo todo, se retiraron las liras, y se colocaron unas placas metálicas que presionaron la cuajada, lo que permitió la separación del lactosuero, que se recogió y se enfrió inmediatamente hasta alcanzar temperaturas de refrigeración. Finalmente se depositó el lactosuero en recipientes de plástico de 10 L y se añadió en cada uno de ellos 1-2 ml de peróxido de hidrógeno. El suero ya estaba listo para su transporte.

Tras la eliminación del suero de la cuba de quesería, se colocaron las palas de remover, y se añadió 2kg de sal común disuelta en agua caliente y unos 3 cubos de agua. Se mantuvo en constante agitación durante unos minutos controlando que la temperatura no superara los 36°C. A continuación se cortó la cuajada y se volvieron a colocar las placas metálicas que realizan presión. Todo esto permitió eliminar el suero restante y el agua añadida. La cuajada se trasladó a los moldes y se prensó durante 2-3 horas. Finalmente los quesos se llevaron a cámaras de refrigeración donde se dejaron madurar durante un par de días.

2.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

La figura 14 muestra el esquema de los pasos seguidos en el tratamiento de suero y obtención de los diferentes polvos analizados.

Material y Métodos

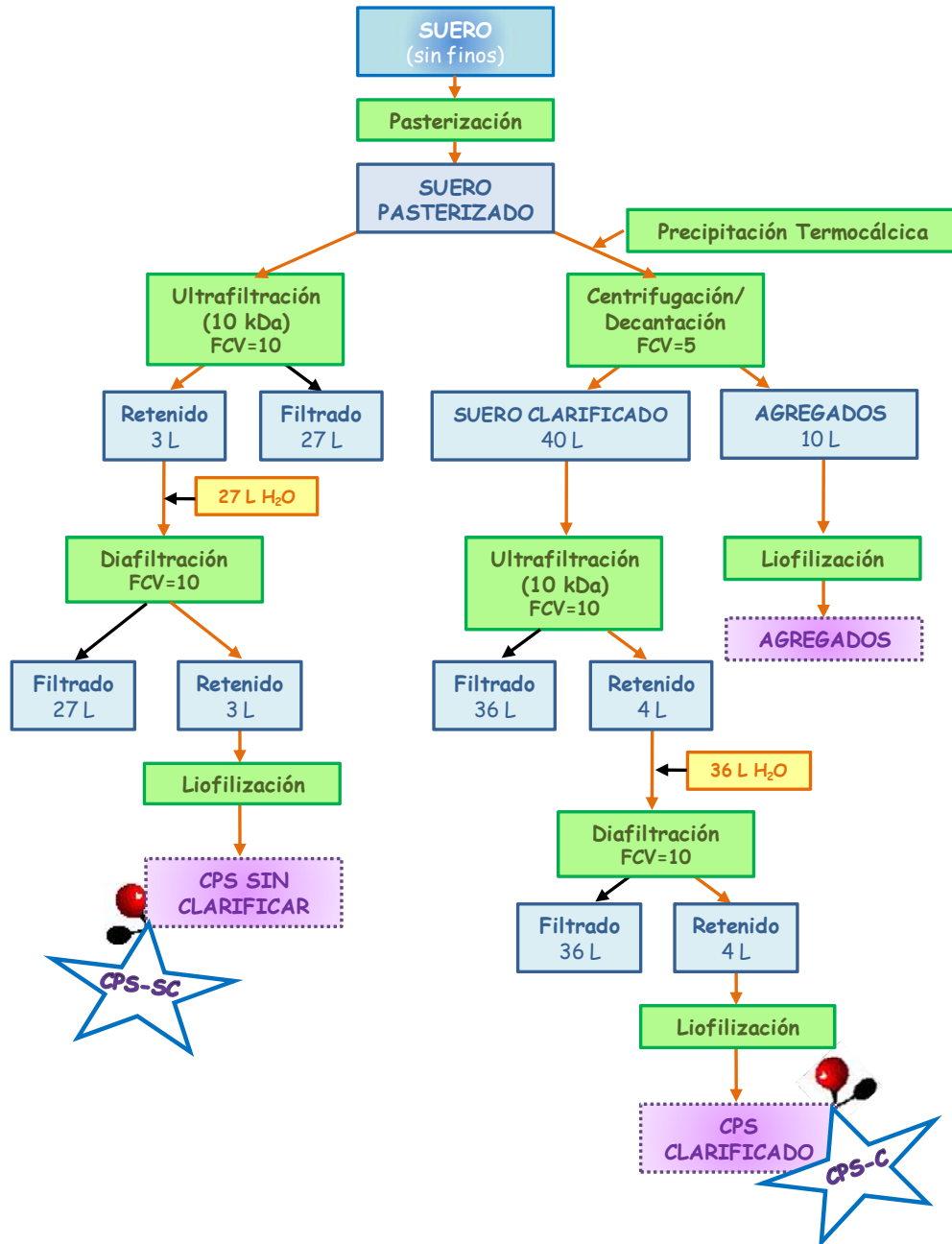


Figura 14: Esquema del tratamiento del suero caprino y de la obtención de los diferentes CPS

2.3.1. RECEPCIÓN DE LOS SUEROS CAPRINOS

El lactosuero refrigerado se transportó al laboratorio de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias de Lugo, donde se determinó el pH y se mantuvo en refrigeración hasta su uso al día siguiente. Transcurrido este tiempo se procedió a eliminar los finos de caseína que el lactosuero contenía disueltos mediante filtración a través de una malla "nytal" de 20 μm . Finalmente se pasteurizó a 63°C durante 30 minutos en baños termostataados.

El suero se recogió en un intervalo de tiempo comprendido entre marzo y agosto del 2005. La toma de muestras se realizó en 6 días diferentes (40 litros cada día).

Los 40 litros se dividieron en dos porciones:

- ✓ 25 litros: Se sometieron a precipitación termocálcica (PT), seguido de ultrafiltración (UF) y diafiltración (DF)
- ✓ 15 litros: Se sometieron a UF seguida de DF

Este proceso se realizó en seis ocasiones, mezclando el producto final de cada dos fabricaciones, ya que lo obtenido en cada fabricación no era suficiente para los análisis a realizar ni la membrana podía soportar volúmenes tan grandes.

2.3.2. CLARIFICACIÓN DE LOS SUEROS

Tras la determinación del contenido en calcio inicial del lactosuero mediante el kit colorimétrico Spinreact diagnostics (tal como se describe en el apartado 2.4.5 de material y métodos), se llevó a cabo la precipitación termocálcica (PT) siguiendo el método descrito por Fauquant et al. (1985): el contenido en calcio se ajustó a 1,2 g/l con una solución de CaCl_2 . A continuación el pH se llevó a valores de 7,3-7,5 con NaOH 10N y se calentó rápidamente a 50°C, manteniendo esta temperatura constante durante 8 minutos. Finalmente se enfrió rápidamente en un baño de agua-hielo hasta alcanzar los 8-10°C, conservándose en refrigeración (4-6°C) hasta el día siguiente.

En primer lugar se optó por microfiltrar el suero clarificado, pero de este modo se produjo una rápida colmatación de la membrana de MF, lo que reducía drásticamente el flujo, impidiendo la realización de un trabajo continuo. Por lo tanto, se desechó emplear la membrana de MF.

Transcurrido el período de tiempo de reposo a temperaturas de refrigeración se observó que los agregados se depositaban en el fondo del envase. Por ello, se

Material y Métodos

consideró que se podía lograr su separación mediante una decantación; así se succionó la parte líquida presente en el envase, permaneciendo los agregados formados en el fondo. La succión se realizó con la ayuda de una bomba que llevaba acoplada un tubo que se situó en el interior del envase, trasvasándose el suero líquido a otro recipiente. A continuación, para alcanzar un FCV=5, se llevó a cabo una centrifugación del suero líquido a 4°C 1600xg 10 minutos, lo que facilitó una mejor separación de la capa superior (suero clarificado) de los agregados.

De este modo, se obtuvieron dos productos, los agregados, y el suero líquido clarificado, el cual se sometió a UF seguida de DF.

Previamente a la separación de los agregados por decantación/centrifugación se trató de separarlos mediante el empleo de una membrana de microfiltración; sin embargo, se colmataba rápidamente lo que impedía el proceso. Por ello, se optó por la metodología anteriormente citada.

2.3.3. ULTRAFILTRACIÓN / DIAFILTRACIÓN DEL SUERO

La ultrafiltración y diafiltración del suero caprino tanto del clarificado por PT como del sin clarificar se realizó de forma discontinua usando como equipo de UF un sistema de flujo tangencial Centramate lab equipado con una membrana Omega y acoplado a un baño termostataado (Figura 15).



Figura 15: Equipo de UF utilizado

Se aplicó un factor de concentración volumétrica de 10 (FCV=10) para la UF. La presión transmembranaria media fue de 1,03-1,72 bares (0,103-0,172 MPa).

Los retenidos de UF procedentes del equipo de UF se diafiltraron añadiendo 36 y 27 litros de agua Milli Q para el suero clarificado y para el no clarificado, respectivamente, y concentrando luego bajo las mismas condiciones que se utilizaron para la UF, empleando un FCV de 10. Para facilitar tanto la UF como la DF, la temperatura, tanto del suero inicial como del retenido obtenido tras pasar a través de la membrana, se mantuvo constantemente a 40°C en un baño termostataado.

Al final de cada proceso el equipo se lavó y desinfectó de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Uno de los principales problemas que presentan las membranas es la colmatación, lo que ralentizaba esta etapa al disminuir el flujo de filtrado. Por este motivo la limpieza de la membrana representó un paso muy importante en esta etapa. Esto implicó una limpieza diaria durante más de 1 hora con NaOH 0,3 N, ajustando la bomba a una presión 1,7-2,8 bares (0,17-0,28 MPa). Después de pasar la solución de limpieza, se introdujo diariamente la solución de almacenamiento de NaOH 0,1 N. Además previo a la limpieza y antes de un nuevo uso de la membrana se aclaró con agua destilada.

2.3.4. DESHIDRATACIÓN DE LOS PRODUCTOS LÍQUIDOS

Los productos obtenidos de la clarificación y de la separación por membranas se deshidrataron mediante liofilización, obteniéndose tres productos en polvo: agregados, CPS de suero clarificado (CPS-C) y CPS de suero sin clarificar (CPS-SC). Como se explicó en el apartado 2.3.1., se recogió suero en 6 ocasiones, mezclándose el producto final de cada dos fabricaciones. De este modo se obtuvieron los tres tipos de productos mencionados y cada uno de ellos constó de tres lotes (n=3).

Las muestras liofilizadas se conservaron en bolsas de plástico a vacío y en congelación a -22°C hasta la realización del análisis de la composición físico-química, el estudio de las propiedades funcionales y en la elaboración de posibles aplicaciones.

2.4. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA

2.4.1. DETERMINACIÓN DEL EXTRACTO SECO

El contenido de humedad se determinó por el método propuesto por la A.O.A.C. (2005c). Se pesaron con exactitud aproximadamente 10 g de las muestras líquidas y 1 g de las muestras en polvo en cápsulas de porcelana, que se desecaron en estufa a 105°C hasta peso constante.

Las determinaciones se efectuaron por triplicado. El extracto seco se calculó restando el contenido de agua del peso de la muestra y se expresó en términos de porcentaje de extracto seco.

2.4.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CENIZAS

El contenido en cenizas se determinó por incineración a 550°C durante 6 horas en un horno mufla de las muestras previamente desecadas (A.O.A.C., 2005a). Las

Material y Métodos

determinaciones se hicieron por duplicado y los resultados se expresaron en porcentaje de cenizas y sobre extracto seco.

2.4.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA

El contenido proteico se determinó por el método de Bradford, variante microensayo (Kruger, 1996), empleando el reactivo comercial Comassie y mediante el método de Kjeldahl.

2.4.3.1. Método Bradford, variante microensayo

En primer lugar se realizó una recta patrón pipeteando por duplicado volúmenes de 5, 10, 20, 30 y 35 μ l a partir de una solución patrón formada por las tres proteínas séricas más importantes (7 mg β -lactoglobulina + 2 mg α -lactoglobulina + 1 mg seroalbúmina bovina) disueltas en NaCl 0,1 M y de concentración 10 mg/ml.

Las muestras líquidas se diluyeron en NaCl 0,1M usando un factor de dilución de 1:16, mientras que las muestras en polvo se prepararon usando el mismo disolvente y con las siguientes concentraciones:

- ✓ Agregados: 1 mg polvo/ml
- ✓ CPS-C, CPS-SC y CPS bovino: 0,5 mg polvo/ml

El reactivo comercial Comassie (Sigma) se preparó previamente diluyéndolo 1:10 en agua Milli Q, se agitó durante 1 hora y finalmente se filtró a través de papel de Whatman n° 1.

El ensayo se hizo directamente en cubetas de 1,5 ml, añadiendo 50 μ l de las muestras y 1,5 ml del reactivo Comassie, y mezclando a continuación completamente. Se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia de cada muestra a 595 nm.

La recta patrón obtenida presentó problemas de linealidad, por este motivo para mejorar la sensibilidad del método se procedió a leer las muestras también a 465 nm, que es la longitud de onda a la que se determina el colorante que no se une a la proteína. Para la cuantificación final de la cantidad de proteína de las muestras se tiene en cuenta la relación de absorbancias a 595 nm (colorante unido a proteína) y a 465 nm (colorante libre) (Sedmak y Grossberg, 1977).

Las determinaciones se hicieron por duplicado, expresándose los resultados como porcentaje de proteína presente en las muestras y sobre extracto seco.

2.4.3.2. Método Kjeldahl

Este método sólo se utilizó para la determinación proteica de los distintos productos estudiados. Se llevó a cabo en el "Institute of Food Technology and Bioprocess Engineering" de la Technische Universität Dresden.

Se pesó 1 g de muestra que se introdujo en el tubo de digestión. A continuación se añadieron 1 cucharada (aproximadamente 5 g) de catalizador (mezcla de K_2SO_4 y $CuSO_4$), 2 perlas de cristal, y 15 ml de ácido sulfúrico concentrado.

Los tubos se colocaron en la unidad de digestión hasta su total clarificación.

Tras la digestión, se llevó a la unidad de destilación el tubo de digestión, donde se añadieron 60 ml de NaOH al 33%. El amoníaco destilado se recogió en un un matraz de valoración de 250 ml, en el cual se había añadido previamente 20 ml de ácido bórico al 2% y dos gotas de una solución indicadora.

Finalmente se valoró con una solución de HCl 0,1 N.

El porcentaje de nitrógeno total (NT) se determinó usando la siguiente ecuación:

$$NT (\%) = \frac{14,007 \times (V-V_0) \times N}{\text{mg de muestra}} \times 100$$

N= Normalidad del HCl

V= Volumen de HCl gastado en la valoración (ml)

V₀= Volumen de HCl gastado en la titulación de un blanco (ml)

El contenido de proteína total se calculó multiplicando el resultado de nitrógeno total obtenido por 6,38.

Las determinaciones se hicieron por duplicado, expresándose los resultados como porcentaje de proteína presente en las muestras y sobre extracto seco.

2.4.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO LIPÍDICO

El contenido lipídico de los distintos productos estudiados se cuantificó gravimétricamente por el método de Röse-Gottlieb según lo recogido en la A.O.A.C. (2005b). Los análisis se llevaron a cabo en el "Institute of Food Technology and Bioprocess Engineering" de la Technische Universität Dresden.

Material y Métodos

Se pesó 1 g de muestra, a la que se añadió 10 ml de H₂O. Se agitó hasta que la muestra estuviese completamente dispersa. Después se mantuvo 15 minutos en un baño de agua a 60-70 °C, agitando las muestras ocasionalmente.

Tras enfriar a temperatura ambiente, se añadió 2 ml de una solución de amoníaco al 25% y 2 gotas de indicador fenoftaleína, que facilitó visualizar mejor la separación de fases.

Después se añadieron 10 ml de etanol 96%, y se agitó. A continuación se adicionó 25 ml de dietiléter, y se agitó vigorosamente durante 1 minuto. Finalmente se añadió 25 ml de éter de petróleo, y se agitó de nuevo la mezcla vigorosamente durante 1 minuto. Inmediatamente después, se centrifugó a 25°C 100xg 5 minutos.

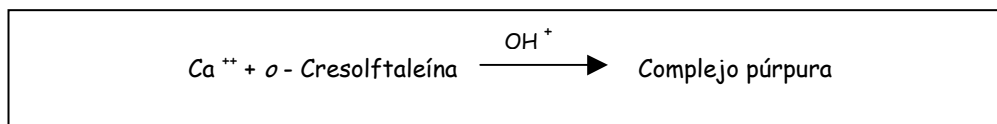
Se decantó la fase superior, que se transfirió a un matraz, previamente desecado y pesado. Se repitió la extracción dos veces más, añadiendo a la fase inferior 30 ml de una mezcla 1:1 de dietiléter y éter de petróleo, y centrifugando, usando las condiciones previas. La fase superior se mezcló con la previamente obtenida. Finalmente, se evaporaron los disolventes, y se pesó la grasa extraída.

Las determinaciones se hicieron por duplicado y los resultados finales se expresaron en términos de porcentaje de grasa de las muestras y sobre extracto seco.

2.4.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CALCIO

El contenido en calcio se determinó mediante un método colorimétrico a través de un kit comercializado por Spinreact.

La medición del calcio se basa en la formación de un complejo coloreado de color púrpura que tiene lugar en medio alcalino:



La intensidad del color formado y medido a 570 nm es proporcional a la concentración de calcio presente en la muestra (Farell, 1984). La respuesta del método varía desde el límite de detección de concentración 0,17 mg/dl hasta el límite de linealidad de 15 mg/dl.

Los reactivos incluidos y que se suministraban listos para su uso directo, fueron los siguientes:

- ✓ Tampón: Etanolamina (500 mmol/L)
- ✓ Cromógeno: o - Cresolftaleína (0,62 mmol/L) + 8-Hidroxiquinoleína (69 mmol/L)
- ✓ Patrón primario acuoso de Calcio 10 mg/dl

Las muestras líquidas se prepararon diluyéndolas 1:10 en NaCl 9g/L. Por el contrario las muestras sólidas se prepararon diluyendo 0,5 mg de producto en polvo en 1 ml de NaCl 9g/L.

Se prepararon una serie de cubetas espectrofotométricas identificadas como blanco, estándar y muestras. En cada una de ellas se añadió 1 ml de tampón y 1 gota de cromógeno, y a continuación 20 µl de NaCl 9g/L, de patrón o de muestra, según el caso. Se mezcló todo y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Transcurrido este período se leyó la absorbancia a 570 nm. La absorbancia correspondiente al blanco se restó a los valores obtenidos en el estándar y en las muestras. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

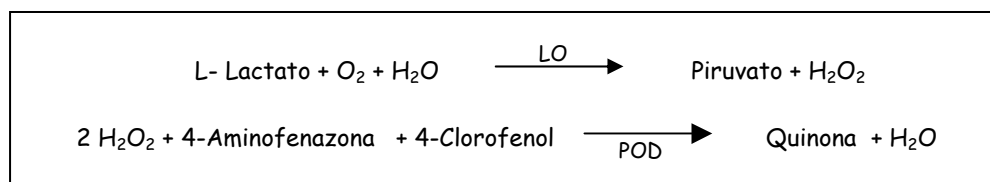
El contenido en calcio de las muestras se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Calcio (mg/dl)} = \frac{(\text{Absorbancia muestra})}{(\text{Absorbancia estándar})} \times 10 (\text{Concentración del estándar})$$

2.4.6. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE LACTATO

La determinación cuantitativa de Lactato se realizó mediante un método colorimétrico rápido, usando un kit comercializado por Spinreact.

El principio del método se basa en que el lactato es oxidado por la lactato oxidasa (LO) a piruvato y a peróxido de hidrógeno el cual en presencia de peroxidasa (POD) 4-aminofenazona y 4 -clorofenol forma un compuesto rojo de quinona:



Material y Métodos

La intensidad del color formado a 505 nm es proporcional a la concentración de lactato presente en la muestra (Gau, 1984) El límite de detección es de 0,39 mg/dl y la respuesta es lineal hasta concentraciones de lactato de 150 mg/dl.

Los reactivos incluidos en el kit eran:

- ✓ Tampón : PIPES pH 7 (50 mmol/L) + 4-Clorofenol (4mmol/L)
- ✓ Enzimas: Lactato Peroxidasa (800 Unidades/L) + Peroxidasa (2000 Unidades/L) + 4 Aminofenazona (0,4 mmol/L)
- ✓ Patrón primario acuoso de Lactato 10 mg/dl

El reactivo de trabajo se preparó reconstituyendo un vial de enzimas en 10 ml de tampón, se tapó y se mezcló suavemente hasta disolver completamente su contenido.

Las muestras sólidas se prepararon con una concentración de 5 mg de producto en polvo en 10 ml de NaCl 9 g/L mientras que las muestras líquidas se diluyeron 1:10 en NaCl 9 g/L.

Se prepararon una serie de cubetas espectrofotométricas para el blanco, el estándar y las muestras. En cada una de ellas se añadió 1 ml del reactivo de trabajo, y a continuación 10µl de NaCl 9 g/L, de patrón o de muestra, según el caso Se mezcló y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se procedió a leer la absorbancia a 505 nm. La absorbancia correspondiente al blanco se restó a los valores obtenidos en las muestras y en el estándar. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

El contenido en lactato de las muestras se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Lactato (mg/dl)} = \frac{(\text{Absorbancia muestra})}{(\text{Absorbancia estándar})} \times 10 (\text{Concentración del estándar})$$

2.4.7. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN LACTOSA

El contenido en lactosa se obtuvo usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Lactosa} = 100 - (\% \text{ Proteína} + \% \text{ Humedad} + \% \text{ Cenizas} + \% \text{ Grasa})$$

Los resultados se expresaron como porcentaje de lactosa presente en las muestras y sobre extracto seco.

2.4.8. DETERMINACIÓN DEL pH

El pH se determinó en la recepción del lactosuero y durante los ajustes a lo largo del proceso. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

2.5. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA

2.5.1. EXTRACCIÓN DE LOS LÍPIDOS

Para el estudio de los componentes lipídicos y de la composición de ácidos grasos se realizó previamente una extracción de los lípidos mediante el método de Bligh y Dyer (1959) modificado por Hanson y Olley (1963).

Para ello, se pesaron en un vaso de precipitados 20 g para las muestras líquidas y en el caso de las muestras en polvo y de las emulsiones 4 g más el agua destilada necesaria para obtener un peso final de 20 g. Se homogeneizaron las muestras en un homogeneizador de vástago con una mezcla de disolventes compuesta por un volumen de 20 ml de cloroformo y 40 ml de metanol durante 2 minutos y se añadió una punta de espátula del antioxidante. Tras la homogeneización, se le añadió a la mezcla otros 20 ml de cloroformo y 20 ml de agua destilada y se volvió a homogeneizar durante un minuto.

La mezcla final se centrifugó a 15°C 1440xg 10 minutos, obteniéndose una clara separación trifásica con la capa de metanol-agua arriba, el tejido en el centro y la fase clorofórmica (donde van disueltos los lípidos) en el fondo. La capa superior se eliminó por succión con una pipeta Pasteur, la capa de muestra sólida fue apartada cuidadosamente y de la capa inferior se recogió un volumen de 20 ml que se filtró a través de lana de vidrio.

El extracto lipídico se obtuvo evaporando los disolventes mediante corriente de nitrógeno, manteniéndose posteriormente a oscuras y a vacío en un desecador hasta pesada constante de la muestra. El extracto lipídico así obtenido se almacenó a -22°C hasta su posterior análisis.

2.5.2. FRACCIONAMIENTO LIPÍDICO

La fase lipídica fue fraccionada en lípidos neutros (principalmente glicéridos), ácidos grasos libres y fosfolípidos, por extracción en fase sólida, utilizando para ello minicolumnas de polipropileno de 1ml de capacidad y rellenas de LC-NH₂ (aminopropil), siguiendo el método descrito por Kaluzny et al. (1985). Las cantidades de glicéridos,

Material y Métodos

ácidos grasos libres y fosfolípidos se determinaron gravimétricamente (Vaghela y Kilara, 1995) y los resultados se expresaron como porcentaje del peso total obtenido.

2.5.2.1. Acondicionamiento de la muestra y de la minicolumna

Una alícuota de 100mg de grasa obtenida en la extracción lipídica (véase apartado 2.5.1.) se disolvió en 1ml de cloroformo, preparando así la muestra para el fraccionamiento.

El acondicionamiento de la minicolumna se llevó a cabo haciendo pasar 4ml de hexano por la misma produciéndose de esta forma la activación del relleno antes de realizar el fraccionamiento.

2.5.2.2. Desarrollo del fraccionamiento

La muestra disuelta se hizo pasar por la minicolumna previamente acondicionada, quedando retenida en el relleno. A continuación se añadieron 3 ml de una solución de cloroformo-isopropanol (2:1), que arrastró los lípidos neutros a un tubo vacío previamente pesado. Posteriormente se procedió de igual manera a la separación de la fracción de ácidos grasos libres, esta vez con una solución de ácido acético 2% en éter etílico. Para finalizar, se hicieron pasar 3 ml de metanol con el fin de eluir la última fracción, la de fosfolípidos.

Se obtuvieron tres fracciones: glicéridos (cuyos componentes principales fueron los triacilglicerolos o triglicéridos), ácidos grasos libres y fosfolípidos). Los disolventes de las fracciones obtenidas se evaporaron en un concentrador centrífugo a vacío "Univapo", manteniéndose posteriormente a vacío y a oscuras en un desecador hasta pesada constante de la muestra.

Las determinaciones se hicieron por duplicado, expresándose los resultados como porcentaje de triglicéridos, ácidos grasos libres y fosfolípidos del total de lípidos de las muestras, respectivamente.

2.5.3. ANÁLISIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Para el estudio de los ácidos grasos que forman parte de los lípidos fue necesario realizar su transesterificación a ésteres metílicos y el ajuste de las condiciones cromatográficas para obtener una buena separación entre los diferentes compuestos.

2.5.3.1. Preparación de ésteres metílicos

Según el método descrito por Utrilla et al. (1976) se llevó a cabo la formación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos que forman parte de los lípidos.

Para la esterificación de los ácidos grasos se disolvió una gota de materia grasa obtenida según se describe en el apartado 2.5.1, en 0,1 ml de hidróxido potásico 2 N en metanol y 0,5-1 ml de hexano.

Después de la disolución, se agitó la mezcla durante 1 minuto en un vortex y se esperó 10 minutos hasta la conclusión de la reacción. Transcurrido este tiempo, y observada la sedimentación de 2 fases (glicerol, inferior; ésteres metílicos, superior), se tomó con ayuda de la microjeringa 1 μ l de la fase metílica y se inyectó en el cromatógrafo.

2.5.3.2. Condiciones de la cromatografía de gases

Para el análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se empleó una columna capilar de 30 m de longitud y de un diámetro interno de 0,25 mm, empaquetada con OV-225 (0,1 μ m) sobre sílica fundida.

La temperatura del horno se programó de la siguiente manera: temperatura inicial de 150°C; período isotérmico a 150°C durante 2 minutos y posteriormente incremento de la temperatura hasta 210°C en una rampa de 4°C/min. Esta temperatura se mantuvo durante 15 minutos. El bloque de inyección y el detector de ionización de llama permanecieron a 250°C.

La determinación cuantitativa se efectuó basándose en el principio de que los pesos de cada uno de los componentes separados de la mezcla son proporcionales a las áreas correspondientes del registro gráfico. La identificación se llevó a cabo basándose en los tiempos de retención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos analizados y su comparación con los tiempos de retención de los ésteres metílicos de referencia (Sigma-Aldrich), cromatografiados en las mismas condiciones.

2.6. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN PROTEICA

El contenido de las principales proteínas séricas (α -lactalbúmina, β -lactoglobulina, seroalbúmina, inmunoglobulina G y caseínomacropeptido) se determinó mediante HPLC de fase reversa, siguiendo el método propuesto por Elgar et al. (2000).

Material y Métodos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado HPLC; los patrones de las distintas proteínas procedían de Sigma.

Se prepararon disoluciones de distinta concentración de cada una de las proteínas patrón con el fin de realizar las rectas patrón. También se prepararon disoluciones al 3% (p/v) de proteína de las muestras de los productos en polvo (CPS bovino, CPS-C, y CPS-SC), mientras que los agregados se disolvieron 10 mg de polvo en 1 ml. Las muestras de suero líquido se diluyeron a la mitad en agua Milli-Q.

Previo a la inyección se filtraron las muestras y los estándares a través filtros de 0,45 μm de diámetro. A continuación se inyectaron en el cromatógrafo 100 μl de muestras y estándares.

Como eluyente A se empleó ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% (v/v) en agua Milli-Q, mientras el eluyente B fue TFA al 0,09% (v/v) en 90% de acetonitrilo y 10% de agua Milli-Q. Los eluyentes se desgasificaron en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos.

El flujo empleado fue de 1ml/min y el volumen de inyección 100 μl . La detección se realizó a 214 nm. La separación se realizó a temperatura ambiente.

El gradiente empleado, expresado en proporción de eluyente B, fue el siguiente:

- Del minuto 0 al 1: 20%;
- Del minuto 1 al 6: 20-40%
- Del minuto 6 al 16: 40-45%
- Del minuto 16 al 19: 45-50%
- Del minuto 19 al 20: 50%
- Del minuto 20 al 23: 50-70%
- Del minuto 23 al 24: 70-100%
- Del minuto 24 al 29: 100%
- Del minuto 29 al 34: 100-20 %
- Del minuto 34 al 42: 20 %.

La identificación se hizo teniendo en cuenta los tiempos de retención comparados con los de los estándares utilizados (β -lactoglobulina, α -lactalbúmina y seroalbúmina, inmunoglobulina G y caseínomacropéptido).

La cuantificación se realizó mediante el método de estándar externo, de manera que se prepararon soluciones patrón de cada proteína a concentraciones comprendidas entre 0,4 y 4,17 mg/ml y se inyectaron en el cromatógrafo, efectuando la separación en las condiciones descritas anteriormente. Con las áreas obtenidas y

las concentraciones correspondientes se realizó una recta patrón para cada proteína a determinar. Las concentraciones de cada proteína en las muestras se calcularon por extrapolación de la recta patrón correspondiente

Los resultados finales se expresaron como gramos de proteína por 100 g de producto en polvo. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

2.7. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES

2.7.1 DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD PROTEICA

Se determinó la solubilidad de la proteína según el método descrito por Morr et al. (1985).

Se pesaron 500 mg de muestra a los que se le añadió un pequeño volumen de NaCl 0,1M y se agitó hasta formar una pasta suave. Después se añadió más NaCl 0,1M hasta alcanzar un volumen total de 40 ml. La disolución se agitó en un agitador magnético e inmediatamente se determinó el pH, ajustándolo a 4,0 o a 7,0 con HCl o NaOH 0,1N según el caso. La dispersión se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente con una intensidad ligeramente inferior a la formación de un vórtex, manteniéndolo así sin que se formase espuma. A lo largo de esta hora se controló el pH y se reajustó siempre que fue necesario.

A continuación se transfirió la dispersión a un matraz aforado de 50 ml y se diluyó el volumen hasta la marca con la solución de NaCl 0,1M.

Se tomó una alícuota de 15 ml y se centrifugó a 4°C 2260xg 15 minutos. Finalmente se filtró el sobrenadante a través de papel Whatman nº 1 y se determinó el contenido de proteína según el método de Bradford en el sobrenadante. Se realizaron todos los experimentos por duplicado.

La solubilidad de la proteína se calculó usando la fórmula dada a continuación:

$$\text{Solubilidad proteica (\%)} = \frac{A \times 50}{B \times (C/100)} \times 100$$

donde,

A= Concentración de proteína en el sobrenadante (mg/ml)

B= Peso de la muestra (mg)

Material y Métodos

C = Concentración de proteína en la muestra según el método de Bradford (%)

Los resultados se expresaron como índice de proteína soluble o porcentaje de proteína soluble en las muestras.

2.7.2. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ESPUMANTES

Los estudios de la capacidad espumante y de la estabilidad de la espuma de las muestras y de la ovoalbúmina (utilizada como referencia) se determinaron por el método de Phillips et al. (1990).

2.7.2.1. Dispersión de las proteínas

Se prepararon soluciones al 5% (p/v) de proteína (según el método de Bradford) en agua Milli-Q de los CPS-SC, CPS-C y CPS bovino. Para los agregados se disolvieron 10 y 20 g de producto en polvo en 100 ml de agua Milli-Q.

Se pesó la cantidad correspondiente de producto en un vaso de precipitados y se le añadió agua Milli-Q, agitando con una varilla de vidrio hasta formar una pasta suave. Después se añadió más agua hasta alcanzar un volumen total de 85 ml.

A continuación, mientras se agitaba la dispersión en un agitador magnético durante 60 minutos, se ajustó el pH a 4,0 y a 7,0 con HCl o NaOH 0,1N. Durante este período de agitación se controló el pH de la dispersión, reajustándolo si fuese necesario. La completa dispersión de la proteína es un prerrequisito esencial para la formación de espumas.

Finalmente se aforó la dispersión hasta un valor final de 100 ml para obtener una solución con la concentración deseada.

Al mismo tiempo se preparó una solución de concentrado proteico de ovoalbúmina (67% pureza) del 5% (p/v), el cual se usó como patrón de referencia.

2.7.2.2. Formación de las espuma

La dispersión proteica se transfirió a un vaso de precipitados de plástico de 2 litros de capacidad, el cual tenía un orificio de 0,6 cm situado a 5,1 cm del centro del vaso, y que durante el batido se mantuvo tapado con un tapón de silicona.

Posteriormente se batió la dispersión con una batidora durante 15 minutos, a temperatura ambiente y a una de velocidad de 10.000 r.p.m (la cual es la velocidad aconsejada por el fabricante para obtener espumas).

2.7.2.3. Capacidad espumante

Inmediatamente después de terminar de batir, se sacó con cuidado la batidora de la espuma para evitar la destrucción de la espuma y se anotó el volumen alcanzado en la graduación del vaso.

Con mucho cuidado se tomaron muestras de la espuma con una espátula, y rápidamente se rellenaron, con pequeñas cucharadas y evitando que quedaran bolsas de aire, dos cápsulas de evaporación de vidrio de 90 ml (previamente taradas en una balanza). Finalmente el exceso de espuma de las cápsulas se desechó enrasando con una espátula metálica la superficie de la espuma en las cápsulas para obtener un volumen constante y exacto. Se anotó el peso de la espuma dentro de la cápsula y se devolvió cuidadosamente la espuma al vaso de precipitados.

Todo el proceso se realizó en un tiempo máximo de 2 minutos. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

La capacidad espumante (CE) se calculó de la siguiente forma:

$$CE (\%) = \frac{(\text{Peso de 100 ml de disolución}) - (\text{Peso de 100 ml de espuma})}{\text{Peso de 100 ml de espuma}} \times 100$$

2.7.2.4. Estabilidad espumante

De acuerdo con el método descrito por Phillips et al. (1990) se colocó el vaso de precipitados que contenía la espuma en un soporte con una inclinación de aproximadamente 30° y el orificio del vaso hacia la parte más baja, situando una probeta bajo el orificio y sobre una balanza tarada, y retirando finalmente el tapón de silicona del vaso.

Se dejó drenar el líquido durante 30 minutos a temperatura ambiente y, trascurrido ese tiempo, se midió el volumen obtenido y se anotó el peso del líquido drenado.

Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Los resultados se expresaron como % de volumen o % de peso del líquido drenado de la espuma respecto al volumen inicial de la espuma (% v/v y % p/v respectivamente).

Material y Métodos

La estabilidad de la espuma (EE) se calculó de la siguiente manera:

$$EE (\%) = 100 - \left\{ \frac{\text{Líquido drenado (peso o volumen)}}{\text{Volumen inicial de la espuma}} \right\} \times 100$$

2.7.3. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES EMULSIONANTES

2.7.3.1. Preparación de la emulsión

Se prepararon soluciones al 2% (p/v) de proteína (según el método de Bradford) en agua Milli-Q de los CPS-SC, CPS-C y CPS bovino, y 10g de producto en polvo/100 ml de los agregados. Se ajustó el pH de las soluciones a 7,0 y a 4,0 utilizando NaOH o HCl 0,1M, según el caso, y se mantuvieron agitando constantemente a temperatura ambiente a una velocidad suave, para evitar que se formara espuma, y durante 60 minutos para asegurar su completa dispersión. Durante todo este tiempo se controló que el pH de las soluciones permaneciera constante, reajustándolo si fuera necesario.

Para poder preparar la emulsión, a 50 ml de cada una de las soluciones proteicas (fase continua) se les añadió 150 ml de aceite (fase dispersa), e inmediatamente después se calentó la mezcla a 55°C y se emulsionó, en primer lugar en el homogeneizador de vástago a 17.200 rpm durante 2 minutos, evitando que se formara espuma y posteriormente se volvió a calentar la mezcla a la misma temperatura para poder concluir la emulsificación en el homogeneizador "Rannie", a 200 bares (20MPa). Es necesario destacar que las muestras con agregados tras la homogeneización en el "Rannie" se desestabilizaban y se rompía la emulsión previamente formada, por lo que se eliminó esta última etapa para estas muestras y sólo se emulsionaron en el homogeneizador de vástago. Las emulsiones se prepararon por duplicado.

El homogeneizador "Rannie" se limpió haciendo pasar agua destilada a 55°C, seguido de NaOH 0,3 N a 55°C y finalmente, agua destilada a la misma temperatura.

2.7.3.2. Capacidad emulsionante

La capacidad emulsionante se determinó según el procedimiento turbidimétrico de Pearce y Kinsella (1978).

Inmediatamente después de la emulsificación se pesó 0,1 g de emulsión y se diluyó con 19,9 ml de una solución 0,1% (p/v) de sodio dodecil sulfato en agua milli-Q. Se tomó una alícuota de 0,2 ml de la dilución anterior y se le añadió 2,8 ml de la solución de SDS para obtener una dilución final de 1/3000. Posteriormente se determinó la absorbancia de la emulsión diluida en una cubeta de 1 cm de paso de luz a una longitud de onda de 500 nm en el espectrofotómetro. Con este factor de dilución se pretendía evitar que la absorbancia excediera de 0,8 unidades de absorbancia (Pearce y Kinsella, 1978).

Se determinó la densidad de las soluciones y del aceite refinado de girasol a 20°C con la ayuda de un picnómetro Duran y se tomaron alícuotas de 1 g de la emulsión que se secaron hasta peso constante a 105 °C.

Las determinaciones se hicieron por duplicado.

La capacidad emulsionante de las proteínas, expresada como "Índice de actividad emulsionante" (IAE). El IAE mide la habilidad de las proteínas para dispersar la fase lipídica, y estima el tamaño de partícula dispersa basado en el área interfacial (calculada vía turbidez) por unidad de proteína (Singh, 2003). Este índice viene dado por las ecuaciones de Pearce y Kinsella (1978) (1) y también por la modificada por Cameron et al. (1991) (2):

$$\text{IAE (m}^2\text{/g)} = \frac{2 \times T}{C \times \phi} \quad (1)$$

$$\text{IAE (m}^2\text{/g)} = \frac{2 \times T}{C \times (1-\phi)} \quad (2)$$

donde:

T= Turbidez de la emulsión, que se calculó usando la siguiente fórmula:

$$T = \frac{2,303 \times \text{Absorbancia}}{\text{Paso de luz de la cubeta}}$$

donde:

C= Peso de la proteína por unidad de volumen de la fase acuosa (g/m³)

Material y Métodos

ϕ = Fracción volúmica de la fase dispersa, que se calculó de la siguiente forma (Pearce y Kinsella, 1978):

$$\phi = \frac{C - A - E(B - C)}{C - A + (B - C) [(1 + E) D_0 / D_s - E]}$$

donde:

A = masa del recipiente

B = masa del recipiente + la emulsión

C = masa del recipiente + el extracto seco de la emulsión

D_0 = densidad del aceite de girasol

D_s = densidad de la solución proteica

E = concentración de solutos (masa por unidad de masa de disolvente)

La ecuación de Cameron et al. (1991) es una modificación de la original de Pearce y Kinsella (1978) en la cual ϕ que aparece en el denominador se sustituye por $1 - \phi$ para de este modo expresar, en vez de la fracción de volumen total representado por el aceite, la fracción de volumen de la disolución de proteína de la emulsión.

2.7.3.3. Estabilidad emulsionante

La estabilidad de la emulsión (IEE) se determinó siguiendo el método descrito por Tornberg y Hermansson (1977). Las determinaciones se hicieron por duplicado.

Para ello tras la preparación de la emulsión se separaron inmediatamente dos alícuotas de 4 g y de 30 g (aproximadamente). Esta última alícuota se mantuvo 24 horas a 20°C en tubos de centrifuga. Al día siguiente se centrifugó a 20°C 180xg 15 minutos y se tomó una alícuota de 4 g de la fase inferior del tubo de centrifuga.

Se determinó el contenido de grasa de ambas alícuotas de 4 g por el método de Hanson y Olley (1963) (véase apartado 2.5.1.)

El Índice de estabilidad de la emulsión (IEE) viene dado por la siguiente fórmula:

$$\text{IEE (\%)} = \frac{\text{Contenido en grasa de la fase inferior (\%)}}{\text{Contenido en grasa de la emulsión inicial (\%)}} \times 100$$

2.7.4. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD GELIFICANTE

2.7.4.1. Preparación de los geles

Los geles se elaboraron basándose en la técnica usada por Ikeda y Foegeding (1999).

Se prepararon disoluciones de las muestras en polvo (CPS-SC, CPS-C y CPS bovino) al 5%, 7,5% y 10% (p/v) de proteína (según el método de Bradford) en agua Milli-Q y para los agregados se disolvieron 10g y 20g de polvo en 50ml. El pH de las soluciones se ajustó a 7,0 y a 4,0 con NaOH o HCl 0,1M, según el caso. Se agitaron durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador magnético a una velocidad suave que apenas permitía la formación de remolino. A lo largo de este período se controló el pH de las soluciones y se reajustó siempre que fue necesario.

Transcurrido este tiempo se introdujeron los vasos de precipitados con las soluciones completamente dispersas en un desecador sin silica-gel y se hizo vacío, manteniéndolo así 1 hora para eliminar las burbujas de aire presentes.

A continuación se transfirieron las suspensiones proteicas a jeringas plásticas de 100 ml, cuya boca se selló con un tapón de silicona. Los geles se obtuvieron por calentamiento en un baño termostataado a 90°C durante 30 minutos. Después se enfriaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente se mantuvieron en refrigeración hasta el día siguiente con el objeto de permitir la maduración de los geles. Los geles se prepararon por duplicado.

Al día siguiente tras sacar los geles del frigorífico, se dejaron equilibrar hasta temperatura ambiente antes de realizar los siguientes análisis que permitieran caracterizar los geles formados.

2.7.4.2. Determinaciones reológicas

Las pruebas reológicas dinámicas se realizaron en un reómetro de *stress* controlado, trabajando en modo oscilatorio y empleando un dispositivo de medición cono-plato C35/4 (con un ángulo de 4° y 35 mm de diámetro de cono).

En primer lugar, se realizaron barridos de tensión (*stress sweep*) a la frecuencia de 1 Hz con el objetivo de determinar la zona de comportamiento viscoelástica lineal de la muestra. A continuación, se determinaron el módulo complejo

Material y Métodos

(G^*), el módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G'') en el intervalo de frecuencias de 0,0681 - 6,81 Hz a 20 Pa (dentro de la zona viscoelástica lineal). Las medidas se realizaron por triplicado a una temperatura de 15°C.

2.7.4.3. Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua de los geles, expresada como % de agua liberada, se realizó basándose en el procedimiento usado por Veith y Reynolds (2004) con ciertas modificaciones.

Se cortaron lonchas circulares de 10 mm de ancho de cada gel y se dividió la circunferencia en 4 triángulos iguales de 1g de peso cada uno, que se pesaron con exactitud y se usaron para determinar la capacidad de retención de agua a diferentes tiempos: 1, 5 y 10 minutos.

Con cada uno de estos trozos se hizo un "sandwich":

Cada muestra se colocó entre 2 cuadrados de papel de aluminio de 5 cm de lado y a su vez entre dos papeles de filtro Whatman nº1 de 11 cm de diámetro. Todo esto se situó entre 2 plásticos de forma cuadrada de 12 cm de lado (para capturar el exceso de agua drenada). Después se colocó todo entre 2 placas de metacrilato. Finalmente se comprimió el "sandwich" aplicando un peso de 1 kg. El papel de filtro y el gel se pesaron antes e inmediatamente después de retirar el peso.

Las determinaciones se hicieron por duplicado. El % de agua liberada se calculó usando la fórmula siguiente:

$$\text{H}_2\text{O liberada (\%)} = (\text{masa de papel de filtro después de comprimir (g)} - \text{masa inicial del papel de filtro (g)}) \times 100$$

2.7.4.4. Determinación del color

Se tomaron muestras de los geles de 1 cm de grosor equilibradas a temperatura ambiente y se midió el color de la muestra sobre fondo blanco y sobre fondo negro usando un espectrocolorímetro con el objeto de calcular los valores del espacio de color CIE L^* a^* y b^* .

El iluminante patrón empleado fue el D65 y el observador de 10°. La reflectancia espectral se determinó cada 10 nm dentro del rango de 400-700 nm.

Los parámetros CIE L* (coordenada de luminosidad), a* (coordenada rojo-verde) y b* (coordenada amarillo-azul) se calcularon directamente. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

2.7.4.5. Estudio de la microestructura de los geles

Se tomaron muestras de los geles que consistieron en cubos de 1 cm de lado que se conservaron en refrigeración en una solución acuosa de glutaraldehído al 2,5% (v/v) en tampón fosfato 0,1M.

Después las muestras se postfijaron en osmio al 1% en tampón cacodilato 0,1M. A continuación las muestras de geles se deshidrataron secuencialmente mediante sucesivos tratamientos en soluciones acuosas de etanol (30, 50, 70, 90, 100 %). Tras esta etapa el etanol se sustituyó por acetona al 100% y se realizó un secado por punto crítico con CO₂. Finalmente las muestras se metalizaron con una aleación de Au-Pd.

Las observaciones de la microestructura se realizaron por duplicado en un microscopio electrónico de barrido a 10.000 aumentos y operando a 10 Kv.

2.8. APLICACIONES

Se emplearon los distintos deshidratados caprinos y bovino para la preparación de dos tipos de alimentos: geles ácidos y salsas.

Tal como se explicó en los apartados 2.3.1. y 2.3.4, se obtuvieron tres tipos de productos (CPS-C, CPS-SC y Agregados) y cada uno de ellos constaba de tres lotes (n=3). Para el desarrollo de ambas aplicaciones, se mezclaron estos tres lotes a partes iguales, y de la mezcla resultante, se realizó por duplicado la elaboración (n=2) tanto de geles ácidos como de salsas.

2.8.1. ELABORACIÓN DE GEL ÁCIDO CON LECHE

Se elaboraron geles ácidos con leche de cabra comercial estandarizando su contenido proteico a 3,3% y 4% de proteína (según el método de Bradford). Se utilizó leche de vaca comercial para comparar. La composición química de la leche de partida tal y como aparece en la etiqueta de los productos comerciales utilizados se detalla en la tabla 15.

Tabla 15: Composición química (%) de la leche de cabra y leche de vaca

	LECHE CABRA	LECHE VACA
Extracto Seco	9,70	10,01
Lactosa	4,5	4,8
Proteína	2,8	2,9
Lípidos	1,5	1,55
Cenizas	0,90	0,76

De este modo, se plantearon 2 líneas de trabajo que permitieran elevar el contenido en proteína de la leche:

☆ Evaporación de la leche: Se evaporó el contenido acuoso de la leche de cabra y leche de vaca comercial hasta alcanzar 3,3% y 4% de contenido proteico.

☆ Fortificación con concentrados de proteínas séricas: Se añadió la cantidad necesaria de cada uno de los deshidratados (CPS-SC, CPS-C y CPS bovino) a la leche de cabra comercial que permitieran elevar el contenido proteico final de la leche a 3,3 y 4%. Además para poder comparar a igual cantidad de extracto seco (no sólo a igual porcentaje de proteína) se elaboraron 2 geles ácidos más con CPS-SC y CPS bovino en los que se utilizaba la misma cantidad de producto en polvo que se usó para elevar el contenido al 3,3% de la leche con CPS-C. Con los agregados no se elaboraron geles ácidos al ser necesario una gran cantidad de producto para elevar el contenido de proteína de la leche.

2.8.1.1. Preparación de los geles ácidos

a) Leche evaporada

Se evaporó la leche de vaca y la de cabra en un baño termostado a 80° C hasta alcanzar el porcentaje de proteína (3,3 o 4 %) deseado.

b) Leche + concentrados de proteínas séricas de cabra y vaca.

Se calculó a través del cuadrado de Pearson la cantidad de producto en polvo que era necesario añadir para elevar el contenido proteico de la leche. Se pesó la cantidad de producto en polvo según el caso y se añadió a la leche de cabra. Después se agitó la mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente y se dejó reposar en

refrigeración hasta el día siguiente. Transcurrido este tiempo se pasteurizó a 80°C durante 30 minutos.

En la tabla 16, se muestra los tipos de geles formados y la cantidad de CPS añadidos y de leche usada.

Tabla 16: Cantidad de leche y CPS añadidos en los geles ácidos

	Proteína 3,3 %		Proteína 4 %		Igual E.S que CPS-C-3,3% Prot.	
	Leche (g)	CPS (g)	Leche (g)	CPS (g)	CPS (g)	CPS (g)
Leche + CPS-C	99,07	0,93	97,77	2,23	-	-
Leche + CPS-SC	98,15	1,85	95,57	4,43	99,07	0,93
Leche + CPS Bovino	99,23	0,77	98,16	1,84	99,07	0,93

(CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados; CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino; CPS: Concentrados de proteínas séricas; g: gramos)

La composición química de las leches evaporadas y de la mezcla de leche más CPS para elaborar los geles ácidos se calculó y se muestra en las tablas 17, 18 y 19.

Tabla 17: Composición química (%) de las leches evaporadas para elaborar los geles ácidos

	LECHE CABRA		LECHE VACA	
	3,3 % Proteína	4% Proteína	3,3 % Proteína	4% Proteína
Extracto Seco	11,43	13,86	11,39	13,81
Lactosa	5,30	6,43	5,46	6,62
Proteína	3,30	4,00	3,30	4,00
Lípidos	1,77	2,14	1,76	2,14
Cenizas	1,06	1,29	0,86	1,05

Material y Métodos

Tabla 18: Composición química (%) de las mezclas de leche caprina más CPS para elaborar los geles ácidos caprinos.

	Leche Cabra + CPS-C		Leche Cabra + CPS-SC		
	3,3% Proteína	4% Proteína	3,3% Proteína	4% Proteína	Igual E.S. que CPS-C-3,3% proteína
Extracto Seco	10,49	11,61	11,32	13,59	10,51
Lactosa	4,72	5,04	4,60	4,73	4,55
Proteína	3,30	4,00	3,30	4,00	3,05
Lípidos	1,57	1,66	2,53	3,98	2,02
Cenizas	0,90	0,91	0,90	0,89	0,90

(CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados; CPS: Concentrados de proteínas séricas; E.S.: Extracto Seco)

Tabla 19: Composición química (%) de las mezclas de leche caprina más CPS para elaborar los geles ácidos bovino.

	Leche Cabra + CPS Bovino		
	3,3% Proteína	4% Proteína	Igual E.S. que CPS-C-3,3% proteína
Extracto Seco	10,34	11,22	10,47
Lactosa	4,57	4,68	4,59
Proteína	3,30	4,00	3,41
Lípidos	1,54	1,60	1,55
Cenizas	0,92	0,95	0,92

(CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS Bovino: Concentrados de proteínas séricas bovino; E.S.: Extracto Seco)

Después del tratamiento térmico las muestras se enfriaron rápidamente en un baño de agua-hielo hasta alcanzar 40°C y se mantuvieron a esta temperatura en un baño termostataado.

La formación del ácido se llevó a cabo añadiendo a cada una de las muestras 1,5% de glucono-delta-lactona (GDL). La acidificación es debida a la hidrólisis de GDL a ácido glucónico.

Tras añadir 1,5% de GDL se agitó la mezcla durante 3 minutos y se repartió entre diferentes recipientes para su posterior análisis: 4 tubos de centrífuga, 4 recipientes de vidrio de 250 ml. Se incubaron un baño a 40°C todos los botes a excepción de los tubos de centrífuga que se incubaron en una estufa a la misma temperatura. Se controló el pH de la mezcla hasta que se alcanzó un valor de pH de 4,5. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

Tras alcanzar este pH, las muestras se mantuvieron en refrigeración para permitir su completa maduración hasta el día siguiente, momento en el cual se realizaron las siguientes determinaciones que permitieron estudiar los geles ácidos formados.

2.8.1.2. Determinaciones reológicas

Se utilizó el reómetro de *stress* controlado en modo oscilatorio y un dispositivo de medición cono-plato C35/4 para las determinaciones reológicas.

Se realizaron barridos de tensión (*stress sweep*) a la frecuencia de 1 Hz para poder determinar la zona de comportamiento viscoelástica lineal de los geles ácidos.

Una vez obtenida la zona viscoelástica lineal, se determinaron el módulo complejo (G^*), el módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G'') en el intervalo de frecuencias de 0,0464-1 Hz a 3 Pa (dentro de la zona viscoelástica lineal). Las medidas se realizaron a temperaturas de 15°C y por triplicado.

2.8.1.3. Sinéresis o suero separado por centrifugación

Las muestras de geles ácidos que fueron incubados en tubos de centrífuga se pesaron y se centrifugaron a 5°C 350xg 30 minutos (González-Martínez et al., 2002). Tras la centrifugación el suero drenado de las muestras se retiró cuidadosamente con una pipeta Pasteur y se pesaron de nuevo los tubos de centrífuga.

La sinéresis se expresó como gramos de suero drenado por 100 g de gel ácido. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

Material y Métodos

2.8.1.4. Determinación del color

Se determinó el color de los geles ácidos con un espectrocolorímetro, usando el observador 10°, iluminante D65 y el espacio de color Cie L*a*b*. Las medidas se realizaron sobre 2 fondos diferentes: blanco y negro. La reflectancia espectral se determinó cada 10 nm dentro del rango de 400-700 nm. Se determinaron los parámetros CIE L* (coordenada de luminosidad), a* (coordenada rojo-verde) y b* (coordenada amarillo-azul). Las determinaciones se hicieron por duplicado.

2.8.2. SALSAS

La formulación usada en primer lugar para la preparación de las salsas fue la propuesta por Turgeon et al. (1996), sin embargo la fórmula final utilizada presenta ciertas variaciones con la original:

- ✓ Se disminuyó la proporción de vinagre usado de 32,8% a 5% porque el producto final presentaba un olor y sabor intenso a este compuesto.
- ✓ La formulación original usaba 3 de tipos de especias (ajo, cebolla y pimentón), sin embargo se eliminó este último ingrediente porque podía enmascarar el color original de la salsa.

2.8.2.1. Preparación de las muestras

La formulación usada para preparar las salsas fue la siguiente:

- Fase lipídica : 62% aceite refinado de girasol
- 0,5 % ó 1% proteína (según el método de Bradford)
- Fase acuosa: 37,5 % o 37% (en función de la cantidad de proteína (%) añadida):
 - 5% vinagre
 - 2,5 % azúcar
 - 1,5% sal
 - 0,7 % cebolla
 - 0,8% ajo
 - 27% o 26,5 % de agua destilada

En primer lugar se mezcló el agua y el vinagre, y se añadió azúcar, sal, y las especias. A continuación se adicionaron los deshidratados (agregados, CPS-SC, CPS-C y CPS bovino) y se homogeneizó a temperatura ambiente en el homogeneizador de vástago a velocidad de 11.000 rpm durante 30 segundos. Después se incorporó el

aceite lentamente y se volvió a homogeneizar la mezcla durante 3 minutos a la misma velocidad (Turgeon et al., 1996).

El producto final obtenido se separó en varios recipientes para su posterior caracterización y se mantuvieron en refrigeración hasta el día siguiente. Las salsas se prepararon por duplicado. Se elaboraron también salsas con ovoalbúmina comercial (67% de proteína) para comparar con las hechas con nuestros deshidratados caprinos.

2.8.2.2. Determinación del tipo de emulsión y pH

Para poder determinar el tipo fase continua de las salsas preparadas se usaron 2 tipos de colorantes: sudán III y azul de metileno.

Se pesó igual cantidad de ambos colorantes, se mezclaron y se añadió una pequeña cantidad sobre una gota de salsa. A continuación se removió lenta y cuidadosamente, hasta que la salsa se tiñó. En función del color resultante obtenido se puede determinar el tipo de fase continua:

- ✓ Azul: El azul de metileno es soluble en H₂O. La fase continua es el agua.
- ✓ Rojo: El sudán III es soluble en grasa. La fase continua es el aceite.

También se determinó el pH de la emulsión el día de la elaboración, al día siguiente y una semana después de conservación en refrigeración (4°C).

2.8.2.3. Determinaciones reológicas

Las determinaciones reológicas dinámicas se realizaron en un reómetro de *stress* controlado, trabajando en modo oscilatorio y empleando un dispositivo de medición cono-plato C35/4. En primer lugar, para poder determinar la zona de comportamiento viscoelástico lineal de las muestras, se realizaron barridos de tensión (*stress sweep*) a la frecuencia de 0,1 Hz. Después, se determinaron en el intervalo de frecuencias 0,0464-100 Hz y a una tensión de 0,5 Pa (zona viscoelástica lineal) el módulo complejo (G^*), el módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G''). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Las determinaciones reológicas se hicieron al día siguiente y una semana después de la preparación de las salsas conservadas en refrigeración, para poder evaluar si sufrían modificaciones reológicas durante un período corto de almacenamiento.

2.8.2.4. Determinación del color

Se midió el color al día y a la semana siguientes de la elaboración tras conservar las salsas en refrigeración con un espectrocolorímetro sobre fondo blanco y fondo negro, usando el observador 10°, iluminante D65 y el espacio de color CIE L*a*b*. La reflectancia espectral se determinó cada 10 nm dentro del rango de 400-700 nm. Se midieron los parámetros CIE L* (coordenada de luminosidad), a* (coordenada rojo-verde) y b* (coordenada amarillo-azul). Las determinaciones se hicieron por duplicado.

2.8.2.5. Evaluación de la estabilidad

La estabilidad de las muestras se determinó por 2 métodos:

1. Basándose en el método usado por Christiansen et al. (2004), se separaron inmediatamente tras la preparación de la salsa 3 alícuotas de aproximadamente 25 g en tubos de centrífuga. Una de ellas se centrifugó a 20°C 2000xg 15 minutos. Se eliminó el líquido drenado en el fondo y se volvió a pesar. Las otras 2 alícuotas se mantuvieron tapadas durante 24 horas a dos temperaturas diferentes: temperatura ambiente y temperatura de refrigeración (4°C). Transcurrido este período se centrifugaron usando las condiciones previamente indicadas, se descartó el líquido que se separó con una pipeta Pasteur y se pesaron. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

La estabilidad de la salsa, que se determinó el día que se prepara y a las 24 horas tras permanecer a temperatura ambiente y en refrigeración, viene dada por la siguiente ecuación:

$$\text{Est. salsa(\%)} = \frac{\text{g salsa que permanecen despues de centrifugar}}{\text{g salsa iniciales}} \times 100$$

2. Para evaluar la estabilidad de la salsa a lo largo del tiempo (Turgeon et al., 1996) se rellenaron 2 tubos graduados de 15 ml de capacidad con 10 ml de salsa y se almacenaron durante un período de 6 meses a temperatura de refrigeración (4°C) y a temperatura ambiente (20-25°C). Se controló el líquido separado de la salsa a varios intervalos de tiempo durante 6 meses, momento en el cual se pesó el tubo con salsa y se recogió cuidadosamente el líquido drenado en el fondo con una pipeta Pasteur, pesándose a continuación. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

La estabilidad de la salsa a los 6 meses se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Est. salsa 6 meses(\%)} = \frac{\text{g salsa sin el líquido drenado}}{\text{g salsa iniciales}} \times 100$$

2.9. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

Los análisis estadísticos se efectuaron utilizando el programa estadístico SPSS versión 12.0 para Windows (2004).

Se empleó el análisis de varianza (ANOVA) de un factor para determinar si había diferencias significativas en la composición y propiedades funcionales entre los tres tipos de deshidratados, utilizándose el test LSD o DMS (diferencias menos significativas) para determinar qué lotes eran significativamente diferentes a un nivel de significancia de $p < 0,05$ para todas las comparaciones.

Además, se compararon mediante t-test la composición y propiedades funcionales de los CPS clarificados con los CPS no clarificados. Se empleó un nivel de significancia del 5% para todas las comparaciones.

1. COMPOSICIÓN DEL SUERO DE PARTIDA

1.1. COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA

Las tablas 20 y 21 muestran la composición química y pH del suero líquido caprino, tras separar los finos de caseína pero previamente a su pasteurización.

Tabla 20: Composición química (%) y pH (media ± desviación estándar) del suero caprino sin finos (n=3)			
Extracto Seco (ES)	7,07	±	0,09
Cenizas	0,57	±	0,01
Lípidos	0,84	±	0,18
Proteína	0,63	±	0,03
Lactosa	5,02	±	0,24
Calcio	0,04	±	0,01
Lactatos	0,14	±	0,06
pH	6,34	±	0,29

Tabla 21: Composición química sobre extracto seco (%) (media ± desviación estándar) del suero caprino sin finos (n=3)			
Cenizas (%ES)	8,15	±	0,07
Lípidos (%ES)	11,95	±	2,70
Proteína (%ES)	8,76	±	0,12
Lactosa (%ES)	70,98	±	2,45
Calcio (%ES)	0,62	±	0,17
Lactatos (%ES)	1,95	±	0,80

A diferencia de lo que ocurre con el suero bovino, existe poca información disponible sobre la composición química del lactosuero de origen caprino. Dentro de estas escasas publicaciones está el trabajo realizado por Casper et al. (1998), en el que se estudia tanto la composición química como la proteica de lactosueros de origen

Resultados y Discusión

caprino y ovino, y el de Moreno-Indias et al. (2009), que analiza la composición de sueros caprinos procedentes de diferentes queserías tradicionales e industriales. También se encuentran resultados de composición de sueros caprinos, bien sólo procedentes de esta especie (Pintado et al., 1999; 2001) o de mezclas de oveja y cabra (Boumba et al., 2001). A continuación, compararemos nuestros resultados de pH y composición de suero caprino con estos trabajos y otros realizados con sueros de vaca y oveja.

El pH del suero (6,34) indica que se puede clasificar como suero dulce, de acuerdo con el proceso de elaboración del queso, y es similar al suero dulce caprino recogido por Casper et al. (1998) con un pH de 6,2 y otros sueros dulces de diferente origen (Kim et al., 1989; Casper et al., 1998; Boumba et al., 2001).

Como se señaló en introducción (apartado 2.5), la composición del suero está influida por muchos factores (composición de la leche, técnicas de elaboración del queso, variaciones estacionales, etc). En relación al extracto seco de sueros caprinos, los valores obtenidos (7,07%) son similares a los recogidos por Moreno-Indias et al. (2009) que observaron un contenido de 7,06%, algo superiores a los señalados por Casper et al. (1998) y Pintado et al. (2001) que mencionan contenidos entre 6,29 y 6,61% e inferiores al recogido por Pintado et al. (1999) con un valor de 10,8%. En sueros de origen bovino el extracto seco está entre 6,3 y 7,0% (Jelen, 1992; Riera et al., 1996a; Jelen, 2003) mientras que en el ovino los valores son superiores (Casper et al., 1998; Pintado et al., 2001; Pereira et al., 2002; Jaeggi et al., 2005). Los sueros ovinos presentan un contenido proteico, lipídico, láctico y de sólidos totales superior al de los sueros caprinos y bovinos, como consecuencia, posiblemente, de que la leche de oveja posee una mayor proporción de proteínas, lípidos y lactosa (y por consiguiente, de extracto seco) que las otras dos especies (Casper et al., 1998).

El contenido de cenizas (0,57%) es similar al suero dulce caprino de Casper et al. (1998) (0,61%) e inferior al suero ácido caprino recogido en el mismo trabajo (0,76%). También en sueros bovinos se recoge un menor contenido de cenizas en sueros dulces (0,5%) que en sueros ácidos (0,75%) (Jelen, 1992; Riera et al., 1996a; Jelen, 2003). La composición mineral de los quesos, y por consiguiente, del suero, depende de las condiciones de fabricación quesera, del desuerado y de la cantidad de sales añadidas. De este modo, una acidificación rápida mediante fermentación láctica seguida de un desuerado eficiente, favorece una desmineralización de la cuajada, y por lo tanto un incremento del contenido mineral del lactosuero (Park, 1990). Los sueros ácidos exhiben una mayor concentración de minerales que los sueros dulces, sobre todo calcio y fósforo, debido probablemente a la solubilización del fosfato

cálcico coloidal de las micelas de caseínas que ocurre al mismo tiempo que la acidificación (Park, 1990; Jelen, 1992; Pintado et al., 2001). Por el contrario, durante la coagulación enzimática no ocurre la eliminación del calcio de las micelas de caseína, por lo que se retiene en la cuajada y no se pierde en el suero (Jelen, 1992).

El contenido de calcio (0,04%) es parecido al señalado en sueros dulces de vaca y oveja por Pintado et al. (2001) (0,048%) e inferior al recogido para sueros ácidos, tanto de vaca y cabra, por el mismo trabajo (0,13%). Esto se debe a lo señalado en el párrafo anterior, la solubilización del fosfato cálcico de las micelas de caseínas durante la acidificación. La cantidad de cloruro cálcico añadido a la leche durante la elaboración de los quesos también influye en el contenido de calcio. Otros estudios con suero dulce de vaca presentan una cantidad similar de calcio al de nuestro trabajo (0,04-0,06%) (Jelen, 1992; Riera et al., 1996a; Jelen, 2003). El contenido de calcio puede ser importante en la funcionalidad de los productos derivados del suero, ya que juega un papel importante en las interacciones entre proteínas (Johansen et al., 2002).

El contenido de lípidos es superior a los señalados por Casper et al. (1998) en suero dulce (0,51%), por Moreno-Indias et al. (2009) (0,74%) y por Pintado et al. (2001) (0,04%), en sueros de origen caprino. El contenido lipídico del suero, que normalmente se sitúa en torno al 0,5-1%, depende del tipo de leche usada, de la eficiencia del método de elaboración quesera (Jelen, 1992), y de los distintos parámetros empleados en el proceso de fabricación del queso, tales como la firmeza de la cuajada en el momento del corte, el método de corte empleado, tamaño de los granos de cuajada o del tiempo necesario para la formación de la corteza de dichos granos (Johnson et al., 2001). La recuperación de la grasa de la cuajada es más efectiva en las queserías industriales frente a las queserías tradicionales (Moreno-Indias et al., 2009), como la nuestra, con lo que no es de extrañar que el porcentaje de grasa de nuestro lactosuero sea algo elevado. La tecnología usada en las queserías industriales, como el control automático de la temperatura y del tamaño de las partículas de la cuajada durante el corte de la misma, mejora la recuperación de grasa. Además, a veces el contenido lipídico es bastante inferior por someter a centrifugación el suero para eliminar la mayor parte del contenido de grasa, como señalaron Boumba et al. (2001) con valores de 0,03% de lípidos. Los lípidos residuales presentes son importantes para la calidad de los CPS obtenidos, en especial para la propiedad espumante (Mangino, 1992b).

La concentración de proteínas que aparece en la bibliografía de sueros de cabra (Casper et al., 1998; Pintado et al., 1999; 2001; Moreno-Indias et al., 2009) es muy

Resultados y Discusión

variable, variando entre 0,51 y 1,20%. El contenido proteico está influido por las diferentes razas, etapa de lactación, alimentación, clima, estación, etc. (Park et al., 2007). De forma general, la leche caprina de razas como la Alpina y la Saanen, que son las especies de las que proviene la leche utilizada en este estudio, se caracterizan por tener un bajo contenido proteico (Tziboula-Clarke, 2003). Boumba et al. (2001) observaron un porcentaje de proteína superior, lo que puede ser gracias al aporte de la leche ovina, la cual posee un contenido proteico mayor al de la leche de vaca o de cabra (Park et al., 2007).

La lactosa es el principal componente de los sólidos totales del suero. El contenido de este disacárido en los sueros fue similar al recogido en sueros caprinos por Casper et al. (1998) y Moreno-Indias et al. (2009) con valores alrededor del 5%, y superiores a los señalados por Pintado et al. (2001) (3,92%) e inferiores a los de Pintado et al. (1999) (6,78%) también en sueros de cabra. Normalmente, los sueros ácidos poseen un menor contenido de lactosa, ya que durante la fermentación parte de la lactosa se convierte en ácido láctico (Jelen, 1992; Pintado et al., 2001). Así sucede al comparar sueros dulces y ácidos de vaca (Jelen, 1992; Riera et al., 1996a; Pintado et al., 2001; Jelen, 2003) donde el contenido de lactosa en los dulces es de alrededor del 5,0% y en los ácidos es aproximadamente del 4,5%

Igualmente por el efecto de la fermentación de la lactosa, el contenido de lactatos de los sueros dulces bovinos es superior al de los sueros ácidos del mismo origen (Jelen, 1992; Riera et al., 1996a; Jelen, 2003), siendo el contenido de lactatos del suero dulce de nuestro trabajo más cercano al de los sueros dulces que al de los ácidos de origen bovino. El ácido láctico en el suero varía entre 0,2 y 4% de los sólidos totales (De Wit et al., 1986). El contenido de lactatos de nuestro suero sobre extracto seco (1,95%) se encuentra en este porcentaje.

1.2. COMPOSICIÓN PROTEICA

La tabla 22 recoge la composición proteica del lactosuero líquido caprino tras la separación de los finos de caseína.

La principal proteína, que se encuentra en una proporción mayor al 50%, es la β -Lactoglobulina. A continuación le sigue en orden decreciente el caseinomacropéptido (22%), la α -Lactalbúmina (12%) y la inmunoglobulina G (9,5%). La proteína que está en menor cantidad (<5%) es la seroalbúmina. La β -LG no solo es la proteína más abundante del suero, sino también la más importante desde el punto de vista funcional (Christiansen et al., 2004).

Tabla 22: Composición proteica (% del total proteico)
(media \pm desviación estándar)
del suero caprino sin finos (n=3)

β -Lactoglobulina	52,02	\pm	2,05
Caseinomacropéptido	21,75	\pm	0,53
α -Lactalbúmina	11,96	\pm	1,05
Inmunoglobulina G	9,49	\pm	1,47
Seroalbúmina	4,79	\pm	0,33

Si se compara la composición proteica con la del suero dulce caprino (Casper et al., 1998), nuestro suero presenta un contenido de β -LG ligeramente inferior (52,0% vs 58,6%), siendo la cantidad de α -LA bastante menor (11,96% frente al 27,0%); sin embargo, el contenido de seroalbúmina es ligeramente superior (4,79% vs 4,00%). El valor de Ig G es similar (9,49% vs 9,70%). Es necesario subrayar, que estos autores no aportan datos sobre el contenido de otras proteínas, como es el caseinomacropéptido o glucomacropéptido (GMP).

Por otro lado, si se compara con la del suero ácido caprino (Law y Brown, 1994; Casper et al., 1998), se observa que el contenido, tanto de α -LA como de β -LG, es mayor al que presenta nuestro suero, aunque al igual que en el caso anterior, es muy acusada la diferencia de contenido de α -LA. La cantidad de Ig G como de seroalbúmina de nuestro suero es claramente mayor que la que está presente en el suero de Casper et al., (1998), en tanto que en el suero ácido de Law y Brown (1994) su contenido de Igs es relativamente mayor.

Si comparamos la composición proteica de nuestro suero con el porcentaje de las principales proteínas séricas del lactosuero bovino (Jelen, 1992; Etzel, 2004; Kilara y Vaghela, 2004; Bonnaille y Tomasula, 2008; Sullivan et al., 2008; tabla 4 de la introducción) se observan ciertas diferencias. El porcentaje de GMP de nuestro suero es superior, entre tanto la cantidad de α -LA y seroalbúmina es inferior al porcentaje medio que aparece en la tabla. Por otro lado, la proporción de β -LG e Ig se encuentran dentro del rango que aparece en la tabla para estas proteínas (48-58% y 8-12% respectivamente).

Resultados y Discusión

Varios autores (Casper et al., 1998; Moatsou et al., 2005) señalan que los sueros caprinos poseen una composición de proteínas diferente a la de los sueros bovino y ovino. De manera general, los porcentajes de β -LG en sueros caprinos son menores y los de α -LA mayores, si se comparan con sueros bovinos y ovinos (Law y Brown, 1994; Pintado y Malcata, 1996; Casper et al., 1998; Moatsou et al., 2005). Sin embargo nuestro suero presenta un contenido de β -LG similar al de lactosueros bovinos y no presenta un mayor contenido de α -LA que éstos. Con relación a la seroalbúmina, los valores de nuestro suero son menores que los del suero bovino y en cuanto a la Ig, el porcentaje es similar.

Aunque la mayoría de los autores no lo determinan, el GMP es una de las fracciones proteicas importantes en el lactosuero dulce, puesto que son fragmentos del extremo C-terminal resultantes de la acción de la enzima quimosina sobre la κ -caseína durante la coagulación de la leche en la elaboración de los quesos (Park et al., 2007) y constituye, aproximadamente, un 20% del total proteico del lactosuero dulce (Jelen, 2003). Este porcentaje es prácticamente idéntico al que presenta nuestro suero líquido que como se ha señalado anteriormente, es dulce ya que procede de un queso de coagulación enzimática.

2. OBTENCIÓN DE CPS Y SUBPRODUCTOS DE CLARIFICACIÓN: FLUJOS DE ULTRAFILTRACIÓN

En las figuras 16 y 17 se representa los flujos a medida que se ultrafiltra o dialfiltra el lactosuero líquido hasta alcanzar el volumen de retenido deseado. La filtración no se llevó a cabo de manera continua, sino que se realizó en varios días, por este motivo el flujo presenta esas oscilaciones en los valores y no disminuye gradualmente.

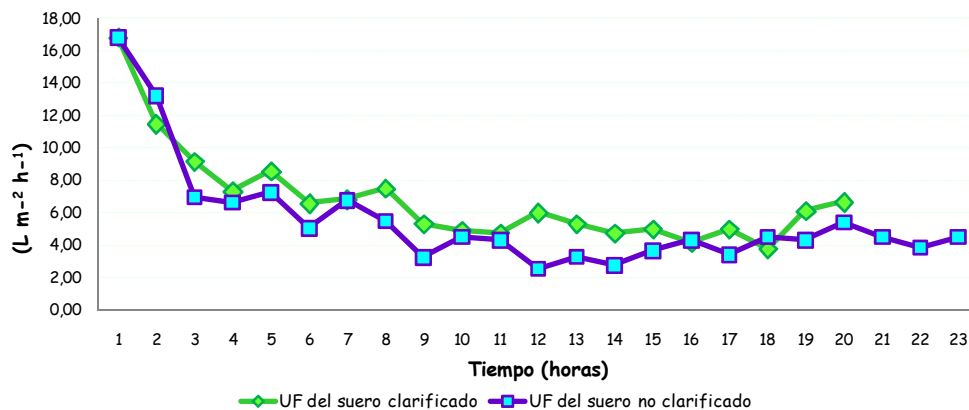


Figura 16: Valores del flujo ($Lm^{-2}h^{-1}$) de UF del suero clarificado y no clarificado a lo largo del tiempo hasta alcanzar el FCV de 10

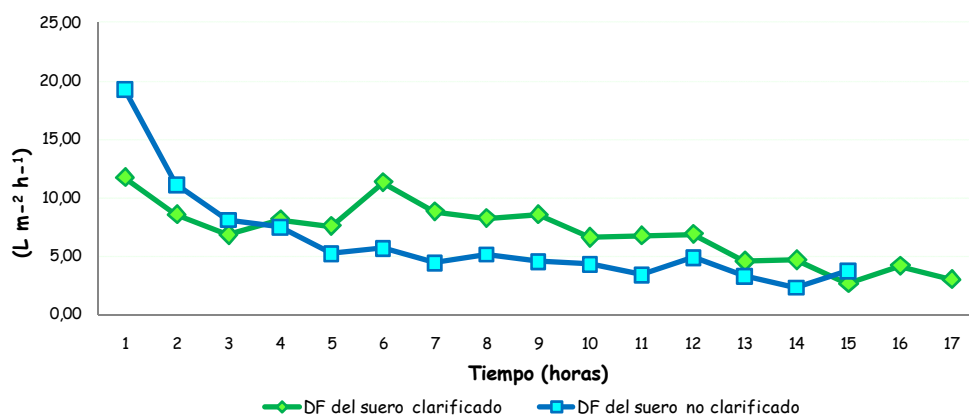


Figura 17: Valores del flujo ($Lm^{-2}h^{-1}$) de DF del suero clarificado y no clarificado a lo largo del tiempo hasta alcanzar el FCV de 10

El hecho de que la filtración no se realizara de forma continua se debe principalmente a que el volumen de suero era muy superior a la capacidad de la membrana, con lo que, aunque no se colmataba del todo, sí se reducía el flujo hasta valores muy pequeños, lo que alargaba el tiempo de filtrado. El proceso se realizó en pocos días ya que, aunque el suero se pasterizó siempre al día siguiente de la recogida en la quesería, es conveniente no tardar mucho en ultrafiltrar y diafiltrar tanto el suero clarificado como el no clarificado.

Resultados y Discusión

Los flujos fueron menores a los de Kim et al. (1989), Karleskind et al. (1995a) y Pereira et al. (2002), ya que el área de membrana que utilizan estos autores es de 0,46 m², de 2,3 m² y 1,1 m², respectivamente, frente a los 0,09 m² de nuestra membrana de UF.

Al observar ambas gráficas, se pueden destacar tres aspectos. En primer lugar se distingue que el tiempo necesario tanto para ultrafiltrar el suero clarificado como el no clarificado es mayor que el necesario para diafiltrar ambos tipos de lactosuero. Al aumentar el factor de concentración del suero por UF, se incrementa el contenido de sólidos del retenido, lo que afecta negativamente a los flujos de UF (Pereira et al., 2002). Tal como se explicó en la introducción durante la UF al ir incrementándose paulatinamente el contenido proteico del suero, aumenta de forma paralela su viscosidad, con lo que al añadirle agua al retenido para diluirlo y posteriormente filtrarlo, es decir llevar a cabo una DF, se hace menos viscoso, con lo que resulta más fácil realizar la filtración, y se consigue alcanzar el factor de concentración deseado en menor tiempo. También así se consigue obtener CPS con mayor contenido proteico y menor contenido de lactosa y minerales (Pal, 1993b; Rosenberg, 1995; Kelly, 2003; Smith, 2004).

En segundo lugar se advierte que el flujo del suero clarificado es mejor al de los sueros no clarificados, siendo más destacable durante la DF que durante la UF. La mejora del flujo (calculada como la relación entre el flujo clarificado y el no clarificado) es de 1,27 veces durante la UF, y de 1,42 veces durante la DF. Esta mejora es inferior a la señalada por otros autores: 1,8 con membrana de MF de 0,25 μm (Maubois et al., 1987), 3,2 con 0,20 μm de MF y 1,6 con membrana de MF de 0,65 μm (Pereira et al., 2002). Estos autores realizaron una MF previa a la UF.

Muchos trabajos (Kim et al. 1989; Baomy et al., 1990; Rinn et al., 1990; Karleskind et al., 1995a; Vaghela y Kilara, 1996b; Pereira et al., 2002) han aplicado la precipitación termocálcica seguida de microfiltración o de centrifugación para permitir la separación de los fosfolípidos y de los complejos entre el calcio y las lipoproteínas mejorando al mismo tiempo las condiciones de procesado del suero y las características funcionales de los deshidratados obtenidos.

En nuestro caso, se optó por esta segunda alternativa (precipitación termocálcica y centrifugación) para separar los agregados del suero, a pesar de que este método es menos eficiente que la microfiltración (Rinn et al., 1990; Pearce et al., 1991). Es necesario indicar que, en primer lugar, como se señaló en el apartado 2.3.2. de Material y Métodos, se optó por microfiltrar el suero clarificado, pero de este

modo se producía una rápida colmatación de la membrana de MF, lo que reducía de una manera importante el flujo, impidiendo la realización de un trabajo continuo. Por lo tanto, se desechó emplear la membrana de MF.

En tercer lugar, se observa una disminución del flujo drástica durante las 2-3 primeras horas de trabajo, y a continuación, aunque sigue descendiendo, lo hace mucho más lentamente hasta alcanzar unos valores casi estacionarios. Este patrón es típico de la UF del suero, tal como describe Hobman (1992). Esta reducción es de aproximadamente de un 50%, similar a la de Rinn et al. (1990) aunque en este caso se produce durante los primeros 45 minutos de UF. Una de las desventajas que presenta las membranas de UF es la colmatación de la membrana en las primeras etapas (Zall, 1992), siendo los complejos entre el calcio con las proteínas o con otras especies iónicas las principales responsables (Zall, 1992).

El manejo de membranas de filtración se caracteriza por un progresivo descenso del caudal a medida que aumenta el tiempo de uso. La rápida caída del flujo en los primeros momentos se atribuye al fenómeno de la polarización de la concentración (D´Souza y Mawson, 2005). Esto se produce por una concentración de solutos retenidos cerca de la membrana, a raíz de que la membrana posee una naturaleza semipermeable, lo que ocasiona una mayor concentración de solutos en la superficie de la membrana que en el seno de la disolución con lo que algunos de estos solutos retornan a la membrana. Los solutos rechazados se suelen depositar en su superficie formando una capa viscosa y gelatinosa, que suele ser la responsable del descenso del flujo de filtración (Hobman, 1992; Pal, 1993a).

En nuestro caso también se nota ese descenso del flujo, tal como se observa en las figuras 16 y 17, pero para evitar que el flujo no se ralentizará tanto, de forma que condujera a la paralización de la filtración, se recurrió a varias soluciones: aumentar la presión de filtrado, para, de ese modo, poder aumentar la velocidad de desplazamiento, invertir el flujo y aumentar la velocidad de la bomba, que normalmente era de 100 rpm. Después de este rápido descenso inicial, el caudal tiende a estabilizarse formando un flujo casi constante, lo cual es típico después de 1-2 horas (D´Souza y Mawson, 2005).

Aunque el flujo puede seguir disminuyendo lentamente a medida que avanza la filtración, la disminución final del flujo puede ser consecuencia de que la concentración de la capa de solutos ha llegado al punto de supersaturación, con lo que ya hablamos de ensuciamiento propiamente dicho, o colmatado de los poros de la membrana (Pal, 1993a). A diferencia de la polarización de la concentración, éste es un

Resultados y Discusión

fenómeno irreversible, que se atribuye a la acumulación o adsorción de macromoléculas, como proteínas, lípidos, microorganismos, y/o sales orgánicas sobre la superficie de la membrana o a la precipitación de solutos, como azúcares y sales, en los poros de la membrana (Pal, 1993a; D´Souza y Mawson, 2005). Los iones de calcio son de especial importancia por su habilidad de formar complejos insolubles con las proteínas, lípidos y con el fosfato (Hobman, 1992), y el fosfato cálcico puede precipitar en los poros de las membranas (Hiddink et al., 1981).

3. COMPOSICIÓN DE LOS CPS

En nuestro estudio obtuvimos dos tipos de CPS caprinos:

- ✓ Retenido de suero clarificado, obtenido tras separación de los agregados previo a la UF y DF (**CPS-C**).
- ✓ Retenido de suero no clarificado obtenido por UF y DF (**CPS-SC**).

Al mismo tiempo, se obtuvieron unos subproductos de clarificación separados por centrifugación (**Agregados**). Para poder comparar con un producto comercial, se analizó también un concentrado comercial de origen bovino (**CPS Bovino**).

3.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA

La composición química (extracto seco, cenizas, lípidos, proteínas, lactosa, calcio y lactatos) de los productos en polvo obtenidos del suero dulce caprino y del CPS comercial bovino se muestra en las tablas 23 y 24.

En la tabla 23 los valores vienen expresados en gramos/100g de producto en polvo, mientras que en la tabla 24 se representan como gramos/100 g de extracto seco.

Tabla 23: Composición química (%) (media \pm desviación estándar) de los productos en polvo obtenidos del suero caprino (n=3) y del concentrado de proteínas séricas bovino

	CPS-C ⁽¹⁾	CPS-SC ⁽²⁾	Agregados	CPS Bovino	(1)-(2)
Extracto Seco	95,38 \pm 1,13	97,56 \pm 0,68	95,12 \pm 1,23	92,67	*
Cenizas	1,15 \pm 0,10	0,65 \pm 0,27	10,72 \pm 1,23	3,39	*
Lípidos	5,91 \pm 3,08	53,18 \pm 6,34	34,60 \pm 4,64	4,32	***
Proteína (Bradford)	56,73 \pm 2,75	29,88 \pm 5,86	5,35 \pm 0,54	68,12	**
Proteína (Kjeldahl)	74,14 \pm 3,37	36,84 \pm 4,92	9,35 \pm 0,91	74,74	***
Lactosa	14,19 \pm 1,50	6,89 \pm 0,81	40,46 \pm 2,37	10,22	**
Calcio	0,56 \pm 0,06	0,18 \pm 0,16	2,64 \pm 0,72	0,39	*
Lactatos	3,27 \pm 0,70	3,23 \pm 0,77	3,19 \pm 0,60	1,84	n.s.

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados;

Agregados: Agregados en polvo; CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino.

a,b,c: medias en la misma fila con distinta letra difieren significativamente (p<0,05)

n.s. : no significativo (p>0,05); *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001

Tabla 24: Composición química sobre extracto seco (%) (media ± desviación estándar) de los productos en polvo obtenidos del suero caprino (n=3) y del concentrado de proteínas séricas bovino

	CPS-C ⁽¹⁾	CPS-SC ⁽²⁾	Agregados	CPS Bovino	(1)-(2)
Cenizas (%ES)	1,20 ± 0,11 b	0,66 ± 0,27 b	11,26 ± 1,29 a	3,66	*
Lípidos (%ES)	6,17 ± 3,15 c	54,49 ± 6,20 a	36,34 ± 4,43 b	4,66	***
Proteína (Bradford) (%ES)	59,48 ± 2,86 a	30,65 ± 6,19 b	5,63 ± 0,61 c	73,51	**
Proteína (Kjeldahl) (%ES)	77,74 ± 3,81 a	37,78 ± 5,26 b	9,83 ± 1,05 c	80,65	***
Lactosa (%ES)	14,88 ± 1,67 b	7,07 ± 0,86 c	42,56 ± 3,02 a	11,03	**
Calcio (%ES)	0,59 ± 0,06 b	0,19 ± 0,16 b	2,77 ± 0,72 a	0,42	*
Lactatos (%ES)	3,44 ± 0,77	3,32 ± 0,81	3,35 ± 0,62	1,99	n.s.

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados;

Agregados: Agregados en polvo; CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino.

a,b,c: medias en la misma fila con distinta letra difieren significativamente (p<0,05)

n.s. : no significativo (p>0,05); *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001

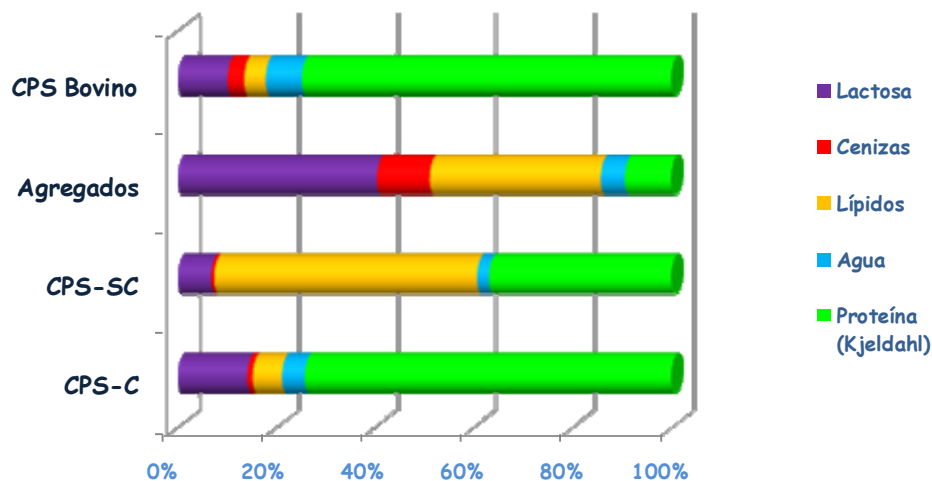


Figura 18: Composición química (%) de los productos en polvo obtenidos del suero caprino y del concentrado de proteínas séricas bovino

(CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificado, CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificado; Agregados: Agregados en polvo; CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino)

En el CPS obtenido por UF y DF (CPS-SC), se llegó a un contenido de proteína (método Kjeldahl) medio de 38% sobre materia seca. En este producto, los lípidos fue el componente más importante, con un porcentaje de 54% sobre materia seca. El contenido de cenizas y lactosa fue del 0,66 y 7,07% sobre materia seca, respectivamente. El proceso de separación de los agregados obtenidos por precipitación termocálcica realizado previamente a la UF y DF modificó la composición de los CPS obtenidos (CPS-C) que presentaron diferencias significativas con CPS-SC en la composición química. Así, se consiguió aumentar la cantidad de proteína en CPS-C hasta valores del 78% sobre extracto seco (método Kjeldahl). Este resultado se debió al descenso de los porcentajes de lípidos, que descendieron hasta valores del 6% sobre materia seca. La clarificación llevada a cabo mediante precipitación termocálcica (PT) disminuye el contenido lipídico del CPS obtenido. El proceso de la PT forma complejos insolubles entre el calcio y las lipoproteínas (Vaghela y Kilara, 1996b), de manera que estas lipoproteínas quedan retenidas en los agregados. Al no realizar desnatado previo, el gran descenso producido en el contenido de lípidos parece que es gracias a esta PT, en la que se ha eliminado no sólo lipoproteínas, sino también otros lípidos que no han sido separados previamente. El contenido de cenizas de CPS-C fue del 1,20% sobre materia seca, valor superior al de CPS-SC. El contenido de cenizas aumenta en los CPS a medida que se incrementa la cantidad de cloruro

Resultados y Discusión

cálcico añadido durante la PT (Vaghela y Kilara, 1996b); por tanto, el cloruro cálcico no se elimina totalmente en los agregados formados. Por el mismo motivo, el contenido de calcio es mayor en CPS-C que en CPS-SC. También la disminución del contenido de lípidos es responsable en gran parte del aumento de porcentaje de las cenizas y calcio en CPS-C en relación a CPS-SC.

Respecto del contenido de lactosa, los CPS clarificados (14,19%) presentan un valor medio superior al de los no clarificados (6,89%), lo que está relacionado con el mayor contenido lipídico de CPS-SC. Finalmente, no hay diferencia entre ambos CPS en el contenido de lactatos.

Los deshidratados obtenidos a partir de los agregados presentan una composición diferente de los CPS, debido fundamentalmente al menor contenido proteico que presentan, lógicamente al ser un subproducto en el proceso de elaboración de los CPS clarificados. Así, el nivel de proteína fue del 9,35% (método Kjeldahl). Los niveles de cenizas de los agregados (10,72%) son visiblemente mayores al de los CPS al estar en su composición sales fosfocálcicas. Lo mismo sucede con el contenido de calcio de los agregados (2,64%), que comparado con el de clarificados (0,56%) y no clarificados (0,18%) es superior. La mayor parte del calcio añadido durante la PT puede quedar retenido con las lipoproteínas (Maubois et al., 1987) pues la clarificación permite mejorar la actuación de la membrana de UF a través de la reducción de las sales de calcio (Musale y Kulkarni, 1998). El nivel de lípidos de los agregados es significativamente inferior al de CPS-SC y superior al de CPS-C. El alto contenido lipídico de los agregados (43% sobre extracto seco) es consecuencia del proceso de PT, en el que se separan las lipoproteínas que permanecen, principalmente, en este producto separado por centrifugación, aunque otros tipos de lípidos también formarán parte de dichos agregados. El contenido de lactosa de este deshidratado (42,56% sobre extracto seco) es significativamente superior al de CPS-C y CPS-SC. El porcentaje de lactatos de los tres tipos de productos caprinos es muy similar, en torno al 3,3% sobre extracto seco.

El CPS bovino comercial (Protarmor 800) empleado para comparar con los CPS caprinos obtenidos, presenta un contenido proteico similar al CPS caprino clarificado pero destaca su mayor contenido de cenizas. En relación a CPS-C, muestra un menor contenido de lípidos y lactosa.

Los productos en polvo caprinos obtenidos poseen un contenido de humedad inferior al 5%, a diferencia de lo que ocurre en el concentrado bovino comercial y en los CPS de otros autores (De Wit et al., 1986; Morr y Foegeding, 1990; Patel y Kilara,

1990; Pintado et al., 1999; Pereira et al., 2002). De Wit et al. (1986) señalan que estos porcentajes superiores al 5%, pueden ser consecuencia de que el almacenamiento del suero no se realizó en bolsas selladas herméticamente. De hecho, los productos con alto contenido proteico son muy higroscópicos, particularmente en la forma liofilizada (De Wit et al., 1986; Pintado et al., 1999), lo que implica la necesidad de un mayor cuidado durante el almacenamiento, para poder salvaguardar el flavor y las propiedades funcionales de los mismos (De Wit et al., 1986). Ji y Haque (2003) resaltan que el uso de evaporación a vacío con o sin UF y con o sin secado por atomización disminuye la humedad de los CPS. En nuestro trabajo, tanto el empleo de la liofilización como una adecuada conservación de los deshidratados (a vacío) hicieron que los productos tuvieran un contenido de humedad muy bajo.

La diferencia obtenida entre el valor de la proteína determinada por Kjeldahl y Bradford se puede atribuir a varios motivos. En primer lugar, el método Kjeldahl determina nitrógeno total, por lo que al calcular la proteína total se incluye compuestos nitrogenados no proteicos en el total. El método Bradford permite determinar el contenido de proteínas, dado que el colorante Coomassie blue se une a los residuos de arginina y lisina de las proteínas, pero no por ejemplo de los aminoácidos libres. Por otro lado, los resultados obtenidos con este método se ven afectados por la proteína que se emplee para elaborar la recta patrón. Hay una variación bastante importante en la respuesta que, a igualdad de concentración, presentan las diversas proteínas. Así, la serolbúmina, empleada con mucha frecuencia como patrón, presenta una absorbancia relativa 5 veces superior a la β -lactoglobulina (Kruger, 1996). Por ello es aconsejable emplear la proteína concreta que se va a determinar como patrón de calibración, así que, con objeto de que la determinación de proteína verdadera por Bradford se ajustara lo más posible a la composición de nuestras muestras y, en particular, a las tres proteínas más importantes en la funcionalidad de los CPS, se decidió utilizar una mezcla de proteínas séricas bovinas: β -LG, α -LA, y BSA, en una proporción similar a la que se encuentran en el suero (7:2:1). Es posible que otras proteínas incluidas en los CPS (inmunoglobulinas, GMP, etc.) presenten diferente absorbancia que las empleadas como patrón, por lo que esto puede también afectar a la diferencia que se observa entre ambos métodos de determinación proteica. Sin embargo consideramos que el método Bradford proporcionaba un buen indicativo de la concentración de las proteínas que más afectan a las capacidades emulsionantes, espumantes y gelificantes de los CPS experimentales.

Resultados y Discusión

Al igual que sucede con el lactosuero caprino, los trabajos sobre la composición físico-química de CPS de origen caprino son escasos (Casper et al., 1999; Pintado et al., 2001).

Casper et al. (1999) prepararon dos tipos de CPS: uno ácido y otro dulce, mediante desnatado, ultrafiltrado, diafiltrado y liofilizado. Estos tratamientos, a excepción de la separación lipídica, son similares a los experimentados por nuestro CPS no clarificado. El contenido proteico de ambos CPS caprinos de Casper et al. (1999), alrededor del 70% (66,7% el dulce y 71,8% el ácido), es ligeramente inferior al CPS clarificado, pero mayor al del CPS sin clarificar, mientras que el porcentaje de cenizas (mayor del 3%) y lactosa (mayor del 20%) es superior a ambos CPS (CPS-SC y CPS-C). El contenido de humedad de los CPS dulce y ácido de Casper et al. (1999) (2,20 y 3,30%, respectivamente), es similar al del CPS no clarificado (CPS-SC) y algo menor que el clarificado (CPS-C). El contenido de grasa de los deshidratados caprinos de Casper et al. (1999) es inferior al de nuestros productos en polvo caprinos debido probablemente a que estos autores desnataron el suero líquido, previo al resto de los demás tratamientos experimentados por los CPS. El contenido de calcio (0,27%) es inferior al CPS clarificado y superior al CPS sin clarificar.

Pintado et al. (1999), al igual que Casper et al. (1999), también elaboraron un CPS caprino, pero que no fue sometido a UF y DF, sino dializado. Su contenido proteico (63,44%) es inferior al producto en polvo clarificado, pero mayor al CPS sin clarificar, mientras que los valores de lactosa (17,03%), humedad (11,46%) y cenizas (4,30%) son superiores al de los dos CPS caprinos. El contenido de calcio (0,29%) es inferior al CPS clarificado y superior al CPS sin clarificar.

Por tanto, en estos dos trabajos realizados para la obtención de CPS caprinos no han llegado a la misma concentración proteica que en nuestro caso con el CPS clarificado a pesar de haber utilizado membranas de igual punto de corte (10 KDa), llevar a cabo la DF y además haber realizado un desnatado previo. El contenido de cenizas señalado por estos autores es superior en ambos casos al de nuestros CPS aunque el contenido de calcio es inferior (probablemente por la adición en nuestro caso de cloruro cálcico durante la precipitación termocálcica). El mayor contenido proteico obtenido en nuestro caso es consecuencia, probablemente, del empleo de la precipitación termocálcica y posterior separación de los agregados. Diferencias entre los distintos CPS de cabra pueden también deberse al proceso de elaboración de los quesos, sobre todo si los sueros son dulces o ácidos. El suero ácido, y por lo tanto los CPS ácidos, poseen un mayor contenido de cenizas y menor de lactosa, tal y como señalan Casper et al. (1999) al comparar CPS dulces y ácidos caprinos. En nuestro

caso, el que los CPS procedan de sueros dulces puede contribuir al bajo nivel de minerales obtenido.

Boumba et al. (2001) obtuvieron varios productos en polvo con diferentes contenidos proteicos, mediante UF y otras concentraciones sucesivas, a partir de lactosuero dulce de queso feta, mezcla de leche caprina y ovina. Entre los productos, obtuvo un concentrado con 35 % (CPS 35) y otro con 65% de proteína (CPS 65), que en función del contenido proteico, se pueden comparar a nuestro producto en polvo que no fue clarificado y al clarificado, respectivamente. El CPS 35 exhibe un mayor contenido de lactosa (50,7%) cenizas (5,7%), humedad (3,2%) y calcio (0,48%) que nuestro retenido que no ha sufrido clarificación, en cambio el contenido de lípidos (1,4%) es muy inferior. El CPS 65, por el contrario, sólo presenta un mayor contenido de lactosa (21,7%) y de cenizas (3,5%), mientras que la humedad (3,3%) y el calcio (0,35%) son menores al de nuestro polvo clarificado. Un dato relevante es el contenido lipídico, que en el CPS 65 fue mayor que el CPS 35 (3,6% frente al 1,4%) e inferior al del nuestro CPS clarificado (5,90%). Las diferencias en el contenido grasa entre nuestro producto clarificado y los CPS 35 y 65 no son tan amplias, a pesar de que los CPS obtenidos por Boumba et al. (2001) han sido desnatados previamente a su obtención. Destaca también el menor contenido de cenizas de nuestros CPS.

A continuación, comparamos los resultados aquí obtenidos con los trabajos previos de nuestro grupo de investigación con suero ovino (Pereira et al., 2002) que realizaron de la misma manera la obtención de CPS excepto que los agregados producidos por la precipitación termocálcica fueron separados por microfiltración. Otra diferencia es que los sueros fueron desnatados previamente a la precipitación termocálcica. Los dos tipos de CPS ovinos, obtenidos tras PT, MF (0,65 μm ó 0,20 μm de tamaño de poro), UF y DF (Pereira et al., 2002) presentaron un contenido proteico menor al de nuestro producto en polvo clarificado (67 y 22% de proteína respectivamente). El motivo es que la microfiltración retiene un mayor contenido de proteínas que el uso de decantación y centrifugación tras la precipitación termocálcica. El contenido de lípidos (alrededor del 0,45%) es inferior al de nuestros clarificados por, probablemente, el desnatado del suero previo a la precipitación termocálcica. El contenido de cenizas es superior (valores de 9,3 y 28,9% con el uso de 0,65 μm ó 0,20 μm de tamaño de poro respectivamente). Este mayor contenido puede deberse a la diferente composición de los sueros ovino y caprino, ya que los primeros tienen un elevado contenido de cenizas (2,9%) Sin embargo, el contenido de calcio que obtuvieron en los diafiltrados (entre 0,06 y 0,09%) es inferior al reportado en nuestro trabajo. Los retenidos de microfiltración del trabajo de Pereira et al.

Resultados y Discusión

(2002) presentaron un mayor contenido proteico y de cenizas que los agregados recogidos en nuestro trabajo; sin embargo, los niveles de grasa y calcio de dichos retenidos fueron inferiores a los de nuestros agregados.

Se han realizado otros trabajos con precipitación termocálcica previa a la obtención de los CPS de sueros bovinos (Rinn et al., 1990; Karleskind et al. 1995a; Vaghela y Kilara, 1996b). Rinn et al. (1990) obtuvieron CPS de diversa composición según el proceso de clarificación empleado y según la extensión de la UF y DF realizada. Cuando eliminaron los agregados por centrifugación obtuvieron CPS con un contenido proteico de 75,6%, similar al de nuestro producto en polvo clarificado. El contenido de cenizas y calcio del CPS fue muy superior (6,5 y 2,21%, respectivamente). En el momento que combinaron centrifugación y microfiltración para separar los agregados, consiguieron reducir más las cenizas y el calcio (hasta 3,8 y 0,74%) pero siguió siendo superior al señalado en nuestro trabajo. En este caso aumentaron el contenido proteico de los CPS hasta 80,9%. Sólo cuando el pH lo ajustaron a 4,0 antes de la ultrafiltración consiguieron reducir las cenizas y calcio hasta valores próximos al de nuestro producto clarificado aunque todavía algo superior (1,4 y 0,32%, respectivamente) siendo el contenido proteico similar (77,0%). En estos productos no determinaron el contenido de lípidos. Karleskind et al. (1995a) obtuvieron CPS mediante precipitación termocálcica, UF y DF con un contenido proteico de 77,0% parecido al de nuestro producto en polvo clarificado. El contenido de cenizas del CPS (2,64%) fue también superior al de CPS-C; sin embargo los niveles de calcio fueron inferiores (0,39%). La cantidad de lípidos fue inferior (3,9%), consiguiendo aún mayor descenso en el contenido lipídico cuando emplearon MF (valores de 0,3-0,5%); no obstante, el contenido de cenizas fue superior (2,8-3,0%) y el contenido proteico similar (74-80%) con el empleo de MF con membranas de diferente tamaño de poro (0,1 y 0,45 μ m). Vaghela y Kilara (1996b) también aplicaron la PT, seguida de centrifugación, UF y DF, no aplicando al igual que en nuestro caso la MF; sin embargo, obtuvieron CPS con diferente composición, puesto que los valores de proteína fueron menores al nuestro (57,6-64,0%), mientras que los contenidos de lactosa (19,9-27,4%), de cenizas (9,0-9,5%) y calcio (2,65-2,82%) fueron muy superiores. Un mayor contenido de cloruro cálcico añadido para realizar la PT incrementa el contenido de calcio en los CPS. Por el contrario, el tratamiento aplicado mediante PT y centrifugación sí consiguió separar más lípidos, pues alcanzaron unos valores de 2,32-3,08%.

A pesar de que no se han encontrado muchos trabajos sobre CPS caprinos u ovinos, existe un gran número de publicaciones que se centran principalmente en CPS

bovinos. Teniendo en cuenta artículos de CPS bovinos, el CPS clarificado obtenido tiene una composición comparable a nivel proteico, por un lado, a la de los CPS dulces analizados por Morr (1985), los CPS ácido y neutro elaborados por De Wit et al. (1986), al CPS dulce obtenido a partir de leche entera de Patel y Kilara (1990) y al CPS comercial estudiado por Holt et al. (1999a), y por otro lado, a los CPS dulces de Kim et al. (1987) y de Mangino et al. (1987). Todos estos concentrados tienen en común que no han sido sometidos a clarificación mediante PT, sin embargo sus diferencias radican en que el primer grupo (Morr, 1985; De Wit et al., 1986; Patel y Kilara, 1990; Holt et al., 1999a) se caracterizan por haber experimentado UF seguida de DF, en cambio el segundo grupo (Kim et al., 1987; Mangino et al., 1987) únicamente han sufrido UF. Las principales diferencias se encuentran en el porcentaje de lactosa del CPS neutro de De Wit et al. (1986), de Patel y Kilara (1990) y en el contenido lipídico y de calcio de Holt et al. (1999a) que son inferiores al de nuestro producto en polvo clarificado, mientras que el contenido de cenizas de Kim et al. (1987) y Mangino et al. (1987) son mayores al de nuestro producto en polvo clarificado.

Los diferentes concentrados comerciales analizados por Morr y Foegeding (1990), de los que no se conoce su proceso de elaboración, presentaron una composición proteica (72,0-76,6%) y lipídica (3,30-7,38%) similar al de nuestro CPS clarificado, aunque los contenidos de cenizas (2,56-6,04%) y de humedad (4,14-6,01%) son claramente superiores a los de nuestro producto en polvo clarificado. Por el contrario el contenido de lactosa (2,13-5,75%) es notablemente inferior al de nuestro producto clarificado.

En general, en comparación con CPS bovinos comerciales u obtenidos en planta piloto de un contenido proteico de alrededor de 80% de proteína, nuestros CPS caprinos presentan un menor contenido de cenizas y mayor de lactosa que los CPS bovinos. La separación de los agregados y el empleo de DF tras la UF han permitido reducir de una manera importante el contenido de minerales de nuestro suero. También es importante en el contenido de minerales, como se señaló anteriormente, si los CPS proceden de sueros dulces o ácidos. Pero no sólo existen estas diferencias en el contenido de minerales entre CPS dulces y ácidos, sino también entre CPS caprinos y bovinos, siendo en estos últimos claramente superiores (Casper et al., 1999; Pintado et al., 1999). De hecho, el CPS bovino que empleamos y los CPS de otros autores (Kim et al., 1987; Mangino et al., 1987; Rinn et al., 1990; Vaghela y Kilara, 1996b; Casper et al., 1999; Pintado et al., 1999) poseen un mayor contenido de cenizas que nuestros deshidratados clarificados y no clarificados.

Resultados y Discusión

La composición del CPS no clarificado (de 38% de proteína sobre extracto seco) puede compararse, fundamentalmente desde el punto de vista proteico, a los CPS bovinos obtenidos por Ji y Haque (2003), a los CPS obtenidos por Fachin y Viotto (2005), al CPS dulce de Heino et al. (2007) y al CPS elaborado por Evans et al. (2009), los cuales a diferencia de nuestro producto en polvo, han sido únicamente ultrafiltrados, y los de Ji y Haque (2003) y Evans et al. (2009), desnatados. Nuestro concentrado posee un menor contenido de cenizas y lactosa, pero un contenido proteico ligeramente mayor y un porcentaje lipídico claramente superior. Estos datos demuestran que el hecho de valerse de la DF, favorece la disminución del contenido de lactosa, mineral y aumenta el proteico. Además, a pesar de haber sufrido un desnatado, los CPS bovinos de Ji y Haque (2003) poseen un contenido lipídico ligeramente elevado (15,34 y 9,06%), incluso mayor que el de nuestro CPS clarificado.

De manera general, el CPS no clarificado (CPS-SC), en comparación con CPS bovinos comerciales de 35% de proteína y los señalados en el párrafo anterior, presenta un porcentaje de cenizas bastante inferior tal como sucedía en la comparación del CPS clarificado (CPS-C) con los CPS bovinos. En este caso, CPS-SC muestra un contenido lipídico muy superior y de lactosa inferior que los CPS bovinos del mismo o similar contenido proteico. El empleo del desnatado previo al proceso de separación con membranas utilizado en muchos trabajos es probablemente el motivo del mayor contenido de grasa en CPS-SC.

En términos de contenido cálcico, los CPS caprinos y ovinos son más similares entre sí que comparándolos con los de origen bovino, que poseen un mayor contenido, generalmente el doble (Pintado et al., 1999; Casper et al., 1999), aunque se señala (Haenlein, 2001) que la leche de cabra presenta, normalmente, niveles superiores de calcio que la leche de vaca. En nuestro caso, el CPS comercial bovino que analizamos, junto con los CPS bovinos de Patel et al. (1990) y de Casper et al. (1999), poseen algo más del doble de calcio que nuestro producto en polvo no clarificado, que al mismo tiempo contiene cantidades muy similares de calcio que el CPS dulce ovino de Casper et al. (1999). El contenido de calcio de los CPS de estos autores es más similar al de nuestro CPS clarificado.

3.2. FRACCIONAMIENTO LÍPIDICO

En la tabla 25 se refleja el porcentaje de las diferentes fracciones lipídicas (lípidos neutros, fosfolípidos y ácidos grasos libres) de los productos en polvo obtenidos del suero dulce caprino y del CPS bovino. Los valores se expresan como % de lípidos totales.

Tabla 25: Fracciones lipídicas (% del total lipídico) (media \pm desviación estándar) de los productos en polvo obtenidos del suero caprino (n=3) y del concentrado de proteínas séricas bovino

	CPS-C ⁽¹⁾	CPS-SC ⁽²⁾	Agregados	CPS Bovino	(1)-(2)
Lípidos neutros	86,22 \pm 1,09 b	90,83 \pm 1,72 a	91,48 \pm 3,35 a	79,33	*
Fosfolípidos	7,01 \pm 0,65	5,45 \pm 0,32	5,39 \pm 1,99	16,20	*
Ácidos grasos libres	6,76 \pm 0,82 a	3,71 \pm 2,03 b	3,12 \pm 1,43 b	4,47	n.s.

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados;

Agregados: Agregados en polvo; CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino.

a,b,c: medias en la misma fila con distinta letra difieren significativamente (p<0,05)

n.s.: no significativo (p>0,05); *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001

Resultados y Discusión

El principal componente del contenido lipídico (Figura 19), tanto de los productos en polvo caprinos como del concentrado de proteínas séricas bovino, son los lípidos neutros.

En el caso de los polvos de origen caprino, los valores de los lípidos neutros de los tres tipos son superiores al 86%, mientras que el concentrado comercial posee un porcentaje bastante inferior (79,33%). Si comparamos estadísticamente los tres tipos de polvos de origen caprino entre sí, observamos que entre los no clarificados y los agregados (90,83% y 91,48%, respectivamente) no existen diferencias significativas, pero sí con el producto que ha sido clarificado (86,22%), que presenta un porcentaje menor de lípidos neutros.

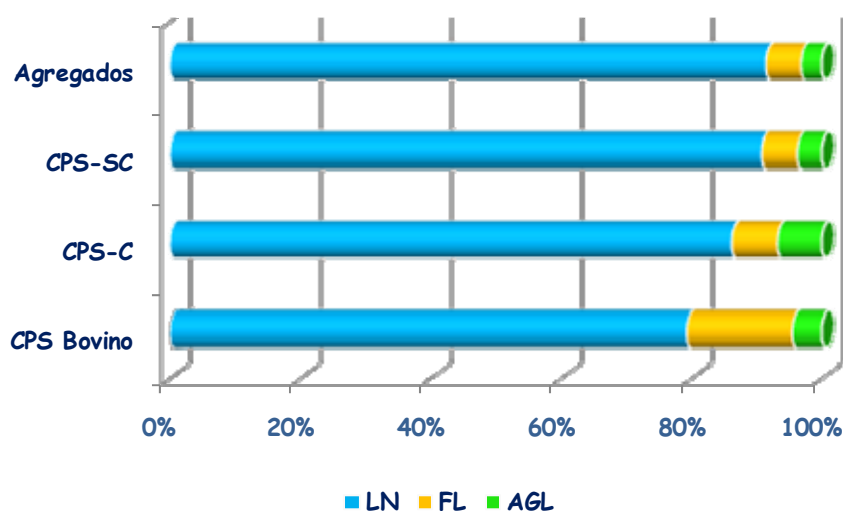


Figura 19: Contenido (%) de LN, FL y AGL de los polvos de suero caprino y del concentrado de proteína bovino

(LN: lípidos neutros; FL: Fosfolípidos; AGL: Ácidos grasos libres; CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificado, CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificado; Agregados: Agregados en polvo; CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino)

La segunda fracción lipídica de mayor contenido son los fosfolípidos, aunque su proporción es muy inferior a la de los lípidos neutros. Si comparamos estadísticamente los tres tipos de polvos de origen caprino no se observan diferencias significativas, pero si comparamos directamente los polvos clarificados con los no clarificados, sí se distinguen diferencias significativas. Se observan valores entre 7,01% para los clarificados y 5,45% y 5,39% para el producto no clarificado y

los agregados, respectivamente. Sin embargo el concentrado de suero bovino posee un contenido de fosfolípidos visiblemente superior (16,20%).

Los ácidos grasos libres pertenecen a la fracción que se encuentra en menor proporción. Existen diferencias significativas entre los valores de los productos no clarificados (3,71%) y los agregados (3,12%) con los clarificados (6,76%). El contenido de ácidos grasos libres del concentrado de proteína sérica bovina (4,47%) presenta valores superiores a los de los no clarificados y agregados pero menores que los de CPS clarificados.

El contenido de lípidos neutros (86-91%) es algo superior al recogido por Vaghela y Kilara, (1996b) que observaron en CPS de 35 y 75% de proteína porcentajes entre 77 y 83% del total lipídico. Los lípidos neutros están constituidos fundamentalmente por los triacilgliceroles o triglicéridos. En la grasa de leche de cabra, los triacilgliceroles son los principales componentes (Park, 2006), por eso no es de extrañar, que también sean los constituyentes mayoritarios de la fracción lipídica de todos nuestros productos de proteínas séricas, al igual que ocurre con los CPS de otros autores (De Wit et al., 1986; Patel et al., 1990; Vaghela y Kilara, 1996b). De Wit et al. (1986) y Vaghela y Kilara (1996b) señalan niveles de triacilgliceroles en diferentes CPS, respectivamente, de 48-53% y 53-63% del total lipídico. El hecho de que los triacilgliceroles estén en mayor cantidad en relación a los otros componentes, puede ser consecuencia de la presencia en el suero de pequeños glóbulos grasos (De Wit et al., 1986). Los lípidos presentes en el suero están asociados a la membrana del glóbulo graso (Walzem et al., 2002) y estos glóbulos no pueden ser separados por centrifugación porque su densidad media no difiere suficientemente de la densidad de la solución acuosa (De Wit et al., 1986). El resto de lípidos neutros están constituidos fundamentalmente por diglicéridos o diacilgliceroles (5-8%) y monoglicéridos o monoacilgliceroles (1-10%) (Vaghela y Kilara, 1996b), porcentajes mayores de los que hay en leche debido a una cierta hidrólisis de los triglicéridos.

Los contenidos de ácidos grasos libres en distintos CPS es variable; así De Wit et al. (1986) señalaron valores entre el 7 y el 15 % y Vaghela y Kilara (1996b) observaron porcentajes entre 1,80 y 3,47% del total lipídico, estando los valores de nuestros concentrados caprinos y comercial (3-6%) entre los resultados de ambos trabajos. Vaghela y Kilara (1996b) observaron un menor contenido de ácidos grasos libres en los CPS de 35% de proteína que en los de 75% de proteína, al igual que ocurrió en nuestros concentrados CPS-SC y CPS-C.

Resultados y Discusión

La contribución de los fosfolípidos en el total lipídico observado en distintos trabajos sobre CPS también es muy variable. De Wit et al. (1986) encuentran el 27-28%, Vaghela y Kilara (1996b) señalaron el 13,35-18,90%, valores superiores al de nuestros concentrados caprinos. Karleskind et al. (1995) observaron que la proporción de fosfolípidos en el total lipídico era muy variable (entre 7,3 y 53,6%), sin que pudieran explicar dichas diferencias.

El contenido de fosfolípidos de los diferentes CPS comerciales elaborados por UF (Morr y Foegeding, 1990) varía entre 0,80 y 1,49% del total del CPS, lo que representa entre el 21 y el 46% del total lipídico, valores superiores a los de nuestros productos.

Por tanto, en general, nuestro CPS presentan un mayor contenido de lípidos neutros y menor de fosfolípidos que otros CPS, lo que probablemente puede deberse a una mayor cantidad de glóbulos grasos (donde se encuentran los triglicéridos) no eliminados por centrifugación del suero de partida. También se puede observar como la precipitación termocálcica seguida de la separación de los agregados no disminuye el contenido de fosfolípidos. Vaghela y Kilara (1996b) señalaron lo mismo, pues observaron que el pretratamiento del lactosuero con bajas concentraciones de CaCl_2 (0,2 g Ca/l) no afecta a la composición lipídica de los CPS; en cambio la adición de una mayor cantidad de CaCl_2 (0,6 g Ca/l) incrementa significativamente la proporción de fosfolípidos y disminuye la de triglicéridos, tal como sucede en el CPS clarificado (CPS-C), cuyo contenido de fosfolípidos es mayor al de los productos en polvo no clarificados (CPS-SC). Por ello, Vaghela y Kilara (1996b) destacan que el pretratamiento del suero con CaCl_2 no separa selectivamente los fosfolípidos, lo que parece no cumplir lo señalado por Maubois et al (1987), que indicaron que la precipitación termocálcica eliminaría fosfolípidos tras la centrifugación o microfiltración, los cuales quedarían en los agregados. Estos agregados, obtenidos tras la aplicación de centrifugación al suero clarificado, según Rosenberg (1995) serían una buena fuente de fosfolípidos. Sin embargo su contenido de fosfolípidos, comparado con el resto de productos en polvo, no es muy diferente del resto. La precipitación termocálcica sí permite una mayor separación de triacilglicerolos que de otro tipo de lípidos, y una reducción general del contenido lipídico. El CPS clarificado es el que presenta el menor contenido graso y de triacilglicerolos.

3.3. COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

La tabla 26 recoge el perfil de ácidos grasos de los diferentes productos estudiados, así como la suma total de los ácidos grasos saturados (SFA), de los monoinsaturados (MUFA) y de los poliinsaturados (PUFA).

Los ácidos grasos mayoritarios en todos los productos caprinos son el ácido palmítico (C16:0), seguido del ácido oleico (C18:1), y de los ácidos esteárico (C18:0), cáprico (C10:0) y mirístico (C14:0). El palmítico se encuentra en proporciones superiores al 26% mientras que el oleico está en valores del 23-24%. Los tres restantes aparecen en porcentajes similares, en torno al 10%. En resumen, los cinco ácidos grasos más importantes, en términos cuantitativos, y que representan un porcentaje en total mayor del 75%, son el C16:0, C18:1, C10:0, C18:0 y C14:0. En menores proporciones se encuentran el ácido linoleico (C18:2) (2-4%) y los ácidos grasos saturados de cadena corta butírico (C4:0), caproico (C6:0) y caprílico (C8:0) que están en porcentajes de alrededor de 2-3% cada uno. El resto de ácidos grasos presentes están en cantidades inferiores al 1% excepto el ácido C15:0 que presenta valores del 1,1-1,2%.

La grasa en los tres productos caprinos es predominantemente saturada (71-73%), siendo el contenido en monoinsaturados del 24-26% debido principalmente al ácido oleico. El contenido total de ácidos grasos poliinsaturados es bajo (3-4%), siendo el principal el linoleico. El elevado contenido de SFA se debe principalmente a los ácidos cáprico, mirístico, palmítico y esteárico.

Se observa diferencias estadísticamente significativas entre el CPS-C y los otros dos deshidratados caprinos en los siguientes ácidos grasos: C4:0, C8:0, C12:0 y C18:2 y, por la cantidad de este último ácido, el contenido total de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) difiere entre ellos, siendo significativo entre CPS-C y CPS-SC. Las diferencias en la cantidad de PUFA quizás puede deberse a la distinta proporción de fosfolípidos entre los productos caprinos. Los fosfolípidos tienen una mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados (Walstra et al., 2006) y al tener el concentrado de proteínas séricas clarificado (CPS-C) un mayor porcentaje de fosfolípidos, éste presenta una mayor cantidad de C-18:2 y del total de grasa poliinsaturada.

Resultados y Discusión

Tabla 26: Perfil de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) (media \pm desviación estándar) de los productos en polvo obtenidos del suero caprino (n=3) y del concentrado de proteínas séricas bovino

	CPS-C ⁽¹⁾	CPS-SC ⁽²⁾	Agregados	CPS Bovino	(1)-(2)
4:0	1,59 \pm 0,17 b	2,02 \pm 0,22 a	2,09 \pm 0,13 a	1,14	n.s.
6:0	1,82 \pm 0,58	2,25 \pm 0,24	2,37 \pm 0,24	0,86	n.s.
8:0	2,41 \pm 0,37 b	2,89 \pm 0,13 a	2,98 \pm 0,02 a	0,53	n.s.
9:0	0,02 \pm 0,00	0,04 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	0,10	n.s.
10:0	10,67 \pm 0,46	11,64 \pm 1,01	11,10 \pm 0,30	1,66	n.s.
10:1	0,18 \pm 0,09	0,18 \pm 0,07	0,13 \pm 0,03	0,11	n.s.
11:0	0,06 \pm 0,03	0,06 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,05	n.s.
12:0	4,08 \pm 0,06 b	4,31 \pm 0,08 a	4,38 \pm 0,07 a	2,76	*
13:0	0,07 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,07 \pm 0,00	0,08	n.s.
14:0	10,31 \pm 1,20	9,73 \pm 0,53	9,91 \pm 0,25	10,85	n.s.
14:1	0,10 \pm 0,01 b	0,11 \pm 0,01 a	0,10 \pm 0,01 b	0,73	n.s.
15:0	1,24 \pm 0,16	1,09 \pm 0,06	1,08 \pm 0,03	1,36	n.s.
16:0	26,39 \pm 1,08	26,49 \pm 0,65	27,18 \pm 0,67	31,30	n.s.
16:1	0,37 \pm 0,02	0,53 \pm 0,21	0,54 \pm 0,19	1,43	n.s.
17:0	0,69 \pm 0,08	0,68 \pm 0,03	0,69 \pm 0,03	0,64	n.s.
17:1	0,32 \pm 0,01	0,30 \pm 0,01	0,31 \pm 0,05	0,36	n.s.
18:0	11,59 \pm 0,89	10,58 \pm 1,69	11,41 \pm 2,23	11,02	n.s.
18:1	23,80 \pm 2,19	24,38 \pm 0,70	22,58 \pm 1,92	30,16	n.s.
18:2 n-6	3,57 \pm 0,89 a	1,85 \pm 0,59 b	2,21 \pm 0,11 b	4,22	*
18:3 n-3	0,72 \pm 0,14	0,79 \pm 0,10	0,80 \pm 0,16	0,66	n.s.
SFA	70,94 \pm 1,23	71,86 \pm 1,27	73,33 \pm 1,91	62,34	n.s.
MUFA	24,76 \pm 2,17	25,51 \pm 0,84	23,66 \pm 2,17	32,78	n.s.
PUFA	4,29 \pm 1,03 a	2,64 \pm 0,57 b	3,01 \pm 0,26 ab	4,88	n.s.

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados; Agregados: Agregados en polvo; CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino.

a,b,c: medias en la misma fila con distinta letra difieren significativamente ($p < 0,05$)
n.s. : no significativo ($p > 0,05$); *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

SFA: Suma de los ácidos grasos saturados;
MUFA: Suma de los ácidos grasos monoinsaturados;
PUFA: Suma de los ácidos grasos poliinsaturados

En líneas generales, la composición de los ácidos grasos de los concentrados caprinos se asemeja a la de la leche de cabra (Park, 1996; Alonso et al., 1999; Bañón et al., 2006), a la de los quesos de cabra (Lucas et al., 2008) o al suero caprino (Moreno-Indias et al., 2009). En este último trabajo, único encontrado sobre ácidos grasos de lactosuero de cabra, el porcentaje del ácido mirístico (C14:0) (14-15%) es muy superior al de nuestros CPS caprinos, aunque hay que señalar que en este estudio no determinaron ácidos grasos de cadena inferior a 14 átomos de carbono.

Las técnicas de elaboración quesera, a diferencia de lo que ocurre en la composición total del suero, o incluso en su perfil proteico, parece que no afectan al perfil de ácidos grasos del suero caprino (Moreno-Indias et al., 2009). A pesar de ello, los PUFA son sensibles a la luz, al oxígeno y a la temperatura; por tanto, si no se expone la leche a temperaturas excesivas, a la luz o al oxígeno y se maneja con cuidado (sin centrifugación ni homogeneización para mantener intactas las membranas de los glóbulos grasos que protegen los ácidos grasos), se puede preservar la composición lipídica original de la leche de cabra (Moreno-Indias et al., 2009).

No hay mucha información disponible de cómo afectan los tratamientos a los que se somete el suero al contenido lipídico. Vaghela y Kilara (1996b) apuntan que un pretratamiento previo del lactosuero, que incluya el calentamiento a 65°C con o sin adición previa de CaCl₂, no afecta a la composición de ácidos grasos de los CPS. Tanto el perfil de ácidos grasos como las proporciones de SFA, MUFA y PUFA de los tres tipos de CPS caprinos obtenidos son muy similares entre sí y con la leche (Alonso et al., 1999), los quesos (Lucas et al., 2008) y sueros (Moreno-Indias et al., 2009) de origen caprino, lo que nos llevaría a concluir que, a pesar de experimentar diferentes tratamientos, la composición en ácidos grasos se mantiene prácticamente idéntica desde la leche hasta sus productos. Probablemente, si en nuestro trabajo se hubieran eliminado o reducido de una manera importante los fosfolípidos en CPS-C, el contenido de ácidos grasos poliinsaturados hubiera disminuido.

Los porcentajes de ácidos grasos de los tres productos en polvo caprinos presentan ciertas diferencias con los del concentrado bovino comercial estudiado. La grasa de nuestros CPS caprinos es por término medio más rica en ácidos grasos de cadena corta y media, tales como C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, que la del concentrado bovino comercial, mientras que éste tiene un mayor porcentaje de C16:0, C16:1, C18:1 y C18:2. El contenido de SFA de los productos caprinos tiene una media en torno al 72%, mientras que en CPS bovino es claramente inferior (62,34%), consecuentemente poseen un mayor contenido de ácidos grasos insaturados, tanto poliinsaturados (4,88%) como monoinsaturados (32,78%). Estos resultados están de acuerdo con los

Resultados y Discusión

de Haenlein (2001) y Lucas et al. (2008) excepto que Haenlein (2001) señala que la leche caprina no sólo es rica en ácidos de cadena media, sino que también posee más MUFA y PUFA que la leche de vaca. Como se señaló en las diferencias entre CPS-C y CPS-SC, el mayor contenido de PUFA del concentrado bovino comercial estudiado puede deberse a la mayor cantidad de fosfolípidos que presentan (Tabla 25).

Por tanto, los concentrados caprinos destacan notablemente por su contenido (>14%) en los ácidos grasos de cadena corta (C4:0, C6:0, C8:0 y C10:0), y especialmente el C10:0, que supone un porcentaje próximo al 10%, al igual que sucede con el perfil lipídico de la leche caprina de Alonso et al. (1999) y los quesos de cabra de Lucas et al. (2008). Estos ácidos grasos son característicos de la leche de origen caprino y se encuentran en porcentajes mayores que en la leche ovina (Jandal, 1996) o en la leche de vaca (Tziboula-Clarke, 2003; Park et al., 2007), como resultado de una diferente polimerización del acetato producido por las bacterias del rumen (Tziboula-Clarke, 2003). El característico "sabor a cabra" parece ser consecuencia de este tipo de ácidos grasos (Tziboula-Clarke, 2003), los cuales parece que son más fácilmente atacados por las lipasas, lo que favorece que la grasa de origen caprino sea más digerible (Jenness, 1980). Además se utilizan para detectar adulteraciones con leche de otras especies (Park et al., 2007).

Al igual que nuestros CPS, los ácidos grasos predominantes en los CPS y APS comerciales bovinos analizados por Vaghela y Kilara (1996b) y Holt et al. (1999a) fueron el palmítico (C16:0), el oleico (C18:1) y el mirístico (C14:0). También destaca el ácido esteárico (C18:0), que en nuestro estudio presenta porcentajes muy similares al mirístico, mientras que, en los CPS de Vaghela y Kilara (1996b) y Holt et al. (1999a), el ácido graso C18:0 aparece en porcentajes inferiores al C14:0.

Los ácidos grasos C12:0, C14:0, C18:3 de los CPS analizados por Vaghela y Kilara (1996b) se encuentran en mayor proporción que en nuestros productos, mientras que los ácidos de cadena corta (C4:0, 6:0, 8:0, 10:0) y el C18:1 se encuentran en mucha menor cantidad. Por el contrario los ácidos C15:0 y C18:0 poseen porcentajes similares al de nuestros concentrados. Sin embargo, hay que señalar que los resultados de estos autores se refieren a la composición de ácidos grasos libres.

Holt et al. (1999a) estudiaron el perfil lipídico, cuantificando los ácidos grasos de más de 12 carbonos, de diferentes CPS y APS comerciales. Las proporciones de C14:0, C15:0, C16:0, C16:1 y C18:2 de su CPS comercial son mayores a las de nuestros productos en polvo caprinos, en cambio éstos poseen un mayor contenido de C12:0. Además los porcentajes de C18:0 y C18:1 son muy similares. Al comparar nuestro CPS

bovino con el de Holt et al. (1999a) observamos casi los mismos resultados que con los CPS caprinos, a excepción del C12:0 de nuestro CPS bovino que es inferior, el C18:1 es bastante mayor y el porcentaje de C16:1 es similar al de CPS comercial de Holt et al. (1999a).

3.4. COMPOSICIÓN PROTEICA

La composición proteica de los concentrados de proteínas séricas caprinos, de los agregados caprinos y del CPS bovino comercial se muestra en la tabla 27. Los resultados se expresan como gramos/100g de proteínas totales.

La proteína mayoritaria en el concentrado comercial y en los productos en polvo clarificados y no clarificados, al igual que sucedía en el lactosuero líquido, es la β -LG, la cual aparece en porcentajes superiores al 60%. A continuación se encuentran en proporciones similares la α -LA y el caseinomacropéptido (11-13%), estando la Ig G con valores medios algo inferiores (9-11%). Por último, y no por ello menos importante, está la seroalbúmina como la proteína minoritaria (3,3-4,2%). En término medio, la composición proteica de los CPS caprinos clarificados y no clarificados es muy similar al CPS bovino, no existiendo diferencias significativas entre los CPS caprinos clarificados y no clarificados.

Los agregados, por el contrario, muestran un patrón de proteínas muy diferente, con diferencias significativas con los CPS caprinos. Aunque la proteína mayoritaria es la misma, la β -LG, ésta posee un porcentaje inferior al de los CPS, en torno al 32%, similar al del caseinomacropéptido (30,6%), valor muy superior al de los concentrados. A continuación se encuentra la Ig G en una proporción mayor a la del resto de productos en polvo (18,9%). Las proteínas minoritarias son la α -LA y la seroalbúmina. La α -LA se halla en un porcentaje (11,5%) similar al de los otros concentrados, mientras que la seroalbúmina posee un contenido superior (6,1%).

Al compararlo con la composición proteica del CPS obtenido de suero dulce caprino de Casper et al. (1999), nuestros CPS caprinos, tanto clarificados como no clarificados, presentan un menor contenido tanto de β -LG (60-64% vs 70,9%) como de α -LA (11-13% vs 22,9%), pero mayor porcentaje de Ig G (9-11% vs 4,9%) y seroalbúmina (3-4% vs 0,9%). Estas diferencias también estaban presentes cuando contrastamos en el apartado 1.2. de Resultados y Discusión la composición de nuestro suero líquido con el de estos autores, a excepción de la Ig G. Por otro lado, el CPS ácido de estos mismos autores presenta las mismas diferencias excepto para la seroalbúmina, la cual aparece en porcentajes similares.

Tabla 27: Composición proteica (% del total proteico) (media \pm desviación estándar) de los productos en polvo obtenidos del suero caprino (n=3) y del concentrado de proteínas séricas bovino

	CPS-C ⁽¹⁾	CPS-SC ⁽²⁾	Agregados	CPS Bovino	(1)-(2)
Caseinmacropéptido	12,24 \pm 4,11 b	12,90 \pm 6,27 b	30,60 \pm 1,61 a	11,50	n.s.
α -Lactalbúmina	12,53 \pm 0,36	11,18 \pm 2,21	11,51 \pm 0,21	11,75	n.s.
Seroalbúmina	4,21 \pm 1,03 b	3,34 \pm 1,04 b	6,13 \pm 0,55 a	3,72	n.s.
β -Lactoglobulina	60,28 \pm 2,45 a	63,57 \pm 7,52 a	32,86 \pm 3,53 b	63,39	n.s.
Inmunoglobulina G	10,75 \pm 1,79 b	9,02 \pm 1,95 b	18,90 \pm 1,45 a	9,65	n.s.

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados;

Agregados: Agregados en polvo; CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino.

a,b,c: medias en la misma fila con distinta letra difieren significativamente (p<0,05)

n.s.: no significativo (p>0,05); *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001

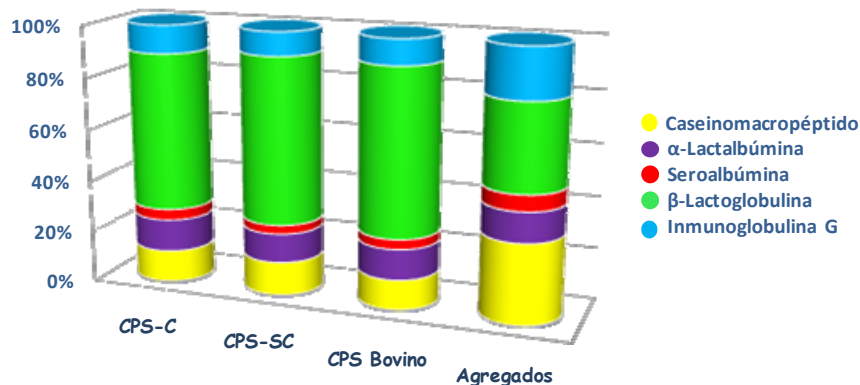


Figura 20: Composición proteica (%) de los concentrados proteicos

(CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificado, CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificado; Agregados: Agregados en polvo; CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino)

Por el contrario el CPS caprino dulce de Pintado et al. (1999) presenta un porcentaje de β -LG (48,2%) muy inferior al de los productos clarificados y no clarificados, mientras que contiene mayor cantidad de α -LA (27,1%) y seroalbúmina (7,8%). El contenido de Ig G (9,8%) es superior al de los no clarificados pero inferior al de los clarificados.

Los agregados, como ya se explicó anteriormente, poseen un perfil proteico distinto, con lo que el contenido de β -LG y de α -LA es menor al presente en los CPS caprinos obtenidos por Casper et al. (1999) y por Pintado et al. (1999), mientras que el contenido de Ig G de los agregados es mayor. El comportamiento de la seroalbúmina es diferente, porque los de Casper et al. (1999) poseen cantidades inferiores de esta proteína, pero el de Pintado et al. (1999) contiene más seroalbúmina. Al igual que sucedía para el lactosuero líquido caprino (Casper et al., 1998), en estos trabajos (Casper et al., 1999; Pintado et al., 1999) tampoco se determinó el porcentaje de GMP.

Estos autores (Casper et al., 1999; Pintado et al., 1999) son los únicos que estudian la composición proteica de CPS de origen caprino; sin embargo en la literatura existen muchas otras referencias de CPS de otro origen, y como es habitual, principalmente de origen bovino.

Si prestamos atención a la composición proteica de los CPS bovinos comerciales analizados por Morr y Foegeding (1990) (ver tabla 8), por contenido de proteína son comparables con los CPS caprinos clarificados (CPS-C); se observa que los

Resultados y Discusión

porcentajes de β -LG y α -LA de CPS-C están dentro de los límites de la composición típica de CPS comerciales, mientras que la α -LA y la seroalbúmina en CPS-C se encuentran en porcentajes inferiores.

El CPS obtenido por Karleskind et al. (1995a), que experimentó los mismos tratamientos que nuestro CPS-C, presenta un contenido cercano al de nuestros productos clarificados y no clarificados en las proteínas α -LA (15,6%) y seroalbúmina (5,6%), mientras que el contenido de β -LG es mayor (72,1%) y el de Ig es menor (6,7%). Por el contrario, la composición proteica del CPS obtenido por PT, centrifugación, UF y DF de Rinn et al. (1990) únicamente posee un contenido de β -LG equivalente (59,6%), mientras que el porcentaje de las demás proteínas es muy superior al de nuestros CPS clarificados y no clarificados (23,6% de α -LA, 8,6 % de Ig y 8,2% de BSA).

Si comparamos más exhaustivamente y de manera individual cada una de las proteínas, en primer lugar se percibe que el contenido de β -LG (a excepción de los agregados) de nuestros CPS y del concentrado comercial es claramente superior al presente en los CPS obtenidos por algunos autores (De Wit et al., 1986; Kim et al., 1987; Patel et al., 1990; Heino et al., 2007), en cambio es inferior al CPS bovino de Casper et al. (1999) o al de Karleskind et al. (1995a,b). Sin embargo, siempre la β -LG es la proteína mayoritaria en CPS bovinos y caprinos (De Wit et al., 1986; Patel et al., 1990; Casper et al., 1999; Pintado et al., 1999).

La proporción de Ig G de todos nuestros sueros y del comercial es claramente superior al del CPS obtenido por De Wit et al. (1986), Karleskind et al. (1995a,b), y al CPS bovino de Casper et al. (1999), entre tanto la proporción de α -LA es inferior. No obstante, Patel et al. (1990) y Heino et al. (2007) obtuvieron valores de α -LA bastante similares al de nuestros productos en polvo (~10,2%) y (13,7-14,3%) respectivamente, mientras que los concentrados de lactosuero dulce de Kim et al. (1987) presentaron un contenido de α -LA (~7,8%) inferior.

El contenido de seroalbúmina difiere, al igual que sucede con la α -LA. Por un lado, los CPS caprinos y el concentrado comercial obtuvieron valores menores al de De Wit et al. (1986), Karleskind et al. (1995a,b), Patel y Kilara (1990) y Heino et al. (2007), pero mayor al CPS bovino de Casper et al. (1999). Por otro lado, únicamente los agregados presentaron un porcentaje de seroalbúmina superior al de De Wit et al. (1986), al de Karleskind et al. (1995a,b) y al de Heino et al. (2007).

El CPS caprino exhibe niveles más altos de Ig G (Casper et al., 1999; Pintado et al., 1999) y seroalbúmina (Pintado et al., 1999) que los bovinos. En nuestro estudio, los

niveles de ambas proteínas, tanto de los polvos clarificados como de los no clarificados, son similares al concentrado comercial bovino utilizado como estándar, pero en los agregados la cantidad de ambas proteínas se dobla, si se compara con ese concentrado.

Casper et al. (1999) y Díaz et al. (2004) estudiaron la composición proteica de CPS de origen ovino. El CPS ovino analizado por Casper et al (1999) presentó un contenido de β -LG (73,5%) y de α -LA (18,1%) superior y un porcentaje de Ig G (4,5%) claramente inferior al de nuestros CPS. Los valores de seroalbúmina (4,0%) fueron similares. Los CPS ovinos de Díaz et al. (2004) mostraron una mayor concentración de β -LG (72-82%), de α -LA (16-26%) y menor de seroalbúmina (1,1-3,5%) que nuestros concentrados caprinos, pero teniendo en cuenta que sólo habían contabilizado estas tres proteínas.

Al igual que sucedía con anterioridad, la mayoría de publicaciones no contemplan el estudio del caseinomacropéptido, al contrario de lo que sucede en nuestro trabajo. No obstante, tanto el CPS bovino de Regester y Smithers (1991) como el CPS comercial de Holt et al. (1999a) y los CPS de Heino et al (2007), sí incluyen esta proteína, con porcentajes bastante elevados (23,3-30,9%), (12,5-18,5%) y (14-17%) respectivamente, valores superiores a los recogidos en nuestros CPS. Hay que tener en cuenta que la cantidad de caseinomacropéptido es función de la mayor o menor coagulación enzimática que se produzca durante la elaboración de la cuajada.

Al comparar el contenido proteico individual del lactosuero líquido caprino (tabla 22) y de los diferentes productos obtenidos (CPS-C, CPS-SC y agregados), aparecen variaciones en algunas proteínas, lo que demuestra que los diferentes tratamientos que ha experimentado el suero líquido pueden ser los responsables del cambio experimentado en el perfil proteico individual.

Por un lado, tanto los retenidos clarificados como los no clarificados contienen menos cantidad de caseinomacropéptido pero más β -LG, en cambio el resto de proteínas permanecen en proporciones similares. Los agregados, por el contrario, mostraron un perfil opuesto, al contener un mayor contenido de caseinomacropéptido, seroalbúmina y, principalmente, de Ig G y un menor porcentaje de β -LG que el lactosuero líquido. La α -LA es muy similar en ambos productos.

Este perfil inverso que existe fundamentalmente entre el caseinomacropéptido o glucomacropéptido (GMP) y la β -LG, nos revela que el GMP parece que se queda retenido durante la clarificación junto con las lipoproteínas o se pierde en el filtrado durante la UF. La disminución del caseinomacropéptido se observó tanto en CPS-C

Resultados y Discusión

como en CPS-SC. Que disminuya en los CPS obtenidos de suero no clarificado indica que hay una posible pérdida de GMP durante la UF/DF. Incluso algunos autores señalan que puede existir ciertas pérdidas de otras proteínas en UF como la α -LA. Así, Casper et al. (1999) y De la Fuente et al. (2002), aunque no estudian el caseinomacropéptido, también obtienen CPS caprinos y bovinos, respectivamente, con mayor contenido de β -LG, pero al contrario de lo que sucede en nuestros deshidratados, disminuye el contenido de α -LA. Esta merma puede ser atribuida a una posible pérdida que se produce durante la UF (Casper et al., 1999; De la Fuente et al., 2002). Harper (1991) señaló que las pérdidas de α -LA en el permeado puede alcanzar el 20% durante la UF y DF, aunque depende de la extensión del proceso y del tamaño de poro de la membrana utilizada. El resto de las proteínas séricas (seroalbúmina e Ig) permanecen invariables con las diferentes etapas de la elaboración de CPS (De la Fuente et al., 2002).

El calcio y la temperatura pueden inducir reacciones durante la PT, que pueden afectar al estado de agregación de las proteínas y su consiguiente eliminación durante la aplicación de las técnicas físicas para separar los complejos fosfolipoproteicos generados durante dicha PT (Rinn et al., 1990). Karleskind et al. (1995a) señalan que este tratamiento no parece afectar ni a la concentración de la β -LG ni a la de α -LA pero sí posee un efecto considerable sobre el resto de proteínas. En los agregados, además de un aumento de GMP en relación al suero líquido también se observa un incremento destacable del porcentaje de Ig G, lo que podría explicarse porque proteínas como ésta se pierden, o ven reducidas su contenido, durante la clarificación (Hiddink et al., 1981; Musale y Kulkarni, 1998). La Ig G posee un pI próximo a pH 7 y mayor al de las otras proteínas séricas, con lo que puede precipitar como consecuencia del pH aplicado durante la clarificación (Musale y Kulkarni, 1998), y en nuestro caso quedaría retenida en los agregados. El resto de las proteínas séricas con pI próximo a pH 5 permanecen disueltas en la disolución que se ultrafiltra. De este modo, según Musale y Kulkarni (1998), en el suero clarificado, que tiene un pH entre 5 y 7, predominan las interacciones electrostáticas de tipo repulsivo (porque las proteínas poseen pI similares) y disminuyen las de tipo atractivo entre proteínas de alto pI, como es la Ig G, y otras proteínas séricas.

Además se ha sugerido que proteínas como las inmunoglobulinas y la seroalbúmina, por su afinidad con constituyentes lipídicos, juegan un papel importante en la formación y agregación de las lipoproteínas (Pearce, 1992a). Quizás esta afinidad también ayude a que se queden retenidas tanto las inmunoglobulinas como la seroalbúmina con los agregados.

Como se ha señalado, no existen diferencias significativas entre los CPS caprinos clarificados y no clarificados, por tanto, la precipitación termocálcica seguida de separación de los agregados no influye de una manera importante en la composición proteica de nuestros CPS, al menos de las proteínas identificadas. Puede que se eliminen algunas proteínas, como las procedentes de la membrana del glóbulo graso, y se reduzcan otras como se ha señalado anteriormente (Ig G, GMP y seroalbúmina); pero hay que tener en cuenta que el contenido total de proteínas en los agregados es bajo y por ello, su influencia en la composición proteica de los CPS puede ser limitada. En el artículo de Díaz et al. (2004) tampoco se observan diferencias destacables entre las proporciones de β -LG, α -LA y seroalbúmina entre los CPS obtenidos a partir de suero ovino en los que se ha realizado o no la precipitación termocálcica seguida de MF.

4. PROPIEDADES FUNCIONALES

Las propiedades funcionales o tecnológicas que se evaluaron en este estudio, fueron las siguientes:

- ✓ Solubilidad
- ✓ Propiedades espumantes
- ✓ Propiedades emulsionantes
- ✓ Gelificación.

4.1. SOLUBILIDAD

La tabla 28 muestra la solubilidad proteica de los diferentes productos en polvo a dos pHs diferentes (4 y 7).

Tabla 28: Solubilidad proteica (% de proteína soluble) (media \pm desviación estándar) de los productos en polvo obtenidos del suero caprino (n=3) y del concentrado de proteínas séricas bovino

	CPS-C ⁽¹⁾	CPS-SC ⁽²⁾	Agregados	CPS Bovino	(1)-(2)
pH 7	102,57 \pm 3,11 a	103,14 \pm 2,08 a	93,98 \pm 4,47 b	73,88	n.s.
pH 4	67,62 \pm 3,54 b	84,60 \pm 10,22 a	95,69 \pm 6,11 a	59,08	n.s.

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados;
 Agregados: Agregados en polvo; CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino.
 a,b,c: medias en la misma fila con distinta letra difieren significativamente (p<0,05)
 n.s.: no significativo (p>0,05); *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001

Los productos en polvo caprinos presentan una alta solubilidad y siempre mayor que el concentrado proteico bovino (ver figura 21) tanto a pH 4 como a pH 7.

Si comparamos los CPS caprinos entre sí, se observa una tendencia diferente, que varía en función del pH: a valores de pH 7, los concentrados clarificados (CPS-C) presentan una solubilidad similar (102,57%) a la de los no clarificados (CPS-SC) (103,14%); sin embargo, a pH 4, los no clarificados presentan una solubilidad superior a la de los clarificados (84,60% vs 67,62%). A pH 7, los agregados presentan una solubilidad bastante menor (93,98%) que la de los otros productos en polvo caprinos, mientras que a pH 4 son los agregados los que poseen un índice de solubilidad superior (95,69%).

Además, se observa que a excepción de los agregados, que presentan un índice de solubilidad similar a ambos pHs, los demás productos, tanto los CPS caprinos como el bovino comercial poseen una solubilidad superior a pH 7 que a pH 4.

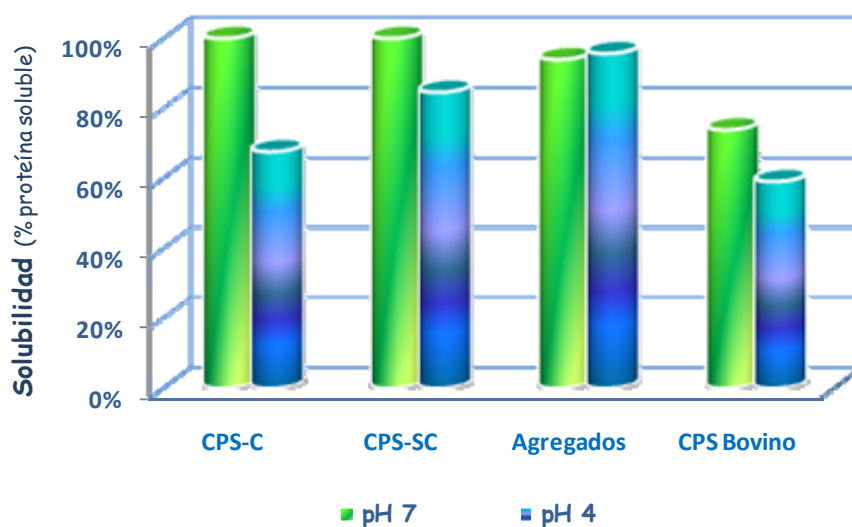


Figura 21: Solubilidad (% de proteína soluble) de los concentrados proteicos

(CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificado, CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificado; Agregados: Agregados en polvo; CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino)

La alta solubilidad obtenida en este estudio, fundamentalmente a pH 7, confirma el resultado de otros autores respecto a que la solubilidad proteica de los CPS obtenidos por técnicas de membrana es muy alta, sobre todo a pH por encima de 6,0 (Gupta y Reuter, 1992).

Resultados y Discusión

Los concentrados caprinos, tanto de suero dulce como ácido, de Casper et al. (1999) poseen una excelente solubilidad tanto a pH 7 (99,4% y 102,5%, respectivamente) como a pH 3 (100,1 % y 99,8%, respectivamente). Los valores a pH 7 de nuestros CPS también son muy buenos, presentando tanto el clarificado como el no clarificado valores comparables a los de Casper et al. (1999); no obstante, la solubilidad a pH 4 de nuestros productos en polvo caprinos son inferiores a los señalados por estos autores a un pH ligeramente más ácido que el utilizado en nuestro estudio. Por el contrario, los agregados poseen una solubilidad similar, incluso a ambos pHs, a los concentrados caprinos de Casper et al. (1999).

Al igual que sucede con los CPS caprinos de Casper et al. (1999), nuestros CPS poseen a pH 7 una solubilidad muy alta, comparable a la de otros CPS de origen ovino (Casper et al., 1999; Díaz et al., 2004) y de origen bovino (Morr, 1985; Kim et al., 1989; Morr y Foegeding, 1990; Patel y Kilara, 1990; Rinn et al., 1990; Karleskind et al., 1995b; Vaghela y Kilara, 1996a; Casper et al., 1999).

A pH 4, especialmente el producto clarificado y, en menor medida, el CPS no clarificado, exhiben una peor solubilidad que otros CPS, tanto ovinos como bovinos (Morr, 1985, a pH 3; Mangino et al., 1987, a pH 4,6; Kim et al., 1989, a pH 3; Rinn et al., 1990, a pH 3; Karleskind et al., 1995b, a pH 4,6; Vaghela y Kilara, 1996a, a pH 4,2; Casper et al., 1999, a pH 3; Díaz et al., 2004, a pH 4). Por el contrario la solubilidad de los CPS dulces a pH 4,6 de De Wit et al. (1988) y del CPS de Mangino et al. (1987) presentan valores intermedios entre nuestro CPS no clarificados y clarificados. La solubilidad de ambos productos está en el rango de solubilidad descrito por Morr y Foegeding (1990) para diferentes CPS comerciales a pH 3 y pH 4,5 (63,8-90,5 y 49,4-87,2% respectivamente). De Wit et al. (1986) y Liao y Mangino (1987) arrojan resultados de solubilidad para CPS comerciales entre 35-91% y 25,4-82,4% respectivamente (en este caso son CPS ácidos). El CPS bovino comercial utilizado en este estudio posee una solubilidad, tanto a pH 7 como a pH 4, dentro de los márgenes señalados en los trabajos anteriores para CPS comerciales.

Si no tenemos en cuenta el origen del CPS, y sí el tratamiento al que fue sometido el lactosuero para la obtención de los diferentes concentrados, se observa que la solubilidad de aquellos CPS que han sido clarificados mediante PT, ultrafiltrados y diafiltrados (Kim et al., 1989; Rinn et al., 1990; Karleskind et al., 1995b, Vaghela y Kilara, 1996b, Díaz et al., 2002), la de CPS que han sido ultrafiltrados y diafiltrados (Morr, 1985; Kim et al., 1989; Patel y Kilara, 1990; Casper et al., 1999) o simplemente ultrafiltrados (Mangino et al., 1988; Díaz et al., 2004) poseen a pH 7 una solubilidad similar a la de nuestros productos clarificado y

no clarificado, en tanto que a pH 4 nuestros concentrados muestran un peor índice de solubilidad.

Los agregados presentan una buena solubilidad a ambos pHs. De este modo, si los comparamos con la mayoría de los CPS nombrados previamente, bien en función del origen como del método de elaboración, se observa que exhiben una solubilidad similar a pH 7 y 4. Díaz et al. (2004) observaron que los retenidos ovinos separados por MF (0,65 y 0,20 μm) muestran, a ambos pHs, unos valores de solubilidad (84,81-93,84%) algo inferiores a la de nuestros agregados.

La solubilidad del suero, fundamentalmente de sus proteínas, es pH-dependiente (Morr y Ha, 1993). Cuando el pH se encuentra por encima y por debajo del pI, las proteínas poseen cargas netas (negativa y positiva, respectivamente), con lo que se repelen entre sí, e interaccionan más con el agua; no obstante, a medida que el pH desciende hacia el pI de las proteínas séricas, que se sitúa alrededor de 4-5, predominan las fuerzas de atracción al disminuir la baja repulsión de cargas entre ellas, con lo que interaccionan menos con el agua. Al decrecer las uniones entre el agua y las proteínas, éstas pueden llegar a asociarse entre sí, formando agregados, e incluso, precipitar (Morr y Ha, 1993; Vojdani, 1996; Ordóñez et al., 1998; Singh, 2003).

Esta pérdida de solubilidad a pHs próximos al pI de las proteínas séricas la exhiben tanto nuestros CPS caprinos (a excepción de los agregados) como el CPS comercial bovino. De hecho, la mejor solubilidad que lucen nuestros concentrados a pH neutro frente a pHs ácidos (4,0-4,6) es similar a los resultados obtenidos por De Wit y De Boer (1975), De Wit et al. (1988), Morr y Foegeding (1990) y Díaz et al. (2004).

A pesar de que se distingue una solubilidad mínima a valores de pH próximos al pI, las proteínas séricas, a diferencia de otras proteínas, permanecen solubles (Mangino, 1992b; Vojdani, 1996), de forma que la solubilidad de los CPS siempre excede el 60% para algunos autores (Robin et al., 1993), el 68% para otros (Zayas, 1997) o el 67% para nuestros CPS caprinos.

Lieske y Konrad (1996) estudiaron la solubilidad proteica de un concentrado comercial desde pH 2 hasta 8. A pH 2 la solubilidad es la mejor, pero va disminuyendo a medida que aumenta el pH, observándose los valores más bajos a pH 4 y 5 (en torno al 80%). A partir de este valor mejora la cantidad de proteína soluble, y a pH 7 se alcanzan valores superiores al 90%. El hecho de que por un lado los CPS de diversos autores (Kim et al., 1989; Rinn et al., 1990; Vaghela y Kilara, 1996b; Casper et al., 1999) exhiban una solubilidad alta tanto a pH 7 como a pH 3, no contradice nuestros

Resultados y Discusión

resultados obtenidos a pH 7 (solubilidad alta) y pH 4 (solubilidad menor) ya que las proteínas séricas pueden ser menos solubles a pHs entre 4-5, que es el que se corresponde con su pI, y esta solubilidad aumenta cuando se aleja el pH del de su pI tanto elevándolo como disminuyéndolo.

La solubilidad está correlacionada con la β -LG (Kim et al., 1987), la cual es la proteína que se encuentra en mayor proporción en todos nuestros productos en polvo, por lo que puede ser la principal responsable de la buena solubilidad de nuestros CPS, especialmente a pH 7. Asimismo, tal como se acaba de describir, aunque la mayoría de las proteínas son insolubles cuando el pH coincide con el pI, las proteínas séricas, y especialmente la β -LG, son solubles no sólo en su pI, sino también en un amplio intervalo de pH (3-9) (Damodaran, 1996).

En nuestro caso, la menor solubilidad a pH 4 que a pH 7 se da en los dos CPS (CPS-C y CPS-SC) y no en los agregados; este resultado podría ser consecuencia de las diferencias en composición proteica, especialmente al menor contenido de β -LG de los agregados. Éstos, como se señaló anteriormente, presentan una buena solubilidad a pesar de la escasez de β -LG. El alto contenido, tanto de cenizas como de calcio, pueden ser los responsables de la buena solubilidad que presentan los agregados, a través del efecto conocido como salting-in. La presencia de iones puede facilitar la disolución de las proteínas, porque son capaces de provocar la disminución de la atracción entre cargas de distinto signo de las proteínas, gracias a que pueden reaccionar con ellas (Patel y Kilara, 1990; Vojdani, 1996; Ordóñez et al., 1998).

El alto contenido de lípidos de los CPS-SC y de los agregados caprinos parece no afectar negativamente a la solubilidad proteica. Un predominio de las interacciones agua-proteína frente a las interacciones proteína-proteína refleja una alta solubilidad de las proteínas (Patel y Kilara, 1990); sin embargo los lípidos pueden alterar este balance provocando una menor cantidad de proteína soluble (Patel y Kilara, 1990). De este modo, se puede relacionar un bajo contenido lipídico con una buena solubilidad (Casper et al., 1999), ya que los lípidos pueden interaccionar con las proteínas, reduciendo la cantidad de proteína soluble (Vojdani, 1996). A pesar de ello, nuestros concentrados con mayor contenido lipídico poseen muy buena solubilidad.

El CPS bovino analizado presenta una peor solubilidad a ambos pHs que nuestros CPS. El secado por atomización puede causar desnaturalización de las proteínas séricas (McClements, 2008). Se desconoce el proceso que se ha utilizado para su elaboración, con lo que es posible que durante el mismo se haya producido algún tipo de desnaturalización por un tratamiento térmico o por el método de

deshidratación, y que éste sea el principal responsable de su menor solubilidad, junto a las posibles diferencias entre las proteínas de vaca y cabra.

La solubilidad es un reflejo de las condiciones utilizadas durante la preparación o almacenamiento de los CPS (Zayas, 1997). Los tratamientos usados en la elaboración de los CPS pueden provocar pequeñas cantidades de proteína desnaturalizada por calor, agregaciones entre las proteínas y el calcio, e interacciones con la lactosa o con lípidos polares, que reducen el índice de solubilidad (Morr y Ha, 1993).

Para que las proteínas posean unas buenas propiedades funcionales es necesario tener cuidado y evitar o minimizar cualquier factor que pueda provocar la desnaturalización proteica (Vojdani, 1996; Zayas, 1997), y en definitiva, que afecte a la solubilidad, ya que una baja solubilidad proteica es una manifestación física de la desnaturalización proteica (Patel y Kilara, 1990; De Wit, 1998). En la elaboración de nuestros CPS caprinos, el tratamiento térmico fue de sólo pasterización (65°C 30 minutos) y la deshidratación fue realizada mediante liofilización. También podría afectar el proceso de obtención del queso; así, si se obtienen CPS a partir de suero procedente de quesos de suero, donde en su elaboración se emplean altos tratamientos térmicos, disminuye la solubilidad de las proteínas (Díaz et al., 2004). En nuestro caso, sólo se realizó pasterización de la leche a 72°C 30 segundos.

4.2. PROPIEDADES ESPUMANTES

Aunque las proteínas séricas se caracterizan por poseer buenas propiedades espumantes (Zayas, 1997, Singh, 2003), tanto los concentrados proteicos de origen caprino como el de origen bovino no presentaron propiedades espumantes a ninguno de los pHs evaluados (7 y 4). Al mismo tiempo se hizo uso de ovoalbúmina como proteína control. Este tipo de proteína normalmente posee una capacidad espumante superior a las proteínas séricas, gracias a su gran capacidad para desnaturalizarse y adsorberse a la interfase aire-agua, encapsular a las burbujas de aire y formar polímeros proteicos que incrementen la viscosidad y estabilidad de la espuma (Morr, 1985).

Tal como recoge la tabla 29, la ovoalbúmina, a diferencia del resto de productos en polvo, presentó tanto capacidad como estabilidad espumante a ambos pHs.

Tabla 29: Capacidad espumante (CE, %) y Estabilidad espumante (EE, % v/v, % p/v) de la ovoalbúmina, de los productos en polvo obtenidos del suero caprino (n=3) y del concentrado de proteínas séricas bovino

		Ovoalbúmina	CPS-C	CPS-SC	Agregados	CPS Bovino
CE	pH 7	258,93	ND	ND	ND	ND
	pH 4	281,20	ND	ND	ND	ND
EE (v/v)	pH 7	56,00	ND	ND	ND	ND
	pH 4	48,50	ND	ND	ND	ND
EE (p/v)	pH 7	54,33	ND	ND	ND	ND
	pH 4	46,44	ND	ND	ND	ND

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados;
 Agregados: Agregados en polvo; CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino
 ND: No detectada

Los CPS caprinos, tanto de lactosuero dulce como ácido obtenidos por Casper et al. (1999), sí exhiben esta propiedad espumante, siendo la capacidad y la estabilidad espumante mejores en el concentrado dulce que en el ácido. Estos autores también estudiaron esta propiedad en dos concentrados dulces de origen ovino y bovino, de manera que el deshidratado ovino es el que presenta la mejor capacidad y estabilidad espumante de las tres especies, mientras que el lactosuero caprino dulce posee una mejor capacidad y una estabilidad espumante similar al concentrado bovino.

El concentrado comercial bovino estudiado por nosotros no tiene capacidad espumante, pero existen otros CPS de origen bovino que sí la poseen (Morr y Foegeding, 1990; Rinn et al., 1990; Karleskind et al., 1995c; Vaghela y Kilara, 1996b; Casper et al., 1999).

Aunque no existen más trabajos, a excepción del de Casper et al. (1999) sobre la capacidad espumante de CPS de origen caprino, se han localizado en la bibliografía consultada publicaciones con concentrados de otro origen que no son capaces de formar ni estabilizar espumas. Los CPS obtenidos por Kim et al. (1989), Rinn et al. (1990) mediante PT, centrifugación, UF y DF, es decir, análogo al tratamiento experimentado por nuestro CPS clarificado, no presentaron capacidad ni estabilidad espumante. En el caso de Kim et al. (1989), los CPS obtenidos sin PT tampoco exhibieron esta propiedad.

Los agregados separados por MF y los retenidos de UF sin DF, ambos de origen ovino, (Díaz et al., 2004) también fueron incapaces de producir espumas, mientras que sus CPS clarificados sí presentaron propiedades espumantes.

Que exista una pobre capacidad espumante en los CPS puede ser vinculado a su alto contenido lipídico, y en concreto, en el concentrado no clarificado y en los agregados, este valor es muy elevado (> 40%). La presencia de lípidos en los CPS, incluso en pequeñas cantidades, tiene un efecto perjudicial en las propiedades espumantes (McDonouhg et al., 1974; Haggett, 1976; Peltonen-Shalaby y Mangino, 1986; Mangino et al., 1987; De Wit et al., 1988; Patel y Kilara, 1990; Pearce et al., 1991; Karleskind et al., 1995c; Damodaran, 1996; Vaghela y Kilara, 1996a; Zayas, 1997; De Wit, 1998; Banavara et al., 2003; Singh, 2003; Heino et al., 2007).

Los lípidos, por un lado, poseen una mayor actividad superficial que las proteínas (De Wit y Klarenbeek, 1984, Boutin, 2004), con lo que se adsorben más rápidamente a la interfase (Boutin, 2004) y pueden alterar la desnaturalización proteica necesaria para formar las espumas (Patel y Kilara, 1990), y por otro lado, pueden desestabilizar las espumas, al provocar el desplazamiento de las proteínas de

Resultados y Discusión

la interfase aire-agua (Patel y Kilara, 1990; Banavara et al., 2003) debido a una adsorción competitiva (Patel y Kilara, 1990).

No sólo la cantidad sino también el tipo de ácidos grasos afecta a la funcionalidad (De Wit et al., 1986) y a la propiedad espumante (Vaghela y Kilara, 1996a). En particular la presencia de ácidos grasos insaturados (Singh 2003) o de fosfolípidos (Vaghela y Kilara, 1996a; Singh, 2003) merman la capacidad espumante de los CPS, ya que son capaces de romper las espumas como resultado de su alta actividad superficial y de su efecto adelgazante sobre la película proteica (Singh, 2003). Nuestros CPS no poseen únicamente altas cantidades de lípidos (ver tabla 23), sino también es destacable la presencia de cierta cantidad de fosfolípidos (tabla 25) y de ácidos grasos insaturados (tabla 26).

La hidrofobicidad de las proteínas séricas también es importante para esta propiedad (Ordóñez et al., 1998), pero los lípidos pueden competir por los lugares de unión de la proteína, con lo que los grupos hidrófobos participan en las interacciones hidrofóbicas si no están ocupados por los lípidos (Zayas, 1997).

CPS de concentraciones lipídicas bajas, inferiores a 0,5% (DeVilbiss et al., 1974; Díaz et al., 2004) o de 1 a 2% (McDonough et al., 1974) pueden no tener propiedades espumantes o ser escasas, lo cual puede deberse a que los lípidos per se no sean los componentes antiespumantes más importantes, al menos cuando están en bajas concentraciones (Díaz et al., 2004).

Los fosfolípidos compiten con las proteínas para adsorberse a la superficie aire-agua (Damodaran, 2005) pero, por otro lado, los fosfolípidos se unen a las proteínas, formando las lipoproteínas (Krog, 2003). Un alto contenido de estos compuestos (Regester et al., 1992), que se espera que estén presentes en los agregados separados por PT y proceden de la membrana del glóbulo graso (Joseph y Mangino, 1988b; Krog, 2003), podría estar relacionados con unas pobres estabilidad y capacidad espumante (Joseph y Mangino, 1988b; Regester et al., 1992, Díaz et al., 2004). De hecho puede existir una fracción proteica asociada a los lípidos procedentes de la membrana del glóbulo graso que sea un agente antiespumante (Joseph y Mangino, 1988b), perjudicando la capacidad espumante al debilitar las fuerzas cohesivas que existe entre las capas de proteínas que rodean las burbujas de aire (Zayas, 1997). Por tanto, podría ser que el componente proteico de las lipoproteínas fuera el responsable del efecto antiespumante.

Los tratamientos previos del suero que combinan la PT con la MF mejoran las propiedades espumantes, tanto para CPS bovinos (Rinn et al., 1990; Karleskind et al.,

1995c) como ovinos (Díaz et al., 2004). Sin embargo la PT seguida de centrifugación, al igual que sucede en nuestro estudio, parece que apenas tiene efecto en mejorar esta propiedad (Kim et al., 1989; Vaghela y Kilara, 1996). Puede que con la microfiltración se elimine alguna lipoproteína con capacidad antiespumante, probablemente asociada a la membrana del glóbulo graso, que sólo con la centrifugación no se consigue eliminar.

Por tanto, parece que el alto contenido lipídico puede ser el principal responsable de que, tanto los CPS caprinos como el CPS bovino comercial, no posean la habilidad de formar espumas. Además, el no haber podido eliminar en los CPS caprinos clarificados algún tipo de lipoproteína puede influir en que no tengan capacidad antiespumante.

El contenido de lactosa podría repercutir pero no está claro ya que el efecto de este compuesto es contradictorio. Por un lado, una pobre estabilidad espumante puede explicarse por un bajo contenido en lactosa de los CPS (Vaghela y Kilara, 1996a; Casper et al., 1999). La adición de azúcares, como lactosa, reduce la pérdida de líquido al incrementar la viscosidad, permitiendo la formación de una película interfacial más cohesiva (Zhu y Damodaran, 1994b; Zayas, 1997; Ordoñez et al., 1998; Herceg et al., 2007). Sin embargo, aunque los azúcares estabilicen las espumas, su presencia durante el batido aumenta la viscosidad de la solución, con lo que se retarda el movimiento de las proteínas a la interfase aire-agua (De Wit et al., 1988). Las reacciones de Maillard, en las que está implicada la lactosa, también disminuyen la propiedad espumante (Thomas et al., 2004). El alto contenido de lactosa, principalmente en los agregados y en el CPS clarificado, puede perjudicar la formación de espumas de nuestros productos. Por tanto, la presencia de lactosa, sobre todo en altos valores, puede provocar un aumento de la viscosidad, y disminuir de este modo, la difusión y adsorción de las proteínas a la superficie, y por lo tanto perjudicar también a la capacidad espumante de nuestros CPS.

Finalmente señalar que la solubilidad está positivamente correlacionada con la propiedad espumante (Patel y Kilara, 1990), ya que la presencia de material insoluble puede interferir en la formación de espumas (Britten y Lavoie, 1992). La buena solubilidad que exhiben nuestros CPS a pH 7, demuestra que, aunque las proteínas séricas sean muy solubles, la solubilidad no garantiza una completa funcionalidad (Robin et al. 1993).

4.3. PROPIEDADES EMULSIONANTES

Los resultados tanto del índice de actividad emulsionante (IAE) determinados tanto por el método de Pearce y Kinsella (1978) como por la modificación realizada por Cameron et al. (1991), junto con el índice de estabilidad emulsionante (IEE) de nuestros CPS se reflejan en la tabla 30.

La clarificación mejoró la actividad emulsionante a pH 7; no obstante, a pH 4 no se observaron diferencias significativas entre CPS clarificados y no. Los agregados presentaron a pH 4 similares valores del IAE a la de los CPS, mientras que a pH 7 mostraron valores inferiores a la de los CPS clarificados y superiores a los de CPS sin clarificar. El CPS bovino presentó una capacidad emulsionante inferior a la del CPS clarificado, tanto a pH 7 como a pH 4.

Los CPS clarificados y el bovino mostraron una capacidad emulsionante superior a pH 7 que a pH 4, mientras que en los agregados no hubo diferencias. Sin embargo, en los CPS no clarificados la capacidad emulsionante fue mayor a pH 4 que a pH 7.

Los CPS caprinos (ácido y dulce) obtenidos por Casper et al. (1999) presentaron distinto comportamiento a pH 8 y 3, siendo en el caso de ese trabajo la capacidad emulsionante mayor a pH ácido, como sucedió en nuestro caso en los CPS no clarificados. Al comparar la capacidad emulsionante de CPS de origen bovino, ovino y caprino, Casper et al. (1999) destacaron que los CPS de origen caprino procedentes de suero dulce presentan una mayor capacidad a pH 3, mientras que a pH 8 entre los CPS caprinos y el ovino no existían diferencias significativas, mostrando los CPS de origen bovino valores inferiores.

Tabla 30: Índice de actividad emulsionante (IAE, m²/g) e Índice de estabilidad emulsionante (IEE, %) (media ± desviación estándar) de los productos en polvo obtenidos del suero caprino (n=3) y del concentrado de proteínas séricas bovino

		CPS-C ⁽¹⁾	CPS-SC ⁽²⁾	Agregados	CPS Bovino	(1)-(2)
IAE *	pH 7	181,44 ± 4,80 a	55,69 ± 14,13 c	145,49 ± 23,18 b	155,05	***
	pH 4	130,79 ± 47,55	152,13 ± 24,41	134,04 ± 13,01	102,55	n.s.
IAE **	pH 7	60,24 ± 6,35 a	19,30 ± 3,61 b	48,89 ± 8,27 a	48,92	*
	pH 4	48,55 ± 16,59	49,89 ± 7,86	49,90 ± 5,00	30,27	n.s.
IEE	pH 7	99,12 ± 1,78	100,86 ± 1,66	102,52 ± 2,63	95,16	n.s.
	pH 4	95,86 ± 1,29 b	96,39 ± 3,64 b	103,15 ± 0,97 a	80,40	n.s.

*Fórmula de Cameron et al. (1991); ** Fórmula de Pearce y Kinsella (1978)

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados;

Agregados: Agregados en polvo; CPS bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino.

a,b,c: medias en la misma fila con distinta letra difieren significativamente (p<0,05)

n.s. : no significativo (p>0,05); *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001

Resultados y Discusión

Los resultados de IAE a pH 7 observados en nuestro CPS de suero clarificado y en los agregados calculados según el método de Pearce y Kinsella (1978) son mayores al que presentan otros autores en CPS bovinos (Patel y Kilara, 1990; Vaghela y Kilara, 1996) y ovinos (Díaz et al., 2004) que tuvieron valores entre 15 y 40 empleando dicho método y por lo tanto, parecidos a los resultados obtenidos en CPS no clarificados. Sin embargo, las comparaciones son difíciles ya que existen numerosos factores que afectan a la formación de una emulsión: tiempo e intensidad de la emulsificación, tipo de aparato utilizado para la emulsificación, concentración proteica, pH, volumen y tipo de aceite (Tornberg y Hermansson, 1977; Pearce y Kinsella, 1978). Se han utilizado diferentes tipos de equipos para la preparación de las emulsiones, tales como homogeneizadores de vástago (Tornberg y Hermansson, 1977; Patel y Kilara, 1990; Vaghela y Kilara, 1996a; Díaz et al., 2004; Fachin y Viotto, 2005; Heino et al., 2007), de pistones o de válvulas (Tornberg y Hermansson, 1977), de presión (De Wit et al., 1988; Karleskind et al., 1996) o sonicadores (Tornberg y Hermansson, 1977; Casper et al., 1999; Ji y Haque, 2003).

Estos instrumentos varían en su habilidad para formar una emulsión, fundamentalmente en el tamaño de las partículas de grasa creado (Waniska et al., 1981; Hill, 1996). De hecho, aparatos como los ultrasonidos y los homogeneizadores a presión funcionan mejor como emulsificadores (Tornberg y Hermansson, 1977), porque generan un tamaño de partícula más pequeño. Para la elaboración de una emulsión se puede utilizar cualquiera de los homogeneizadores citados previamente, o una combinación de ambos (McClements, 2008). En nuestro estudio se empleó en primer lugar un homogeneizador de vástago seguido de un homogeneizador de presión, lo que permite la formación de emulsiones estables.

Nuestros productos caprinos, sobre todo los clarificados, presentan una alta capacidad emulsionante. De forma general, las proteínas séricas se caracterizan por su buena capacidad y estabilidad emulsionante (Zayas, 1997), destacando, primordialmente, la β -LG (Pearce y Kinsella, 1978; Kim et al., 1987; Liao y Mangino, 1987; Klemaszewski et al., 1992, Zayas, 1997).

La β -LG es la principal proteína presente en nuestros concentrados y un buen agente emulsionante (Pearce y Kinsella, 1978), siendo su capacidad emulsionante superior a la de otras proteínas séricas como la BSA y la α -LA (Klemaszewski et al., 1992; Zayas, 1997). Si se compara con la BSA y la α -LA, la β -LG es una proteína más flexible, capaz de formar gotas más pequeñas, películas más fuertes, y consecuentemente, emulsiones más estables que estas proteínas, las cuales poseen una integridad estructural, por la presencia de puentes disulfuro, que dificulta su

rápida dispersión en la interfase para estabilizar las emulsiones, con lo que se origina una interfase más débil y una coalescencia más rápida (Klemaszewski et al., 1992). El alto porcentaje de β -LG en nuestros concentrados sin duda explica el buen comportamiento emulsionante de nuestros productos.

Díaz et al. (2004) no observaron diferencias en la capacidad emulsionante entre los CPS clarificados y no clarificados procedentes de suero ovino medida a pH 7. Sin embargo, en nuestro caso, los CPS clarificados presentaron una mayor capacidad emulsionante que los CPS no clarificados a pH 7. La mayor capacidad emulsionante de los clarificados a pH 7 puede relacionarse con el contenido de lípidos. Por lo general, los CPS con alto contenido lipídico muestran unas pobres propiedades emulsionantes. Esto puede deberse a que los lípidos alteran el balance hidrofílico e hidrofóbico de las proteínas séricas (Patel y Kilara, 1990; Vaghela y Kilara, 1996a).

De todas maneras, a diferencia de lo que afirman Patel y Kilara (1990), nuestros concentrados de proteínas séricas caprinas sí mostraron buenas propiedades emulsionantes, a pesar del alto nivel lipídico que poseen tanto los agregados como el CPS no clarificado.

No obstante, Karleskind et al. (1996) señalaron que tanto los lípidos residuales como los fosfolípidos podrían intensificar la propiedad emulsionante de las proteínas séricas, estando el porcentaje de ácidos grasos insaturados y el total lipídico correlacionado con esta propiedad. Según estos autores, los CPS con menor contenido lipídico son los que presentaron las emulsiones menos estables, destacando que un aumento de las repulsiones electrostáticas puede ser el responsable de que las emulsiones estabilizadas por CPS con alto contenido de lípidos residuales insaturados y polares sean muy estables.

A diferencia de los resultados a pH 7, a pH 4 no se observaron diferencias entre los distintos productos caprinos. Este diferente resultado se debe al distinto efecto del pH en la capacidad emulsionante de los productos estudiados. A pH 7 se observa una mayor capacidad emulsionante que a pH 4 en los CPS clarificados, mientras que en los CPS no clarificados sucede a la inversa.

En general, se ha señalado que a medida que el pH se aleja del pI mejora la capacidad emulsionante de las proteínas séricas (Cheftel et al., 1989; Ordóñez et al., 1998), porque a estos valores son más solubles y existe una mayor repulsión. Del mismo modo, también se incrementa la carga neta de las gotas, lo que aumenta su estabilidad contra la agregación porque la repulsión entre las gotas es suficiente para vencer las interacciones de atracción; sin embargo la repulsión no es suficiente

Resultados y Discusión

cuando el pH está próximo al pI, y las gotas tienen a agregarse (Kulmyrzaev et al., 2000b). Lieske y Konrad (1996) correlacionan el valor de IAE con la solubilidad proteica, de manera que una baja IAE se corresponde con una baja solubilidad proteica y viceversa. A valores próximos al pI de las proteínas del suero, entre pH 4 y 5, se observa una disminución de las propiedades emulsionantes debido al descenso de la solubilidad (Borderías y Montero, 1988; Lieske y Konrad, 1996).

De forma general, a pH neutro, la capacidad emulsionante tanto de la β -LG (Klemaszewski et al., 1992) como de los CPS (Lieske y Konrad, 1996) es mejor que a pH 4-5. Asimismo, a pHs ácidos la conformación de la β -LG es más rígida y más resistente a la desnaturalización que a pH neutro. Por estos motivos, a esos pHs presenta una baja actividad superficial, y por lo tanto, una pobre capacidad emulsionante (Shimizu et al., 1985). Esta pérdida de capacidad emulsionante se observa en el producto en polvo clarificado y en el CPS bovino.

El pH también está directamente relacionado con la adsorción proteica (Yamauchi et al., 1980; Shimizu et al., 1985). A pH neutro, en la película interfacial predomina la principal proteína de nuestros CPS, la β -LG (Shimizu et al., 1981), porque se caracteriza por poseer una mayor flexibilidad y una mejor actividad superficial (Shimizu et al., 1985). Por ello a pH 7, tal como reflejan los resultados, la capacidad emulsionante de nuestros concentrados es superior, a excepción del CPS no clarificado, el cual, sorprendentemente posee una mejor propiedad emulsionante a pH 4.

Como se ha señalado anteriormente, los CPS caprinos (ácido y dulce) obtenidos por Casper et al. (1999) presentaron una mayor capacidad emulsionante a pH 3 que a pH 8. Un mayor contenido de α -LA en los CPS caprinos frente a los CPS bovino y ovinos, parece explicar su mejor capacidad emulsionante a pH 3 (Casper et al. 1999). Tal como recoge la tabla 12, la adsorción en la interfase de la α -LA aumenta mientras que la de β -LG disminuye a medida que el pH disminuye de 7 a 3, de manera que a pHs ácidos existe una mayor adsorción de α -LA a la superficie de los glóbulos grasos, pudiendo suponer hasta un 48% del total de proteína adsorbida. Esta proteína, a pHs próximos o menores a su pI, puede experimentar cambios conformacionales que puede exponer sus regiones hidrofóbicas y modificar su habilidad de adsorberse a la interfase (Casper et al., 1999). En nuestro estudio, la mejor capacidad emulsionante a pH 4 del producto caprino no clarificado no implica una mayor cantidad de α -LA frente al resto de CPS.

Sin embargo, existen otros factores por los que en el pI la capacidad emulsionante puede aumentar, tal como sucede en el CPS no clarificado, como es el incremento de enlaces hidrofóbicos entre lípidos y proteínas (Borderías y Montero, 1988). El contenido lipídico del CPS no clarificado es muy alto, con lo que existe una mayor probabilidad de que interaccionen con las proteínas, y mejoren la capacidad emulsionante a un pH próximo al pI de las proteínas séricas.

Los agregados, aunque tienen una composición diferente, si se compara con los CPS, exhiben una buena capacidad y estabilidad emulsionante a ambos pHs, tal como señalan otros autores (Rosenberg, 1995; Díaz et al., 2004). La buena capacidad emulsionante que exhiben los agregados puede ser consecuencia de la diferente naturaleza que poseen sus proteínas (Díaz et al., 2004). El porcentaje de β -LG es inferior, concretamente la mitad, al resto de CPS caprinos (tabla 27). De la misma manera, tal como ya se explicó con anterioridad, durante la clarificación mediante agregación termocálcica se produce la precipitación de las proteínas de las membranas del glóbulo graso, las cuales se separan posteriormente por centrifugación. Estas proteínas, junto con la β -LG, podrían ser las responsables de la excelente propiedad emulsionante que exhiben los agregados. Díaz et al. (2004) también observaron que los agregados separados por precipitación termocálcica y microfiltración presentaban buena capacidad emulsionante, incluso superior a la de los correspondientes CPS ovinos obtenidos de suero tanto clarificados como sin clarificar. Joseph y Mangino (1988a) también mencionaron las posibles buenas propiedades emulsionantes de las proteínas de la membrana del glóbulo graso. Por tanto, estas proteínas pueden compensar en la capacidad emulsionante la baja concentración de β -LG que presentan los agregados.

Finalmente, señalar que la alta presencia de calcio en los agregados, al igual que destaca Karleskind et al. (1996), parece que no afecta a la capacidad emulsionante.

En nuestro estudio, se hizo uso en primer lugar, de un homogeneizador de vástago seguido por un homogeneizador de presión, con lo que no sólo se formaron emulsiones, sino que eran muy estables. Sin embargo los agregados forman emulsiones estables si se emplea exclusivamente el homogeneizador de vástago, pues en el momento en que se hace pasar la emulsión formada por el homogeneizador de presión, ésta se rompe, separándose en dos fases.

Probablemente, es consecuencia de la cantidad de proteína utilizada, porque al ser un producto con un alto contenido lipídico y con un bajo contenido proteico, se usaron soluciones con 0,54% de proteína (10g de producto en polvo/100 ml), ya que

Resultados y Discusión

emplear un 2% de proteína supone mezclar altas cantidades de producto en polvo, difíciles no sólo de disolver en agua, sino también de ajustar el pH.

Por un lado la proporción de proteína aplicada puede ser insuficiente. Si la cantidad de emulgente en la interfase aceite-agua suficientes es escasa, habrá huecos en la interfase, alrededor de las gotas de grasa, con lo que es más fácil que dos gotas pueden aproximarse y unirse para formar una más grande, produciéndose la coalescencia, que puede desencadenar un desnatado debido al aumento del tamaño de las gotas de grasa (McClements, 2008). Por otro lado, al realizar una segunda homogeneización, disminuye el tamaño de las gotas de grasa, y la cantidad de proteína necesaria depende del tamaño de las gotas (Hill, 1996). Así, el 0,6% de proteína es suficiente para cubrir las gotas de mayor tamaño presentes en la primera homogeneización, pero parece que ese porcentaje proteico no es suficiente cuando las gotas son más numerosas y de menor tamaño (Hill, 1996), tal como refleja la figura 22.

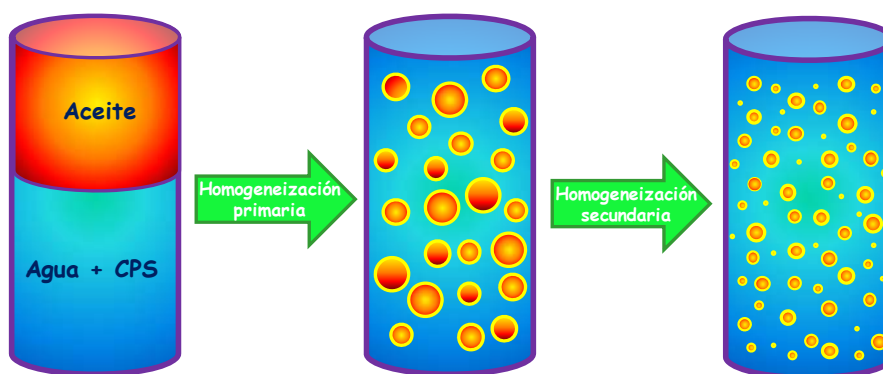


Figura 22: Elaboración de nuestras emulsiones

Los resultados del índice de estabilidad emulsionante (IEE) de nuestros CPS se muestran en la tabla 30. En cuanto a la estabilidad de la emulsiones, todos los productos obtenidos a partir de suero de cabra CPS (CPS de suero tanto clarificado como sin clarificar y agregados) presentaron valores alrededor del 100%. Por tanto, la clarificación no influyó en la estabilidad de las emulsiones a ninguno de los dos pH estudiados. El CPS bovino comercial presentó valores inferiores (95% a pH 7 y 80% a pH 4) que los productos caprinos.

No existe información disponible sobre la estabilidad emulsionante de CPS caprinos. No obstante, si comparamos la estabilidad de nuestros CPS con los CPS de

origen ovino (Díaz et al., 2004), con los CPS bovinos de Kim et al. (1989) o el CPS comercial de Euston y Hirst (1999), se observa que nuestros productos poseen un índice de estabilidad emulsionante muy superior al de estos concentrados, siendo, por lo tanto, nuestras emulsiones mucho más estables, lo que puede estar relacionado no sólo con la composición de los CPS sino con la manera de elaborar la emulsión. El tiempo y la intensidad de la emulsificación influyen. De hecho al prolongar la emulsificación o una mayor intensidad, ambos hasta un cierto límite, se crean emulsiones más estables (Tornberg y Hermansson, 1977). En nuestro estudio, el realizar dos homogeneizaciones pudo influir en que se formaran emulsiones muy estables.

Lógicamente también ha podido repercutir las características de las proteínas, como su solubilidad. La estabilidad emulsionante está positivamente correlacionada con la solubilidad, lo que demuestra el papel trascendental de las proteínas solubles en la emulsificación (Patel y Kilara, 1990; Karleskind et al., 1995); no obstante, no se necesitan valores del 100% (Damodaran, 2005), ya que, aunque la solubilidad es un requisito, no es el único parámetro que determina esta propiedad (De Wit y De Boer, 1975).

Si comparamos los valores de solubilidad con los resultados del IEE, se observa que las emulsiones más inestables (<97%) se corresponden con los productos con una menor solubilidad (<85%). Así, la emulsión de CPS bovino a pH 4 es la más inestable y corresponde a la que tenía menor solubilidad de sus proteínas.

La estabilidad emulsionante también está positivamente relacionada con el contenido proteico (Yamauchi et al., 1980; Patel y Kilara, 1990). Las proteínas séricas son eficientes en crear emulsiones estables, incluso a pequeñas concentraciones, empleando habitualmente alrededor del 1 al 3% de concentración de proteína para estabilizar emulsiones (Damodaran, 2005). De hecho en nuestro estudio tan sólo se utilizó un 2% de proteína para todos los concentrados, a excepción de los agregados, que únicamente se empleó un 0,6% de proteína para formar emulsiones estables.

Vaghela y Kilara (1996) señalaron que la adición de cloruro cálcico no afecta a la estabilidad emulsionante mientras que la presencia de lípidos implica una menor estabilidad emulsionante, al igual que observaron Patel y Kilara (1990). En nuestro caso, no se observa correlación de la estabilidad emulsionante con el contenido de calcio pero tampoco con el contenido de lípidos.

Respecto de los agregados, éstos presentaron unos altos valores del IEE. Por el contrario, los retenidos de MF ovinos obtenidos por Díaz et al. (2004) presentaron

Resultados y Discusión

una menor estabilidad emulsionante tanto de sus correspondientes CPS como de nuestros agregados.

4.4. PROPIEDADES GELIFICANTES

En este apartado, se describen las medidas reológicas, color, capacidad de retención de agua (CRA) y microestructura de los geles obtenidos mediante tratamiento térmico de los productos caprinos estudiados y del CPS bovino.

4.4.1. REOLOGÍA

Las tablas 31 y 32 muestran las características reológicas (módulo complejo, módulo elástico, módulo viscoso) de los geles obtenidos a partir de los concentrados de suero dulce caprinos (n=3) y del concentrado de proteína sérica bovino tanto a pH 7 como a pH 4, respectivamente.

Las medidas se realizaron a 20 Pa, que corresponde a la zona de comportamiento viscoelástica lineal de nuestras muestras, previamente determinada mediante stress sweep.

Al analizar los resultados de ambas tablas, se observa que se forman diferentes tipos de estructuras al someter a tratamiento térmico a los concentrados: desde soluciones proteicas de CPS que no son capaces de formar un gel hasta estructuras muy compactas, pasando por geles viscoelásticos. Estas diferencias son consecuencia, principalmente, de la concentración proteica empleada.

Es sobradamente conocido, que se necesita una concentración mínima para que se produzca la gelificación (Twomey et al., 1997; Zayas, 1997; Sullivan et al., 2008), de manera que por debajo de cierta concentración proteica no se produce la gelificación (Robin et al., 1993; Zayas, 1997). De hecho, a bajas concentraciones (que es lo que sucede con concentraciones proteicas del 5 y 7,5% en el CPS bovino a pH 7 y en todos los productos por debajo del 10% de proteína a pH 4), se forma una masa viscosa y turbia, incapaz de formar una estructura ordenada similar a la de un gel, ya que cuando la cantidad de proteína es muy baja, es difícil que se forme una red proteica (Mangino, 1984). Bajo estas condiciones predominan más las interacciones en el interior de las moléculas proteicas frente a las interacciones entre las proteínas (Mangino 1984; Robin et al., 1993; Zayas, 1997). Al incrementarse la concentración de proteína, aumenta la probabilidad de que se formen más interacciones entre las moléculas proteicas y también con el agua (Cheftel et al., 1989; Robin et al., 1993; Zayas, 1997), y a cierta concentración se produce la gelificación (Mangino, 1984).

Tabla 31: Módulo complejo (G^* , KPa), módulo elástico (G' , KPa) y módulo viscoso (G'' , KPa), (media \pm desviación estándar) de los productos en polvo obtenidos del suero caprino (n=3) y del concentrado de proteínas séricas bovino (pH 7)

pH 7	Concentrado de proteínas de suero caprino	CPS-C ⁽¹⁾			CPS-SC ⁽²⁾			CPS Bovino	(1)-(2)
		G^*	G'	G''	G^*	G'	G''		
7	5% PROTEÍNA	G^*	30,40 \pm 8,81	4,48 \pm 2,14	NO GEL	**			
		G'	29,98 \pm 8,70	4,40 \pm 2,12					
		G''	5,01 \pm 1,41	0,85 \pm 0,34					
	7,5% PROTEÍNA	G^*	GEL MUY RÍGIDO	43,80 \pm 14,89	NO GEL				
		G'		43,13 \pm 14,63					
		G''		7,62 \pm 2,73					
	10% PROTEÍNA	G^*	GEL MUY RÍGIDO	GEL MUY RÍGIDO	4,89				
		G'			4,85				
		G''			0,67				

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados;

CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino.

n.s.: no significativo (p>0,05); *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001

Tabla 32: Módulo complejo (G^* , KPa), módulo elástico (G' , KPa) y módulo viscoso (G'' , KPa), (media \pm desviación estándar) de los productos en polvo obtenidos del suero caprino ($n=3$) y del concentrado de proteínas séricas bovino (pH 4)

pH 4	5 y 7,5% PROTEÍNA	10% PROTEÍNA	CPS-C ⁽¹⁾			CPS-SC ⁽²⁾			CPS Bovino			(1)-(2)
			G^*	G'	G''	G^*	G'	G''	G^*	G'	G''	
			NO GEL									
			6,09 \pm 4,82	6,01 \pm 4,74	0,99 \pm 0,82	14,56 \pm 9,81	14,31 \pm 9,60	2,69 \pm 2,03	1,75	1,72	0,35	n.s.
												n.s.
												n.s.

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados;

CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino.

n.s.: no significativo ($p > 0,05$); *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

Tal como se apuntó en la introducción, la cantidad de proteína mínima para formar geles con CPS varía entre 6-8% (Steventon et al., 1991; Tang et al., 1994; Britten y Pouliot, 1996; Oakenfull et al., 1997), los cuales son valores más bajos que para los APS comerciales que se sitúa alrededor del 10% (Kuhn y Foegeding, 1991; Tang et al., 1994; Ju y Kilara, 1998b; Casper et al., 1999).

En definitiva, la capacidad de gelificar de las soluciones de CPS se incrementa con la concentración proteica (Mulvihill y Kinsella, 1987), teniendo un efecto marcado en la fuerza del gel. Al aumentar la concentración proteica se incrementa la fuerza del gel (Mulvihill y Kinsella, 1987; Lupano et al., 1992; Boye et al., 1997; Twomey et al., 1997; Singh, 2003; Bordenave-Juchereau et al., 2005), lo que en nuestros resultados se traduce con mayores valores del módulo elástico (G'). Si dirigimos nuestra atención a la tabla 31, se observa claramente que un aumento de la concentración va acompañado de un incremento de G' , es decir, de la firmeza de los geles.

En nuestro caso también, dependiendo de la concentración proteica empleada, se obtienen dos tipos de geles: compactos o rígidos y viscoelásticos. A concentraciones altas a pH neutro (en concreto, a partir de 7,5% para el CPS clarificado o de 10% para el concentrado no clarificado), se forman geles que presentan tanta rigidez que es imposible de determinar sus propiedades reológicas mediante reología oscilatoria. Se constituyen geles viscoelásticos, como el del yogur, (Shoemaker et al., 1992) a pH 7 para 5% de proteína de CPS clarificado, 5-7,5% de proteína para CPS no clarificado y 10% de proteína de CPS bovino, y a 10% de proteína para todos los concentrados a pH 4. Estas características (geles viscoelásticos) son las deseadas para la aplicación de CPS en la industria alimentaria y son consecuencia de que la desnaturalización tuvo lugar más rápidamente que la agregación, por lo que hubo tiempo suficiente para la orientación de las moléculas proteicas formándose una estructura ordenada en vez de una agregación al azar (Tang et al., 1995).

De los geles formados, se puede analizar más en profundidad el barrido de frecuencias llevado a cabo, revelando así, la evolución de G' y G'' en función de la frecuencia (figuras, 23, 24, 25 y 26).

Resultados y Discusión

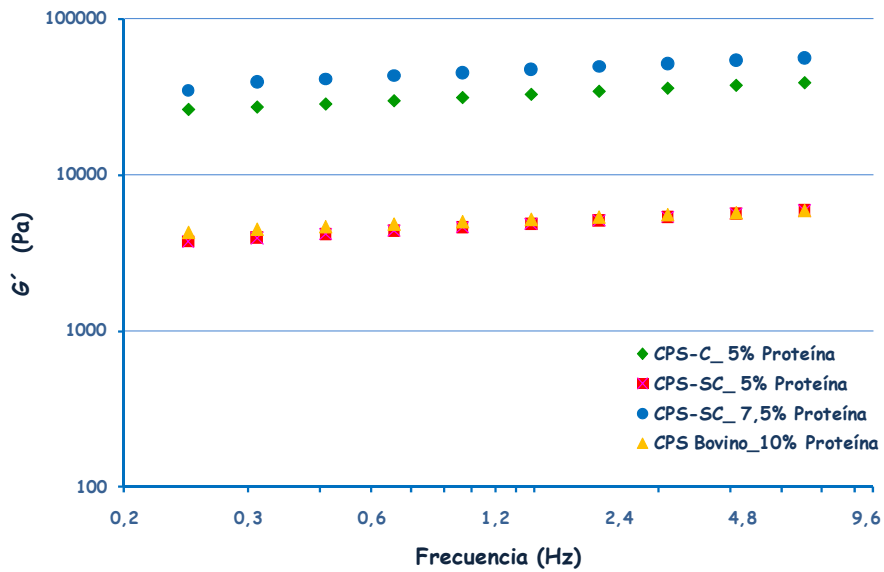


Figura 23: Evolución de G' (Pa) con la frecuencia aplicada a los geles obtenidos de los CPS a pH 7

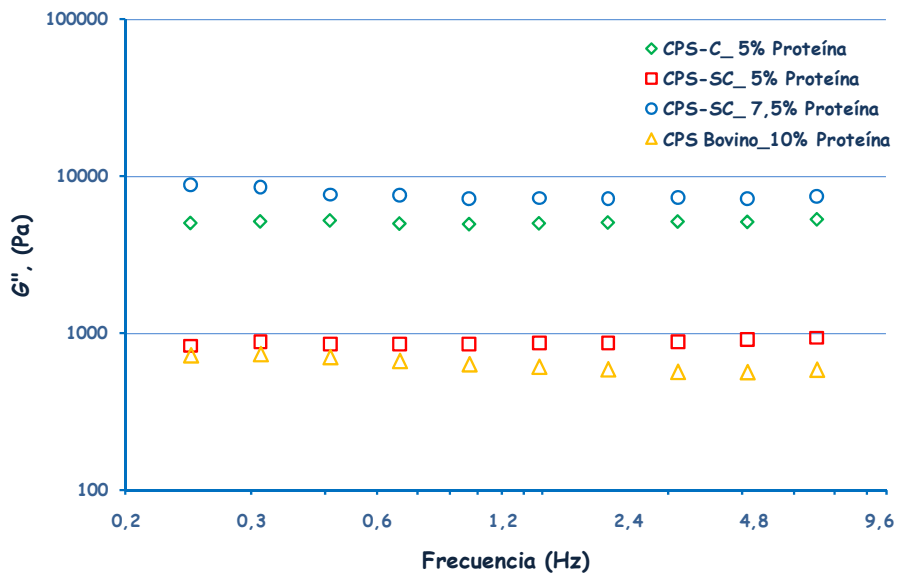


Figura 24: Evolución de G'' (Pa) con la frecuencia aplicada a los geles obtenidos de los CPS a pH 7

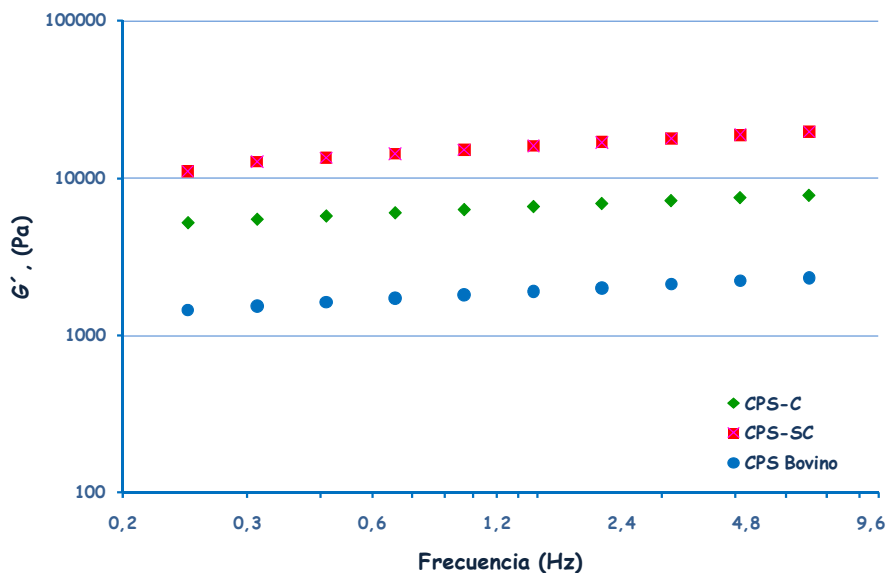


Figura 25: Evolución de G' (Pa) con la frecuencia aplicada a los geles obtenidos de los CPS a pH 4 y 10% de proteína

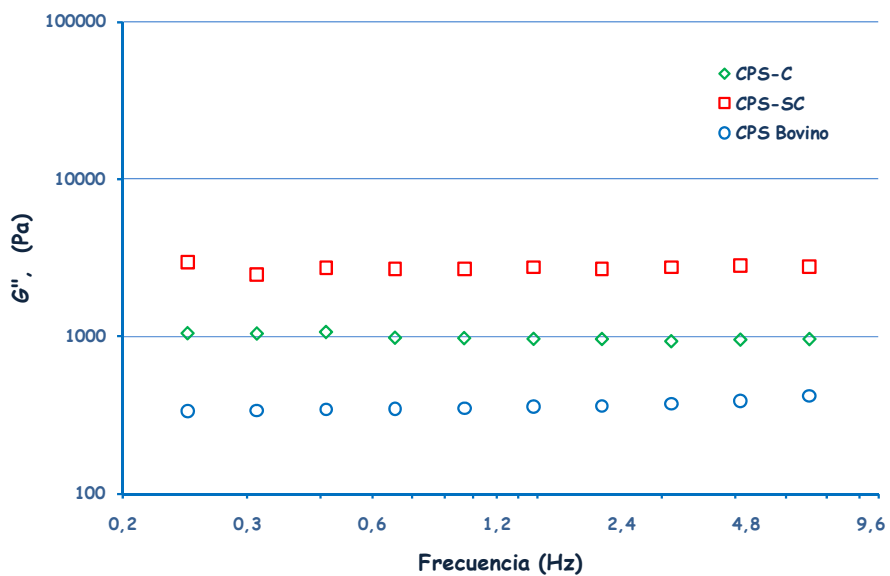


Figura 26: Evolución de G'' (Pa) con la frecuencia aplicada a los geles obtenidos de los CPS a pH 4 y 10% de proteína

Resultados y Discusión

El criterio más ampliamente empleado para definir si una muestra es un gel o no es que el módulo elástico sea mayor que el módulo viscoso e independiente de la frecuencia (Sullivan et al., 2008), tal como se aprecia para todos nuestros geles en las figuras 23, 24, 25 y 26.

Al observar la gráficas, se distingue que la G' muestra poca dependencia de la frecuencia en los distintos geles estudiados a pH 7 y pH 4, tanto los caprinos como los bovinos, lo que indica la presencia de una red bien estructurada dentro de las frecuencias aplicadas. Además se observa rotundamente que G' es siempre mayor a G'' (5-6 veces mayor), lo que implica que se han formado geles elásticos. Este patrón es similar a los geles ovinos, bovinos, y caprinos, no clarificados de Pintado et al. (1999) y los geles ovinos de Díaz et al. (2006).

Si analizamos por separado, la capacidad gelificante de los CPS caprinos y del bovino (véase figuras 23, 24, 25 y 26 y tablas 31 y 32), se puede distinguir que los geles elaborados con CPS de origen caprino son más firmes que el del CPS bovino a ambos pHs. Además, a pH 7 las concentraciones proteicas necesarias para gelificar fueron diferentes en los CPS caprinos y bovino, siendo menor en los primeros.

Muchos autores han estudiado la fuerza de geles preparados con CPS comerciales (Tang et al., 1995; Puyol et al., 1999a,b; Veith y Reynolds, 2004; Lizarraga et al., 2006; Lorenzen y Schrader, 2006; Heino et al., 2007) o con CPS bovino (Karleskind et al., 1995b; Pintado et al., 1999; Casper et al., 1999), ovino (Casper et al., 1999; Pintado et al., 1999; Díaz et al., 2006) o caprino (Casper et al., 1999; Pintado et al., 1999), pero es difícil comparar resultados debido al uso de diferentes condiciones de preparación de geles, de medida y de aparatos de medición. Asimismo, a excepción del trabajo llevado a cabo por Pintado et al. (1999) o Casper et al., (1999), apenas existen estudios sobre geles con CPS de origen caprino, y únicamente el de Pintado et al. (1999) con métodos reológicos oscilatorios.

Al comparar la G' de nuestros geles con la de otros autores (Tang et al., 1994, 1995; Holt et al., 1999b; Pintado et al., 1999; Díaz et al., 2006; Lizarraga et al., 2006) se observa que en general obtuvimos geles caprinos con una mayor firmeza. Si recordamos los resultados de composición proteica de nuestros concentrados (tabla 27), éstos se caracterizan por que la proteína mayoritaria es la β -LG, la cual está significativamente correlacionada con la fuerza del gel (Kim et al., 1987; Morr y Ha, 1993; Cayot y Lorient, 1997). El alto contenido de esta proteína puede ser la responsable de las buenas propiedades gelificantes que presentan nuestros CPS en comparación con otros autores. Sin embargo, Pintado et al. (1999) y Casper et al.

(1999) también observaron que los geles caprinos son más firmes que los geles bovinos. En ambos casos lo relacionaron con la diferente composición de los CPS. Casper et al. (1999) indicaron que el gel más débil en el CPS bovino se debe a un mayor porcentaje de calcio y cenizas y menor concentración de β -LG en relación a los CPS caprinos. Pintado et al. (1999) lo atribuyeron al menor contenido proteico y el mayor contenido de lactosa y α -LA en el CPS bovino. Pero estas diferencias pueden ser consecuencia de la variabilidad presente entre especies y a la habilidad que poseen las proteínas desnaturalizadas para asociarse y gelificar, que depende de su composición de aminoácidos, de su peso molecular, de la hidrofobicidad neta y de su concentración (Pintado et al. 1999). En nuestro caso, no hay diferencias importantes en la composición química y proteica de los CPS caprinos obtenidos con el CPS bovino comercial que puedan justificar las diferencias obtenidas en las propiedades reológicas de los geles, salvo un mayor contenido de cenizas del CPS bovino (apartado 3 de Resultados y Discusión). Por tanto, la diferencia en la composición aminoacídica de las proteínas de lactosuero entre ambas especies puede influir en los resultados.

La firmeza de los geles de proteínas séricas se incrementa a medida que aumenta la concentración iónica, pero hasta un máximo a partir del cual decrece. Una vez que se alcanza un máximo de G' , los valores del modulo elástico disminuyen si se incrementa la concentración de sal añadida (Tang et al., 1994, 1995). Por ello una mayor presencia de sales en el CPS bovino puede ir acompañada de una menor firmeza de los geles obtenidos frente a los geles caprinos, incluso a mayor concentración de proteína.

En estas diferencias entre geles de CPS de distintas especies también puede haber influido el método de deshidratación empleado en la elaboración del concentrado, pues el CPS bovino comercial ha sido obtenido por atomización, mientras que nuestros CPS caprinos se sometieron a una liofilización. Este último método provoca una menor desnaturalización de las proteínas, y por ello, es posible que tengan mejores propiedades gelificantes los CPS caprinos.

Al comparar más detenidamente los geles obtenidos con los dos tipos de CPS caprinos, se observa que no se aprecian diferencias entre ellos en relación a la concentración proteica necesaria para gelificar. En ambos casos, gelificaron a 5% de concentración proteica a pH 7 y a 10% de concentración proteica a pH 4. Sin embargo, sí se observan dos tendencias en función del pH. A pH neutro los CPS clarificados son capaces de formar geles más firmes, con mayor G' y G'' ; por el contrario, a pH 4, no hay diferencias significativas entre los geles de concentrados caprinos clarificados y no clarificados, aunque sean más firmes los segundos.

Resultados y Discusión

Si analizamos la proporción de proteínas entre los CPS caprinos (véase tabla 27), se aprecia que no hay diferencias significativas en la composición proteica del concentrado clarificado y no clarificado, aunque el CPS clarificado posea un ligero mayor contenido de seroalbúmina e Ig G. Ambas proteínas pueden haber contribuido a que los geles preparados a partir de este concentrado sean más firmes a pH 7. La seroalbúmina también está considerada un buen agente gelificante (Aguilera, 1995), y la Ig G parece estar correlacionada con la firmeza (Karleskind et al., 1995b). Además, la Ig G posee un pI próximo a pH 7, a diferencia del resto de proteínas séricas. Por este motivo, a pH neutro, a diferencia de lo que sucede a pH 4, apenas presenta cargas de repulsión con lo que se favorece la agregación proteica.

Esta mayor firmeza de los geles de CPS clarificados a pH 7 puede igualmente ser consecuencia del mayor contenido lipídico de los CPS no clarificados, que además se magnifica al ser necesario una mayor concentración de polvo para llegar a la misma concentración proteica que con los CPS clarificados. Muchos autores (Sternberg et al. 1976; Morr 1992a; Karleskind et al., 1995b; Blecker et al., 2000) señalan el papel perjudicial que la grasa residual y los complejos de fosfolipoproteínas desempeñan sobre la gelificación. Parece que pueden inhibir la habilidad de las proteínas de formar un gel (Morr, 1992a) al obstaculizar la formación de la matriz proteica del gel (Karleskind et al., 1995b) y al ser capaces de interferir en las interacciones de las proteínas vía formación de enlaces hidrofóbicos intermoleculares (Morr, 1992a). Incluso parece que existe una correlación negativa entre la fuerza de los geles y la concentración lipídica (Karleskind et al., 1995b), con lo que no resulta tan sorprendente que los CPS no clarificados sean menos firmes a pH 7.

Sin embargo, los CPS no clarificados son capaces de formar geles más firmes que el CPS bovino a ambos pH, sobre todo a pH 7 a pesar de su mayor contenido lipídico. Por tanto, las características de las proteínas del suero de cabra pueden contrarrestar el efecto negativo del alto contenido lipídico.

La adición de calcio en forma de cloruro cálcico durante la clarificación mediante precipitación termocálcica puede haber contribuido positivamente a la firmeza de los geles de CPS clarificados, porque se ha demostrado que este ión es importante en la gelificación de muchas proteínas (Mangino, 1992a). El calcio facilita la asociación entre proteínas y la formación de una matriz proteica durante el tratamiento térmico (Mulvihill y Kinsella, 1988, Mangino, 1992a), con lo que la adición de calcio puede aumentar la fuerza del gel (Mulvihill y Kinsella, 1988; Mangino, 1992b). Sin embargo esta tendencia no se distingue a pH 4. Esto es lógico porque la adición de iones como Na⁺, K⁺, y Ca⁺⁺ es más efectiva a pH 6 ó 7,5 (Brandenberg et al.,

1992) o en la zona alcalina de la región isoelectrica (Varunsatian et al., 1983), pero inefectiva a pH 3 ó 4,5 (Brandenberg et al., 1992) ya que estos iones favorecen la gelificación al unirse y neutralizan las cargas negativas de las proteínas (Brandenberg et al., 1992), que se produce a valores de pH mayores que el pI. Por estos motivos, no es de extrañar que una mayor presencia de sales del CPS clarificado vaya acompañada de una menor firmeza de los geles obtenidos a pH 4.

Por otro lado, Bordenave-Juchereau et al. (2005) indican que el efecto protector de la lactosa sobre las proteínas séricas es incluso mayor a pH ácido. Este menor contenido de lactosa del concentrado no clarificado ayudaría a que forme geles más firmes a pH 4 en relación al resto de concentrados y, sobre todo, que los geles con CPS clarificado.

Díaz et al. (2006) encontraron diferencias importantes entre geles elaborados con CPS clarificados y no; en su caso influye que compararon geles obtenidos con la misma concentración de polvo utilizado y no unificando la concentración proteica. También hay que destacar que puede influir que eliminaron mediante microfiltración fosfolipoproteínas que tenían propiedades antiespumantes (Díaz et al., 2004), las cuales también disminuirían la capacidad gelificante. En nuestro estudio, como se señaló anteriormente, no parece que se hayan eliminado esas fosfolipoproteínas.

En nuestro trabajo también es muy evidente la influencia del pH en las características reológicas de los geles. De hecho, el pH es uno de los factores que más influye en la gelificación (Mangino, 1984, Cayot y Lorient, 1997; Zayas, 1997). Las propiedades gelificantes de los CPS (Haggett, 1976; De Wit et al., 1988; Morr y Ha, 1993) son muy dependientes de esta variable.

Al estudiar el efecto del pH, los CPS caprinos necesitan mayor cantidad de proteína a pH ácido que a pH neutro para que se produzca la gelificación, a diferencia de lo que sucede en los geles de CPS comerciales de Morr y Foegeding (1990) o de APS de Bryan y McClements (2000). En los geles con CPS bovino, por el contrario, la concentración de proteína necesaria es la misma a ambos pHs. Pero independientemente de la concentración, los geles tanto caprinos como bovinos son más firmes a pH neutro que a pH 4, tal como sucede en los geles (con CPS, APS o con β -LG, de origen ovino o bovino) elaborados por Stading y Hermansson (1991), Boye et al. (1995, 1997), Errington y Foegeding (1998) y Díaz et al. (2006). Por el contrario, Tang et al. (1995) obtuvieron geles con CPS comerciales que presentaron una G' ligeramente mayor a pH 4 que a pH 7.

Resultados y Discusión

Estas variaciones que experimentan las propiedades del gel con el pH se atribuyen principalmente a las variaciones en las interacciones electrostáticas y a los puentes disulfuro (Singh, 2003).

En general, la firmeza de geles de proteínas séricas aumenta con el pH (Morr y Foegeding, 1990), por lo que a pHs entre 6-7,5 se favorece la formación de una estructura proteica más ordenada mediante uniones a través de puentes disulfuro, proteína-calcio y otros mecanismos, formándose geles más firmes y translúcidos, (Morr y Ha, 1993). Esta mayor firmeza de los geles caprinos a pH 7 frente a pH 4 nos da una idea de que existen suficientes fuerzas de atracción que compensan las fuerzas de repulsión electrostática, que son consecuencia de la alta carga neta de las proteínas a pH alejados del pI. En cambio, a valores de pH próximos al pI, la carga neta de las proteínas se aproxima a cero, de forma que su carga está neutralizada. La falta de fuerzas de repulsión puede conducir a una agregación rápida y al azar, formándose como consecuencia un gel más débil (Damodaran, 1996; Mastsumura y Mori, 1996; Bordenave-Juchereau et al., 2005). Algunos autores incluso señalan que a estos pHs parece que se inhibe la desnaturalización (primera etapa del proceso de gelificación) de las proteínas séricas (Brandenberg et al., 1992; Boye et al., 1995; Sullivan et al., 2008).

Al mismo tiempo existe una relación entre el pH y los grupos SH. Los puentes disulfuro son imprescindibles para que se alcance la integridad física de la matriz del gel (Matsumura y Mori, 1996), predominan en la red y son de hecho en parte responsables de la firmeza del gel (Karleskind et al., 1995b). Pero en condiciones ácidas, la reactividad de los grupos SH decrece (Shimada y Cheftel, 1988) o incluso son relativamente inertes, lo que explicaría la estabilidad de la β -LG, y de las proteínas séricas en general, en esta región (Twomey et al., 1997; Bordenave-Juchereau et al., 2005). Por el contrario, a pH próximo al pH neutro, las interacciones mediante grupos SH favorecen la rigidez (De Wit, 1989) y elasticidad del gel (Shimada y Cheftel, 1988; De Wit, 1989).

En los geles elaborados con el CPS bovino hay menores diferencias entre los elaborados a pH 7 y a pH 4. Este resultado puede deberse a la presencia de mayor cantidad de sales en el CPS bovino que en los CPS caprinos, pues se conoce ampliamente que las sales tienen un gran influencia en la propiedades gelificantes de las proteínas séricas (Tang et al., 1994; Zayas, 1997; Singh, 2003).

Tal como se comentó con anterioridad, la adición de sales aumenta la firmeza del gel en proteínas como las de lactosuero (Cheftel et al., 1989), pero hasta un nivel

máximo a partir del cual disminuye (véase figura 27). Quizás este nivel máximo de sales se haya alcanzado para el CPS bovino, de manera que los valores del módulo elástico son menores que para el resto de geles de concentrados caprinos, principalmente a pH 7. Las sales a pH 7 pueden neutralizar la carga neta de las proteínas y, por tanto, por la falta de fuerzas de repulsión son capaces de formar un coágulo con baja fuerza.

A pH 4, por el contrario, parece que decrece G' gradualmente, pero lentamente, a medida que aumenta la fuerza iónica añadida (NaCl o CaCl_2) (Tang et al., 1995). También, a medida que el pH se modifica hacia el pI se forman geles con baja rigidez, ya que la agregación se produce cada vez más al azar (Tang et al., 1995), tal como se refleja en la figura 27.

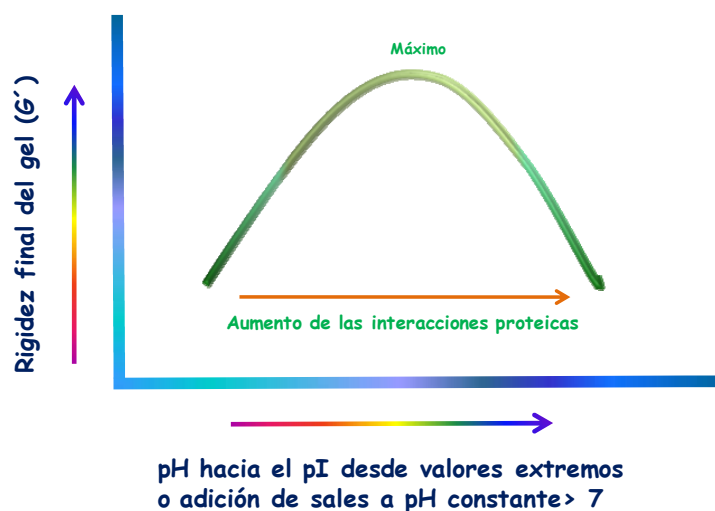


Figura 27: Diagrama en el que se refleja como varía el módulo de elasticidad o de almacenamiento (G') con los cambios de pH o de concentración salina (Adaptado de Tang et al., 1995)

En el efecto del pH en la gelificación se puede observar un cierto paralelismo con los resultados obtenidos en la solubilidad de las proteínas. Al igual que en el resto de propiedades funcionales evaluadas, la solubilidad también es importante en la gelificación. Cheftel et al. (1989) destacan que si se quiere que las proteínas del lactosuero "funcionen" bien en las emulsiones, espumas y geles, deben tener una solubilidad inicial elevada. En nuestros resultados, una mejor solubilidad de los CPS caprinos (clarificado y no clarificado) y del bovino a pH 7 que a pH 4 (véase tabla 28)

Resultados y Discusión

está relacionado con la obtención de geles más firmes a pH neutro. De hecho la solubilidad es un factor que está relacionado con la fuerza de los geles (Veith y Reynolds, 2004), ya que la presencia de agregados de proteína insolubles interfiere directamente con la formación de geles fuertes (Veith y Reynolds, 2004).

Mención aparte merece el estudio de las propiedades gelificantes de los agregados caprinos. No hemos mostrado sus resultados ya que, a diferencia de los CPS caprinos, las preparaciones de agregados con porcentajes de proteína entre 5-10% de proteína son demasiado viscosas lo que dificulta enormemente su dispersión y su disolución. Por estos motivos no se pudo evaluar la propiedad gelificante con estos porcentajes proteicos.

A raíz de ello, se prepararon disoluciones de 20 y 40 g de polvo en 100 ml, lo que supone 1,07 y 2,14 % de proteína respectivamente. En estas condiciones, los agregados a ambos pHs no fueron capaces de formar geles sino simplemente estructuras viscosas.

Esto no significa que no puedan llegar a formar geles, pero bajo estas condiciones no es posible. De hecho, las preparaciones con los retenidos separados por MF de suero ovino con 3,3% y 5,9% de proteína, sí fueron capaces de gelificar tanto a pH 4 como a pH 7 (Díaz et al., 2006).

Además del bajo porcentaje de proteína, hay otros componentes de los agregados que podrían influir en que estos polvos tengan peores propiedades gelificantes. Mulvihill y Kinsella (1987) y Bordenave-Jucherau et al. (2005) coinciden en subrayar que la lactosa afecta negativamente a la gelificación, pues estabiliza y protege a las proteínas séricas contra la desnaturalización proteica (Morr y Ha, 1993; Bordenave-Juchereau et al., 2005) formándose geles más débiles (Tang et al., 1994; Bordenave-Jucherau et al., 2005). El alto contenido de lactosa de los agregados (40,46%), podría contribuir a su escasa capacidad gelificante. El elevado porcentaje de caseinomacropéptido (30,60%) también puede tener un efecto negativo en la fuerza del gel como señalan algunos autores (Veith y Reynolds, 2004; Lorenzen y Schrader, 2006). De igual forma, el alto porcentaje de cenizas (10,72%) y de lípidos (34,60%) de los agregados caprinos puede también haber contribuido a que no sean capaces de formar geles bajo las condiciones estudiadas.

4.4.2. CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA

En las tablas 33 y 34 aparece reflejada la capacidad de retención de agua (CRA) expresada como porcentaje de agua liberada a diferentes tiempos de medida (1, 5 y 10 minutos) de las muestras de CPS que han formado geles viscoelásticos. Se puede apreciar que a medida que aumenta el tiempo de compresión, en general se incrementa la cantidad de agua liberada.

Al comparar los resultados de CRA a pH 7 con los obtenidos por Veith y Reynolds (2004) con 10 minutos de presión, para diferentes CPS comerciales a una concentración de 11,2% de proteína soluble, se observa que la pérdida de agua en nuestros concentrados caprinos es mayor, mientras que la del CPS bovino es inferior. Es necesario destacar que en el caso de nuestros productos caprinos, la concentración proteica utilizada es menor.

Si comparamos la CRA de los geles de CPS caprinos, se puede distinguir que, a ambos pHs, el gel caprino de CPS no clarificado presenta un menor porcentaje de agua liberada que el CPS clarificado, con diferencias significativas en la medida a los 5 minutos a pH 7.

Hay muchos factores que pueden influir en la CRA: el contenido de β -LG, lípidos, fosfolípidos (Karleskind et al., 1995b), caseinomacropéptido (Veith y Reynolds, 2004), calcio (Karleskind et al., 1995b; Mei et al., 1996), sodio, potasio, fósforo (Mei et al., 1996), la concentración proteica, la temperatura y tiempo del tratamiento térmico (Boye et al., 1997) están relacionados significativamente con la CRA.

En las diferencias entre CPS clarificados y no clarificados, el diverso contenido de calcio de ambos productos podría ser uno de los factores que más han influido. La CRA disminuye a medida que aumenta la concentración de sales (Ikeda y Foegeding, 1999) y especialmente de calcio (Lupano et al., 1992). Así, los geles de CPS clarificado, con mayor contenido de calcio que el CPS no clarificado, poseen una menor CRA.

Los lípidos (Karleskind et al., 1995b; Blecker et al., 2000) pueden tener un efecto negativo en la CRA. En concreto, pueden interferir en las interacciones proteicas necesarias para la formación de una estructura fuerte que pueda atrapar el agua en la matriz del gel (Rinn et al., 1990). Sin embargo, en nuestro caso, los CPS no clarificados aportan más lípidos y sin embargo los geles correspondientes pierden menos agua que los geles de CPS clarificados.

Tabla 33: Capacidad de retención de agua (% de agua liberada) (media ± desviación estándar) a pH 7 de los productos en polvo obtenidos del suero caprino (n=3) y del concentrado de proteínas séricas bovino

pH 7	CPS-C ⁽¹⁾	CPS-SC ⁽²⁾	CPS Bovino	(1)-(2)
5% PROTEÍNA	37,50 ± 6,29	22,56 ± 7,53	NO GEL	n.s.
	48,94 ± 4,80	31,74 ± 5,87		*
	51,42 ± 2,57	41,82 ± 7,94		n.s.
7,5% PROTEÍNA	GEL MUY RÍGIDO		NO GEL	
	11,27 ± 3,62	11,27 ± 3,62		
	25,51 ± 4,74	25,51 ± 4,74		
10% PROTEÍNA	GEL MUY RÍGIDO		0,13 0,43 1,28	
	33,01 ± 1,86	33,01 ± 1,86		
	GEL MUY RÍGIDO			

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados;

CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino.

n.s.: no significativo (p>0,05); *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001

Tabla 34: Capacidad de retención de agua (% agua liberada) (media ± desviación estándar) a pH 4 de los productos en polvo obtenidos del suero caprino (n=3) y del concentrado de proteínas séricas bovino

		CPS-C ⁽¹⁾	CPS-SC ⁽²⁾	CPS Bovino	(1)-(2)	
pH 4	5 y 7,5% PROTEÍNA	1 min	NO GEL	NO GEL		
		5 min	NO GEL	NO GEL		
		10 min	NO GEL	NO GEL		
	10% PROTEÍNA	1 min	7,73 ± 7,18	0,39 ± 0,30	4,87	n.s.
		5 min	10,50 ± 9,37	1,89 ± 1,64	5,17	n.s.
		10 min	10,08 ± 8,34	3,87 ± 0,80	10,87	n.s.

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados;

CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino.

n.s.: no significativo (p>0,05); *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001

Resultados y Discusión

En los resultados, se puede percibir también la importancia de la concentración proteica en el porcentaje de agua liberada. A mayor cantidad de proteína, menos agua se libera de los geles por presión, como también observaron otros autores (Boye et al., 1997).

El pH es otro factor que influye de una manera destacable. En los geles de CPS bovino, se puede advertir que la liberación de agua es mayor a pH 4 que a pH 7. De manera general, los geles próximos al pI presentan más sinéresis que los geles más alejados del pI (Rich y Foegeding, 2000), disminuyendo la CRA de los geles a medida que el pH se aproxima al pI (Lupano et al., 1996; Yamul y Lupano, 2003). Esto, como hemos señalado, se aprecia en los geles de CPS bovino, mientras que los de CPS caprino, la situación es la opuesta, de manera que se pierde más agua a pH neutro. Sin embargo, en este caso, parece que la influencia de la concentración proteica es más importante ya que los geles de CPS caprinos a pH neutro tenían una concentración proteica de 5 y 7,5% mientras que los geles a pH 4, la concentración fue del 10%.

Si comparamos los geles de CPS caprinos con los del CPS bovino, no hay diferencias claras. A pH 4, el gel de CPS bovino presenta unos valores intermedios entre los de los CPS caprinos. Este menor valor del CPS bovino a pH 7 puede deberse, como se señaló en otros casos, a la mayor concentración proteica empleada (10%) para obtener los geles que en el caso de los de CPS caprinos (5 y 7,5%).

Finalmente, es necesario comentar que algunos autores (Blecker et al., 2000) señalan una relación entre la firmeza y la CRA, de manera que un aumento de la CRA camina parejo con un aumento de la fuerza del gel, mientras que Karleskind et al. (1995b) no encontraron ninguna relación aparente entre la firmeza y la CRA. Así sucede en nuestro estudio, pues no hay una relación clara entre G' (tablas 31 y 32) y el porcentaje de agua liberada (tablas 33 y 34) de los geles.

4.4.3. COLOR

La medida del color es un factor importante desde el punto de vista de aceptabilidad del producto. Por esos motivos hemos determinado el color de los geles obtenidos, evaluándose los siguientes parámetros de color:

- ✓ L^* : Coordenada de luminosidad
- ✓ a^* : Coordenada rojo-verde
- ✓ b^* : Coordenada amarillo-azul

Los valores de estos parámetros medidos sobre fondo blanco y sobre fondo negro aparecen reflejados en las tablas 35, 36, 37 y 38.

Tabla 35: Coordenadas de color (CIE L*a*b*) (media ± desviación estándar) de los productos en polvo obtenidos del suero caprino (n=3) y del concentrado de proteínas séricas bovino (pH 7, medido sobre fondo blanco)

pH 7 (Fondo Blanco)		CPS-C (1)			CPS-SC (2)			CPS Bovino	(1)-(2)
5% PROTEÍNA	L*	84,84	±	0,73	83,00	±	0,81	NO GEL	*
	a*	-1,10	±	0,03	-1,30	±	0,21		n.s.
	b*	1,91	±	0,22	2,01	±	0,47		n.s.
7,5% PROTEÍNA	L*	GEL MUY RÍGIDO			85,75	±	0,81	NO GEL	
	a*	GEL MUY RÍGIDO			-1,28	±	0,11		
	b*	GEL MUY RÍGIDO			3,94	±	0,35		
10% PROTEÍNA	L*	GEL MUY RÍGIDO			GEL MUY RÍGIDO			76,71	
	a*	GEL MUY RÍGIDO			GEL MUY RÍGIDO			-0,10	
	b*	GEL MUY RÍGIDO			GEL MUY RÍGIDO			11,45	

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados;

CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino.

n.s.: no significativo (p>0,05); *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001

Tabla 36: Coordenadas de color (CIE L*a*b*) (media ± desviación estándar) de los productos en polvo obtenidos del suero caprino (n=3) y del concentrado de proteínas séricas bovino (pH 7, medido sobre fondo negro)

		CPS-C ⁽¹⁾		CPS-SC ⁽²⁾		CPS Bovino	(1)-(2)
pH 7 (Fondo Negro)	5% PROTEÍNA	L*	84,36 ± 0,19	82,74 ± 0,74	NO GEL		*
		a*	-1,07 ± 0,01	-1,32 ± 0,27			n.s.
		b*	1,55 ± 0,10	1,28 ± 0,58			n.s.
	7,5% PROTEÍNA	L*	GEL MUY RÍGIDO	85,23 ± 0,82	NO GEL		
		a*		-1,41 ± 0,17			
		b*		3,50 ± 0,32			
	10% PROTEÍNA	L*	GEL MUY RÍGIDO	GEL MUY RÍGIDO		73,96	
		a*				-1,31	
		b*				9,49	

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados;

CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino.

n.s.: no significativo (p>0,05); *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001

Tabla 37: Coordenadas de color (CIE L*a*b*) (media ± desviación estándar) de los productos en polvo obtenidos del suero caprino (n=3) y del concentrado de proteínas séricas bovino (pH 4, medido sobre fondo blanco)

pH 4 (Fondo blanco)	5 y 7,5% PROTEÍNA	10% PROTEÍNA	CPS-C ⁽¹⁾			CPS-SC ⁽²⁾			CPS Bovino			(1)-(2)						
			L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*	
			NO GEL			NO GEL			NO GEL									
			56,92 ± 10,00	-2,40 ± 0,76	2,80 ± 1,86	76,83 ± 3,63	-1,38 ± 0,34	5,87 ± 0,80	72,16	0,13	14,54							*
																		n.s.
																		n.s.

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados;

CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino.

n.s.: no significativo (p>0,05); *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001

Tabla 38: Coordenadas de color (CIE L*a*b*) (media ± desviación estándar) de los productos en polvo obtenidos del suero caprino (n=3) y del concentrado de proteínas séricas bovino (pH 4, medido sobre fondo negro)

		CPS-C ⁽¹⁾	CPS-SC ⁽²⁾	CPS Bovino	(1)-(2)
pH 4 (Fondo negro)	5 y 7,5% PROTEÍNA	L*	NO GEL	NO GEL	
		a*	NO GEL	NO GEL	
		b*	NO GEL	NO GEL	
10% PROTEÍNA	L*	50,46 ± 15,83	75,46 ± 3,14	72,37	*
	a*	-2,10 ± 0,35	-1,50 ± 0,26	-0,80	n.s.
	b*	3,46 ± 0,67	4,82 ± 1,50	12,67	n.s.

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados;

CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino.

n.s.: no significativo (p>0,05); *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001

La medición de las coordenadas de color se determinó sobre un fondo negro y sobre un fondo blanco, ya que algunos autores (Chantrapornchai y McClements, 2002) subrayan la importancia que el fondo juega a la hora de determinar el color. En nuestro caso, los resultados de las coordenadas de color CIE $L^*a^*b^*$ son bastante independientes del fondo usado (excepto en L^* en el gel de CPS-C a pH 4), porque se obtienen resultados muy similares, lo que indica que los geles son ópticamente opacos (Chantrapornchai y McClements, 2002).

De los resultados de color de los geles de CPS caprinos, se distingue que los geles de CPS clarificado muestran mayores valores de L^* que los no clarificados a pH 7, mientras que a pH 4 son los geles de CPS no clarificado los que presentan valores superiores. No hay diferencias importantes entre los geles de CPS caprinos a ambos pH en el resto de coordenadas de color.

Los geles de CPS bovino presentaron a ambos pH mayores valores de a^* y sobre todo de b^* . Además mostraron un menor valor de L^* a pH 7, lo que indica que los caprinos poseen una mayor luminosidad a ese pH.

Finalmente, señalar que los geles de CPS, tanto caprinos como bovinos, a pH 7 muestran mayores valores de la coordenada de luminosidad y menores de b^* que los geles elaborados a pH 4.

De todas las publicaciones consultadas, únicamente, Ju y Kilara (1998) y Chantrapornchai y McClements (2002) nos ofrecen resultados de color para geles, aunque se obtuvieron a partir de aislados de proteínas séricas (APS). En general, estos autores obtuvieron valores de L^* inferiores al de todos nuestros geles tanto a pH 7 como a pH 4.

A medida que aumenta la concentración de NaCl (Ju y Kilara, 1998; Chantrapornchai y McClements, 2002) o de $CaCl_2$ (Ju y Kilara, 1998) añadida a los geles de APS, se obtienen mayores valores de luminosidad, aunque se necesitan concentraciones de 100 mM, para que los geles de Chantrapornchai y McClements (2002) tengan una luminosidad similar a la de nuestros geles a pH 7. Por el contrario, Ju y Kilara (1998) observaron que la luminosidad de los geles de APS con adición de NaCl o $CaCl_2$, aunque aumenta, es inferior a la de todos nuestros geles a ambos pHs, a excepción del clarificado a pH 4.

Nuestras coordenadas rojo-verde son negativas y las amarillo-azul positivas. Resultados diferentes obtuvieron Ju y Kilara (1998), en cuyos geles a^* es positiva y b^* es negativa. Los valores de la coordenada a^* de nuestros geles (a ambos pHs) son

Resultados y Discusión

similares a los de los geles sin y con adición de NaCl de Chantrapornchai y McClements (2002), con valores próximos a 0. Los valores de la coordenada b^* sobre fondo blanco de nuestros geles a ambos pHs (a excepción del CPS de vaca, que es similar) es muy inferior al de los geles de APS sin adición de NaCl de Chantrapornchai y McClements (2002), pero a concentraciones menores de 100 mM de NaCl se obtienen resultados similares. Por el contrario, sobre fondo negro, (a excepción del CPS bovino, que tiene valores superiores) los valores de b^* de nuestros geles son más parecidos a los que no tienen NaCl, que a los que se ha añadido NaCl (Chantrapornchai y McClements, 2002). La adición de NaCl o CaCl_2 a geles de APS provoca cambios en a^* y b^* (Ju y Kilara, 1998).

Aunque se ha determinado el color experimentalmente, realizamos fotografías de los geles obtenidos (figura 28).

De las fotos, lo más destacable es el diferente color que muestran los geles de CPS bovino. Los resultados visuales corroboran los resultados de las coordenadas CIE L^* a^* b^* , ya que los geles de CPS bovino mostraban mayores valores de la coordenada b^* (más amarillo). Esto se identifica con el color más amarillento detectado con las fotografías en los geles de CPS bovino.

Además, se podría considerar los geles de CPS caprino clarificado a pH 4 como translúcidos, no solo por la apariencia, sino por su baja L^* , comparada con el resto de geles, los cuales parecen opacos, visualmente. Una L^* baja sugiere que la mayoría de la luz pasa a través del gel (Ju y Kilara, 1998). A pHs por debajo de 4 se forman también geles translúcidos, débiles y quebradizos (Singh, 2003).

Los geles de CPS caprinos a pH 7 son los que presentaron un mayor valor de la coordenada de luminosidad y son los que presentan un color blanquecino, bastante uniforme y similar. Un alto valor de L^* indica que la luz se refleja, lo que puede relacionarse con una red mejor estructurada. Se puede observar como a pH 7, a igual concentración proteica, los geles de CPS-C presentaron un significativo mayor valor de G^* y G' que los geles de CPS-SC y en el color muestran también un significativo mayor valor de luminosidad. A pH 4, sucede algo similar pero en sentido inverso, los geles de CPS-SC presentan un valor superior de G^* , G' y luminosidad que los geles de CPS-C.

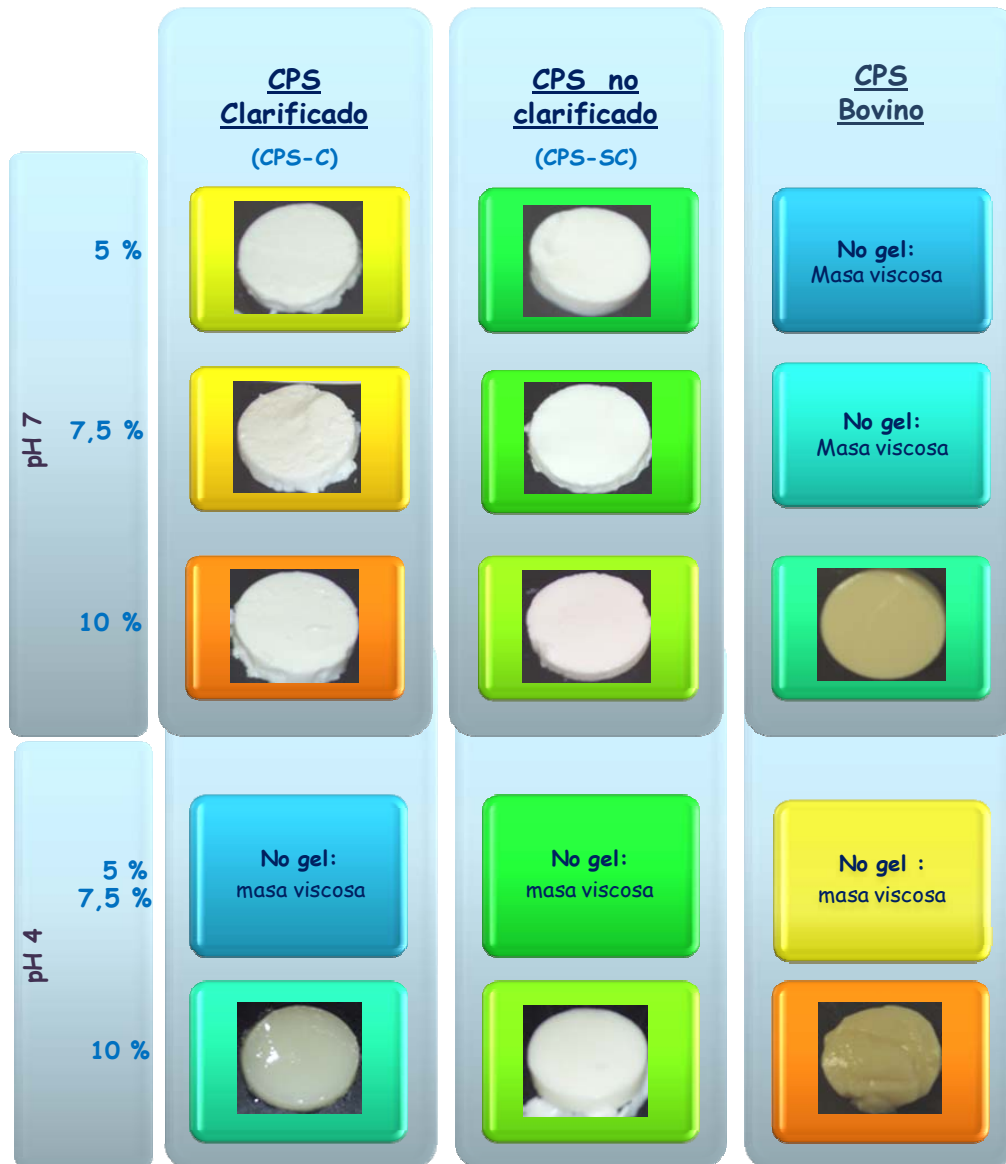


Figura 28: Fotografía de los geles obtenidos

4.4.4. MICROESTRUCTURA

Las micrografías de los geles mediante microscopía electrónica de barrido de las muestras de los geles se muestran en la figura 29.

La característica más sobresaliente de la microestructura de los geles realizados con proteínas séricas es la formación de una red tridimensional cuyos intersticios están rellenos de una solución acuosa (Aguilera, 1995). Tal como se describió en la introducción, se pueden distinguir entre dos tipos de estructuras: una agrupación aleatoria formada por agregados esféricos de gran tamaño que forman redes particuladas, frente a una agrupación más ordenada que se configuran como una cadena de cuentas, formando redes filamentosas (De Wit, 1989; Doi, 1993; Kitabake y Doi, 1993). La β -LG puede formar geles de ambos tipos (al azar o en hilera de cuentas) dependiendo del pH y de la fuerza iónica (Oakenfull et al., 1997), pero en nuestro caso, los geles formados, tanto caprinos como bovinos, presentan una estructura en forma de agregados particulados, al igual que la microestructura de geles de proteínas séricas de otros autores (Vardhanabhuti et al., 2001; Verheul et al., 1998; Yamul y Lupano, 2003; Díaz et al., 2006). Esta estructura desordenada puede también ser consecuencia de que la agregación se ha producido más rápido que la desnaturalización, y no ha tenido tiempo las cadenas polipeptídicas de agruparse de una forma ordenada (Ordóñez et al., 1998).

A pH 7, todos los geles caprinos muestran una estructura similar, compuesta por una estructura porosa con agregados grandes responsables del aumento de la dureza, aunque a medida que aumenta la concentración proteica, disminuye el tamaño de los poros pero se incrementa el de los agregados proteicos, siendo éstos los responsables del aumento de la dureza (Cheftel et al. 1989). Al incrementarse la concentración proteica, también lo hace la cantidad de minerales, y por lo tanto de calcio añadido, el cual favorece la agregación proteica, lo que está relacionado con un incremento del tamaño de los agregados (Hongsprabhas et al., 1999). Por el contrario, a pH 4, los geles caprinos forman una estructura más compacta y homogénea, con menos poros que a pH 7, tal como sucede con algunos de los geles ovinos de Díaz et al. (2006).

La microestructura del gel está relacionada con la CRA (Karleskind et al., 1995b), de manera que el agua drene fácilmente a través de los grandes poros de geles particulados (Chantrapornchai y McClements, 2002). Pero aún así existe una diferencia en el tamaño de los poros a ambos pHs, que corrobora los resultados de CRA obtenidos. Un gel proteico con grandes poros permite al agua que fluya

(Vardhanabhuti et al., 2001), por lo que no es de extrañar la alta cantidad de agua liberada de los geles caprinos a pH 7.

Según los cálculos teóricos llevados a cabo por Chantrapornchai y McClements (2002), la luminosidad de los geles se incrementa conforme aumenta el tamaño de partícula proteica, con lo que la mayor L^* de nuestros geles a pH 7 puede ir acompañado de un mayor tamaño de partícula que a pH 4.

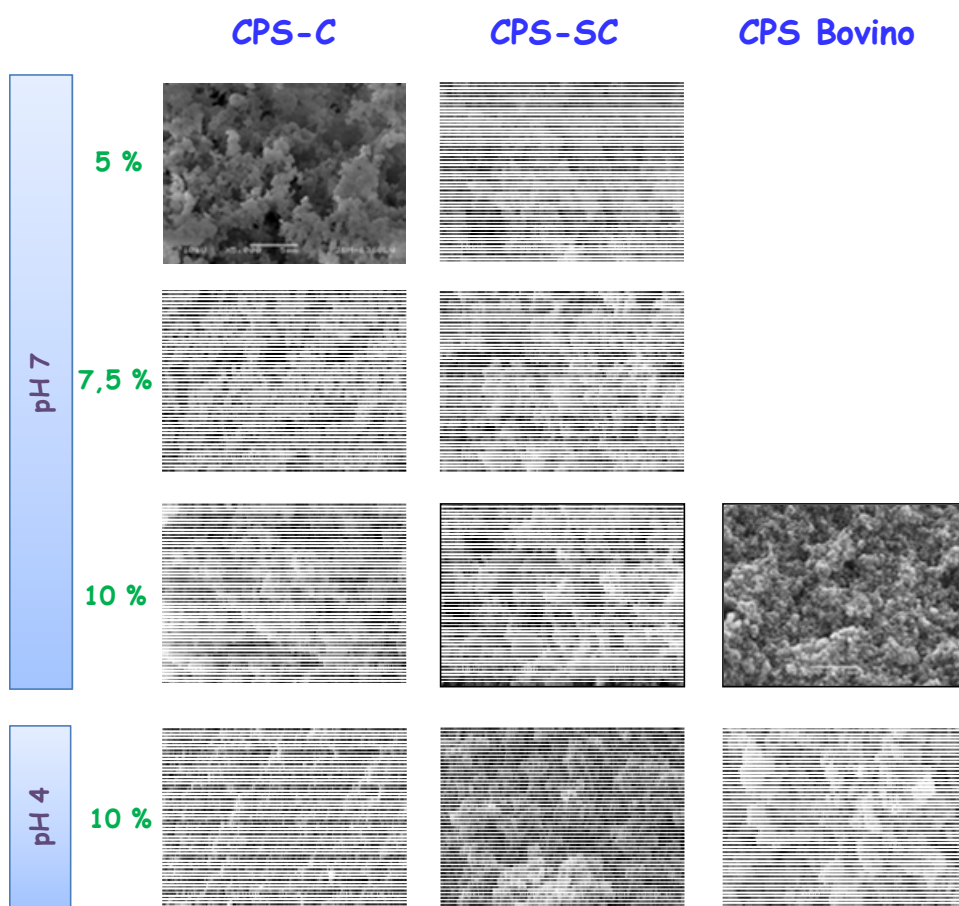


Figura 29: Micrografías de los geles mediante microscopio electrónico de barrido (5000 aumentos)

5. APLICACIONES

La industria alimentaria se beneficia en la elaboración de muchos alimentos de los CPS y otros productos de proteínas séricas, gracias a las buenas propiedades funcionales que éstos presentan.

Tras investigar la composición y propiedades de los diferentes productos de lactosuero caprinos estudiados, se observó que poseen una excelente solubilidad y buenas propiedades gelificantes y emulsionantes. De todas las aplicaciones posibles que describimos en la introducción, y, en función de los resultados de las propiedades funcionales de nuestros CPS, se tomó la decisión de elaborar dos tipos de alimentos:

- ☆ Geles ácidos (modelo de leche fermentada)
- ☆ Salsas

5.1. GELES ÁCIDOS

5.1.1. PRODUCTOS OBTENIDOS

Como señalamos en el apartado 2.8.1. de Material y Métodos, se prepararon diferentes geles ácidos basándose en el aumento del contenido de proteína de la leche a 3,3 y 4% a través de dos métodos diferentes:

1. Mediante evaporación de la leche

Se obtuvieron 4 tipos de productos:

- ✓ Leche de cabra evaporada hasta 3,3% (LC-3,3%) y 4% de proteína (LC- 4%).
- ✓ Leche de vaca evaporada hasta 3,3% (LV-3,3%) y 4% de proteína (LV- 4%).

Las 4 tipos de muestras gelificaron correctamente tras la adición de GDL.

2. Mediante fortificación de la leche con CPS

Se planteó la elaboración de 8 tipos de productos:

- ✓ Leche de cabra suplementada con CPS caprino clarificado hasta 3,3% (CPS-C-3,3%) y 4% de proteína (CPS-C-4%).
- ✓ Leche de cabra suplementada con CPS caprino no clarificado hasta 3,3% (CPS-SC-3,3%) y 4% (CPS-SC- 4%) de proteína y a igual cantidad de extracto seco que el CPS clarificado (CPS-SC (=E.S.)).
- ✓ Leche de cabra suplementada con CPS bovino hasta 3,3% (CPS Bovino-3,3%) y 4% (CPS Bovino-4%) de proteína y a igual cantidad de extracto seco que el CPS clarificado (CPS Bovino (= E.S.)).

Tanto las muestras con 3,3 % de proteína como las que contenían igual cantidad de extracto seco que los geles con CPS caprino clarificado con 3,3% de proteína gelificaron correctamente tras la adición de GDL.

Sin embargo, la leche de cabra suplementada con CPS caprino clarificado al 4% de proteína (CPS-C-4%) y la suplementada con CPS caprino no clarificado al 4% de proteína (CPS-SC-4%) gelificaron en el baño durante el tratamiento térmico previo a la acidificación con GDL (80°C durante 30 minutos). Como consecuencia de ello, se decidió no elaborar geles ácidos con fortificación que llevara al 4% de proteína ni con los CPS caprinos ni con el CPS bovino comercial.

Por este motivo, finalmente se elaboraron para su estudio 5 tipos de geles ácidos mediante fortificación (ver tablas 18 y 19 de composición química):

- ✘ Leche de cabra suplementada con CPS caprino clarificado con un contenido de 3,3% de proteína (CPS-C- 3,3%) y 10,5% de extracto seco.
- ✘ Leche de cabra suplementada con CPS caprino no clarificado con un 3,3% (CPS-SC- 3,3%) de proteína y con un 11,3% de extracto seco.
- ✘ Leche de cabra suplementada con CPS caprino no clarificado con igual cantidad de extracto seco que el CPS clarificado (CPS-SC (=ES)) y que correspondía a un 3,05% de proteína.
- ✘ Leche de cabra suplementada con CPS bovino con un 3,3% (CPS Bovino-3,3%) de proteína y con un 10,3% de extracto seco.
- ✘ Leche de cabra suplementada con CPS bovino con igual cantidad de extracto seco que el CPS clarificado (CPS Bovino (=ES)) y que correspondía a un 3,41% de proteína.

5.1.2. GELIFICACIÓN

El tiempo necesario para alcanzar un pH de 4,5-4,6, que normalmente marca el punto final de la fermentación en el yogur, es una indicación del tiempo de fermentación necesario (Tamime y Robinson, 2007). En nuestro caso, se consideró el valor de pH de 4,5 como el punto final de la acidificación.

Tras la adición de GDL a la leche, con o sin CPS, se anotó periódicamente el pH del producto hasta alcanzar el pH final deseado.

Resultados y Discusión

En las figuras 30 y 31 se representa el tiempo necesario para alcanzar el pH final de 4,5 y como va disminuyendo el pH conforme pasa el tiempo tanto para geles ácidos de leches evaporadas como para geles ácidos elaborados con leches fortificadas con CPS, respectivamente.

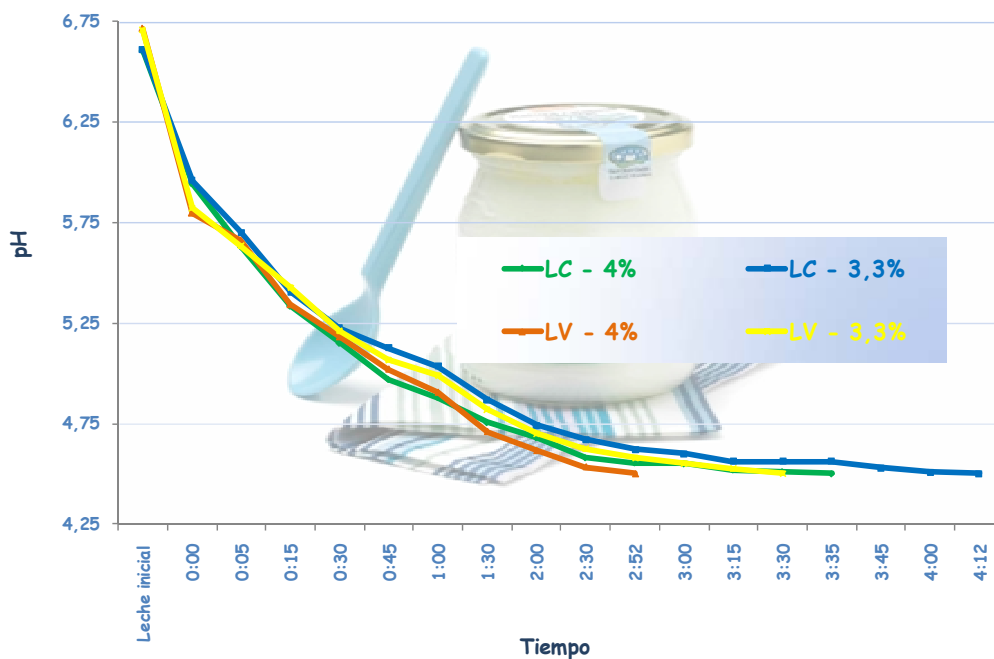


Figura 30: Tiempo (horas) vs pH en la elaboración de los geles ácidos de leche evaporada

(LC: Leche de cabra; LV: Leche de vaca)

Tras analizar los resultados obtenidos en conjunto, sobresale que la hidrólisis de GDL a ácido glucónico produce una reducción rápida del pH durante la primera hora y a continuación el pH decrece más gradualmente. Asimismo, se distingue claramente que los geles ácidos formados a partir de leche evaporada poseen, en general, tiempos para alcanzar el pH de 4,5 (tiempo de fermentación) menores que los elaborados con leches fortificadas. Los geles de leche evaporada de cabra necesitaron más tiempo para alcanzar el pH final que los de leche vaca. Dentro de la misma especie, en los que tenían un 4% de proteína se alcanzó antes el pH 4,5 que los que tenían 3,3% de proteína.

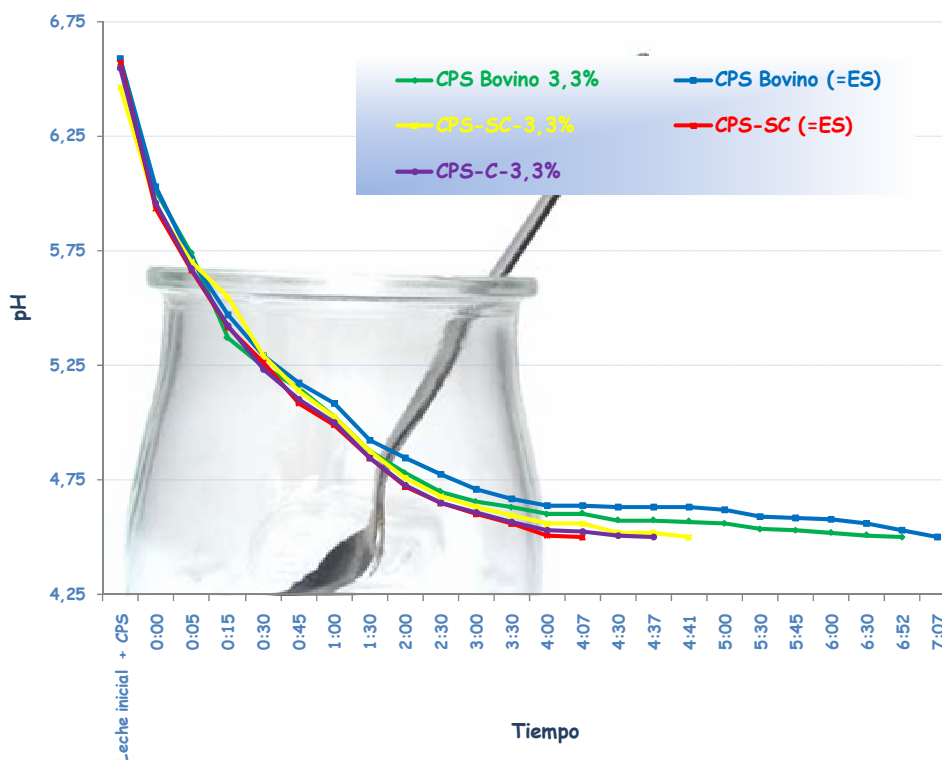


Figura 31: Tiempo (horas) versus pH en la elaboración de los geles ácidos de leches fortificadas con CPS

(CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados; CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; (=ES): a igual cantidad de extracto seco que el CPS-C)

En de los geles ácidos con leche fortificada se observa dos tendencias: los geles con CPS bovino tardan más tiempo en alcanzar el pH de 4,5 que los de origen caprino. En los geles con CPS caprino no clarificado y con el CPS bovino comercial, se observa que los que tenían mayor contenido proteico se incrementó el tiempo necesario para alcanzar el pH de 4,5 (al contrario de lo que sucedía en los geles con leche evaporada).

Respecto del mayor tiempo para alcanzar el pH 4,5 en la leche de cabra, se ha señalado que en la elaboración de yogur con leche caprina se puede producir una sobreacidificación durante la formación del yogur debido a la baja capacidad tampón de la leche de cabra (Martín-Diana et al., 2003); sin embargo, nuestros geles ácidos con leche evaporada de cabra tardan más tiempo en alcanzar el pH de 4,5 que los elaborados con leche de vaca evaporada.

Resultados y Discusión

Puvanenthiran et al. (2002) indican que la composición proteica es uno de los factores más determinantes en la duración de la fermentación bacteriana en yogures, de manera que un aumento de la capacidad tampón en yogures, cuando se altera la proporción entre las caseínas y las proteínas séricas, puede ser responsable de que el tiempo de fermentación observado sea mayor. Parece que la adición de proteínas séricas en el yogur aumenta la capacidad tampón a bajos pHs (Tamime y Robinson, 2007). Algunos autores (Puvanenthiran et al., 2002) señalan un incremento del tiempo de fermentación de yogures a medida que se eleva la proporción de proteínas séricas con la adición de CPS, mientras que otros trabajos destacan lo contrario en yogures (Amatayakul et al., 2006) o en geles ácidos (Lucey et al., 1999). En nuestro caso, la incorporación de CPS supone un aumento del tiempo de fermentación, con relación al de los geles ácidos que provienen únicamente de la leche evaporada. La mayor proporción de proteínas séricas en los geles ácidos con leche fortificada puede explicar estos resultados.

La adición de CPS bovino comercial supuso un mayor tiempo de fermentación que con la adición de nuestros CPS caprinos. Es posible que el tratamiento térmico al que se sometió a la mezcla de leche y CPS (85°C 30 minutos) cause una desnaturalización de las proteínas séricas del CPS caprino mientras que en el CPS bovino puede que cierta desnaturalización se haya ya producido durante la fabricación del CPS. La desnaturalización previa de las proteínas séricas puede influir en el tiempo de fermentación ya que puede modificar su unión a otras proteínas.

Se ha señalado que si se añade CPS a la leche, y a continuación se somete a un tratamiento térmico, se reduce el tiempo de gelificación y aumenta el pH de gelificación, pero si el CPS se agrega a la leche después del calentamiento, aumenta el tiempo de gelificación y disminuye el pH al que gelifica comparado con el primer caso (Lucey et al., 1999).

Como no fue posible determinar reológicamente el inicio de la gelificación, visualmente, y con la ayuda de una espátula, se comprobó cuándo y a qué valores de pH empiezan a gelificar las muestras acidificadas con GDL.

Para la mayoría de las leches (leches evaporadas de vaca y todas las leches fortificadas con CPS), la gelificación se inicia a los 15-30 minutos después de añadir la GDL, lo que se corresponde con valores de pH, en general, entre 5,52 y 5,19. El pH de gelificación obtenido experimentalmente por otros autores, para leche desnatada y previamente tratada térmicamente sin (Lucey et al., 1997a; 1998a,d; Bikker et al., 2000; Graveland-Bikker y Anema, 2003) o con adición de proteínas séricas (Bikker et

al., 2000; Graveland-Bikker y Anema, 2003) o CPS (Lucey et al., 1999; Cho et al., 1999) se encuentra en este rango. Por el contrario, es superior al de leches no calentadas previamente (Lucey et al., 1997a; 1998a,d, 1999; Bikker et al., 2000; Graveland-Bikker y Anema, 2003) o de leches tratadas térmicamente, pero con adición de leche en polvo desnatada (Cho et al., 1999). Se ha observado que el pH de gelificación a temperaturas de incubación de 42°C es mayor que a temperaturas de incubación menores 30°C (Lucey et al., 1998b). Nuestros resultados visuales confirman los resultados de otros autores (Cobos et al., 1995; Lucey et al., 1998b; Cho et al., 1999; Lucey et al., 1999) en relación a que la presencia de proteínas séricas desnaturalizadas es la responsable del aumento del pH de gelificación de leches acidificadas.

Por el contrario, la leche evaporada de cabra empieza a gelificar a los 30-45 minutos de la gelificación, a pH entre 5,23 y 4,97; por tanto, dicho pH es algo inferior al de las otras leches estudiadas.

5.1.3. PROPIEDADES REOLÓGICAS

Tras realizar el barrido de tensiones o *strees sweep* a una frecuencia constante (1 Hz), se llevó a cabo un barrido de frecuencias (*frequency sweep*) a una tensión constante de 3 Pa, seleccionada dentro de la región viscoelástica lineal. Esto nos permitió determinar los diferentes módulos dinámicos (G' , G'' y G^*) que caracterizan la viscoelasticidad del producto.

Los resultados obtenidos aparecen reflejados en las tablas 39 y 40.

Tabla 39: Módulo complejo (G^* , Pa) Módulo elástico (G' , Pa) y Módulo viscoso (G'' , Pa) (media \pm desviación estándar) de los geles ácidos obtenidos con leche evaporada (n=2) (frecuencia 0,2150 Hz, 3 Pa, 15°C)

		Leche de Cabra		Leche de Vaca	
Gel ácido sin CPS	3,3% PROTEÍNA	G^*	276,92 \pm 26,56	796,16 \pm 27,99	
		G'	266,78 \pm 25,49	767,49 \pm 26,42	
		G''	74,28 \pm 7,68	209,79 \pm 9,28	
	4% PROTEÍNA	G^*	281,86 \pm 28,86	832,29 \pm 42,05	
		G'	271,19 \pm 28,01	805,14 \pm 43,64	
		G''	76,82 \pm 7,07	210,16 \pm 0,93	

CPS: Concentrado de proteína séricas

Tabla 40: Módulo complejo (G^* , Pa) Módulo elástico (G' , Pa) y Módulo viscoso (G'' , Pa) (media \pm desviación estándar) de los geles ácidos con leche fortificada con adición de CPS (n=2) (frecuencia 0,2150 Hz, 3 Pa, 15°C)

		CPS-C	CPS-SC	CPS Bovino
Gel ácido con CPS	3,3% PROTEINA	G^*	1982,33 \pm 0,47	844,86 \pm 51,53
		G'	1921,33 \pm 1,89	816,11 \pm 47,22
		G''	487,55 \pm 5,25	214,59 \pm 18,09
	A igual E.S. que CPS-C	G^*	1476,75 \pm 62,58	1039,30 \pm 59,11
		G'	1430,75 \pm 59,75	1004,77 \pm 55,20
		G''	366,81 \pm 20,21	266,33 \pm 22,58

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados;
 CPS bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino; CPS: Concentrado de proteínas séricas; E.S.: Extracto Seco

Resultados y Discusión

Tanto G' como G'' se utilizan habitualmente para caracterizar tanto los yogures como los geles ácidos. En general, todas las muestras presentan una pauta común, pues el módulo elástico, G' , es siempre mayor al módulo viscoso, G'' , tal como señalan Lucey y Singh (1998) para geles ácidos lácteos. Esto es un reflejo del comportamiento viscoelástico de nuestros geles, de forma que las micelas se agregan formando una red con características principalmente elásticas, al igual que los geles térmicos de CPS previamente estudiados (véase apartado 4.4.). Además, este mayor valor de G' indica que la fuerza y el número de enlaces presentes en la red son suficientes para evitar que se rompan fácilmente tras la aplicación de una tensión (Lucey, 2001).

Es difícil comparar nuestros resultados con geles ácidos de otros autores (Arshad et al., 1993; Lucey et al., 1997a,b, 1998a, 1999; Cho et al., 1999; Lucey et al., 2000; Vlahopoulou et al., 2001; Anema et al., 2004; Anema, 2008), a raíz de las diferencias con el método de preparación aplicado (temperatura de incubación, cantidad de GDL añadida, tiempo y temperatura del tratamiento térmico empleado, cantidad de sólidos de la leche ...). Los geles ácidos formados con o sin la adición de 1% de CPS de Lucey et al. (1999) presentan una G' a 30°C inferior a la de nuestros geles ácidos, tanto los de leche evaporada, como a los que se les ha añadido CPS. Los geles ácidos formados con la adición 1,5% de grasa (Lucey et al., 1998a) presentan una G' a 30°C inferior a la de nuestros geles ácidos con adición de CPS, pero más similar, principalmente, a los que provienen de leche de vaca evaporada.

Las propiedades reológicas y físicas de los geles ácidos preparados con GDL difieren de los yogures producidos mediante fermentación bacteriana (Lucey et al., 1998b). Generalmente los yogures son más débiles (Lucey et al., 1998b; Vlahopoulou et al., 2001) y presentan una mayor separación del suero (Lucey et al., 1998b) que los geles acidificados químicamente, probablemente a causa de la actividad del cultivo iniciador (Vlahopoulou et al., 2001).

Si analizamos más detenidamente las tablas 39 y 40 se pueden destacar varios aspectos:

En primer lugar, dentro de los geles ácidos elaborados con leche evaporada, los geles de leche bovina concentrada son más firmes que los de leche de cabra, y en ambos, al aumentar el grado de evaporación, incrementándose de esta forma el contenido proteico, se forman geles algo más firmes.

En segundo lugar, la fortificación de la leche con CPS provoca la formación de geles ácidos más firmes que los que se elaboran con leche evaporada.

En tercer lugar, si tenemos en cuenta el origen del CPS añadido, el concentrado caprino ayuda a formar geles más fuertes que el producto bovino, tanto a igual concentración de proteína como de extracto seco.

En cuarto lugar, en función del método de elaboración utilizado en la preparación de los concentrados caprinos, se distingue que el CPS clarificado forma geles más fuertes, a igual cantidad de proteína y de extracto seco, que el CPS no clarificado.

Y en último lugar, en función del porcentaje de proteína presente, se advierte que al aumentar la cantidad de proteína con los CPS añadidos, se forman geles ácidos más firmes, al igual que sucedía en la leche evaporada al aumentar el grado de evaporación.

A continuación, intentaremos explicar los puntos señalados.

Nuestros geles ácidos de leche caprina son menos firmes, incluso a mayor o similar contenido de extracto seco, que los geles de leche bovina, tal como sucede en los geles ácidos de Vlahopoulou et al. (2001), o en los yogures de Martín-Diana et al. (2003).

Normalmente, los yogures se elaboran con leche bovina, mas la leche de otros mamíferos también es adecuada para la fermentación (Robinson, 2003). Aunque a la hora de elaborar yogures, la leche de cabra se procesa de igual manera que la leche de vaca (Park y Guo, 2006; Tamime y Robinson, 2007), el empleo de leche caprina para la elaboración de productos lácteos fermentados como el yogur tiene que enfrentarse al problema de que este tipo de leche produce coágulos semi-líquidos (Herrero y Requena, 2006), siendo más débiles y con menor consistencia y viscosidad que los yogures de vaca (Park y Guo, 2006). El contenido de caseínas junto con otras características, como la proporción de caseínas y el tamaño micelar, se cree que son los responsables de la débil estructura que presenta el yogur de cabra (Park et al., 2007).

La leche de cabra se caracteriza porque posee un bajo contenido de caseínas (Park et al., 2007), que es menor que en la leche de vaca (Park, 2006). Del mismo modo, la fracción de caseínas es también diferente, siendo la principal caseína presente en la leche de cabra la β -caseína (Jenness, 1980; Trujillo et al., 1997; Tziboula-Clarke, 2003; Park, 2006; Park et al., 2007), mientras que la α_{s1} -caseína es la proteína mayoritaria de la leche de vaca (Quiles y Hevia, 1994; Park, 2006). Por el contrario, la leche de cabra es pobre en α_{s1} -caseína (Jenness, 1980; Trujillo et al.,

Resultados y Discusión

1997; Tziboula-Clarke, 2003; Park, 2006), de forma que la fracción de caseínas α está representada primordialmente por la α_{s2} -caseína (Quiles y Hevia, 1997; Park, 2006), la cual se encuentra en menor proporción que la α_{s1} -caseína en la leche de vaca (Park, 2006). Las leches ricas en α_{s1} -caseína forman geles más fuertes tras la acidificación con GDL que leches con bajo contenido en esta proteína (Tziboula-Clarke, 2003).

Las micelas de caseína caprinas poseen mayor mineralización, se encuentran menos hidratadas, son menos estables al calor, pierden más fácilmente β -caseína (Park et al., 2007), presentan un grado de dispersión y un diámetro medio mayor (Trujillo et al., 1997), con respecto a las micelas bovinas. Por otra parte, la leche de cabra presenta una mayor proporción de glóbulos grasos de menor tamaño (Attaie y Ritcher, 2000; Park 2006).

El menor contenido de caseína de la leche de cabra, junto con una baja proporción o ausencia de la α_{s1} y el resto de diferencias señaladas, podrían conducir a que la leche se comporte de manera distinta durante el proceso de gelificación y formación del gel, y explicaría la diferencias encontradas entre los geles ácidos de cabra y de vaca (geles más débiles los de cabra).

Por estos motivos, para obtener un producto de leche fermentada aceptable de origen caprino es requisito indispensable aumentar el contenido de sólidos no grasos (Martín-Diana et al., 2003) mediante fortificación. Tal como se comentó en el capítulo anterior, las proteínas séricas de nuestros concentrados presentan excelentes propiedades gelificantes, ya que fueron capaces de formar geles viscoelásticos después de un tratamiento térmico. Partiendo de estas premisas, y teniendo en cuenta que la fortificación de la leche con CPS, previo al tratamiento térmico y a la acidificación, puede mejorar la textura y propiedades reológicas de los geles ácidos (Bikker et al., 2000; Graveland-Bikker y Anema, 2003), se suplementó la leche de cabra con diferentes CPS, observándose un aumento la firmeza de los geles ácidos obtenidos si se compara con los geles ácidos de leche evaporada.

En yogures a base de leche de cabra, al igual que en nuestros geles ácidos, la adición de CPS a leche aumentó la firmeza y dureza de los productos elaborados (Herrero y Requena, 2006). Incluso estos autores subrayan que se obtienen valores similares a los conseguidos para leche de vaca (Herrero y Requena, 2006).

Existen más autores que reconocen un efecto positivo del CPS, sobre todo tratado térmicamente (Lucey et al., 1999; Cho et al., 1999) en la viscosidad (Remeuf et al., 2003; Martín-Diana et al., 2003) y firmeza de yogures (Bhullar et al., 2002; Puvanenthiran et al., 2002; Martín-Diana et al., 2003; 2004a,b; Herrero y Requena,

2006; Aziznia et al., 2008) y en la firmeza de geles ácidos (Lucey et al., 1999; Cho et al., 1999). En geles acidificados con GDL tras la adición de diferentes productos, el módulo elástico G' permite clasificar sus propiedades de textura en este orden: leche en polvo desnatada < caseinatos de sodio < CPS (con tratamiento térmico) (Cho et al., 1999).

Hasta ahora hemos comprobado como la adición de CPS mejora la firmeza de los geles ácidos obtenidos, y este efecto es incluso mayor si se incrementa el nivel de proteína añadida, ya que un gel ácido se puede considerar una matriz proteica tridimensional que interactúa con otros constituyentes de la leche, como la grasa o minerales (Sodini et al., 2004), por lo que es trascendental, no sólo el contenido de sólidos de la leche, sino también el contenido proteico. Es difícil estudiar por separado el efecto del contenido de sólidos totales y de proteína, ya que ambas variables no se pueden modificar independientemente.

Un aumento del contenido de sólidos, tal como sucede en los geles ácidos procedentes de leche evaporada o en el gel ácido al que se le añadió CPS bovino con la misma cantidad de extracto seco que el CPS clarificado al 3,3% de proteína, va acompañado de un aumento de proteína añadida (véase tablas de composición 18 y 19 de geles ácidos en Material y Métodos) y de un valor mayor de G' . Parece que existe una correlación entre el contenido proteico de la leche y el módulo de almacenamiento (Allmere et al., 1999). De hecho, la viscosidad y/o consistencia del coágulo o yogur, que son características muy importantes en la elaboración del yogur, dependen del nivel de proteína presente en la leche de partida, con lo que la fortificación con sólidos no grasos es de vital importancia para estas características del yogur (Tamime y Robinson, 2007).

La adición de proteínas séricas, principalmente β -LG, (Bikker et al., 2000; Graveland-Bikker y Anema, 2003) mejora la G' de los geles ácidos. Si aumentamos la concentración de proteína sérica añadida, esto camina paralelo a un incremento de la β -LG, porque es la principal proteína presente en los CPS (véase tabla 27), y por lo tanto también aumentará el nivel de β -LG asociada a las micelas de caseína. Asimismo, un incremento de los puentes disulfuro entre las proteínas séricas desnaturalizadas y las micelas de caseína juegan un papel dominante en aumentar la G' de los geles ácidos preparados con leches calentadas (Lucey et al., 1998c). En nuestros geles ácidos, se observa que, al aumentar la concentración de proteína, tal como se señaló antes, mejora la firmeza de los geles obtenidos.

Resultados y Discusión

La adición de CPS o la evaporación no sólo aumenta el contenido proteico sino también el contenido graso. A pesar del efecto negativo que tienen los productos grasos en los consumidores, en el yogur, los lípidos favorecen la consistencia, mejoran la cremosidad, la sensación en la boca (Tamime y Robinson, 2007) y no sólo participan sino que también contribuyen en la estructura del gel o yogur (Lucey, 2002; Sodini et al., 2004).

Los yogures pueden contener porcentajes de grasa que alternan desde 0,1 a 10% (Tamime y Robinson, 2007), aunque el contenido de grasa generalmente varía entre 0,5-3,5% (Lucey y Singh, 1998), rango en que se encuentran nuestros geles.

Al incorporar los CPS caprinos, fundamentalmente el CPS no clarificado, a la leche de cabra para la producción de geles ácidos, se está añadiendo una cantidad de lípidos importante. Sin embargo, tras examinar el porcentaje graso que exhiben nuestros geles ácidos (véase tablas de Material y Métodos), vemos que oscila entre 1,76-2,14% para leches evaporadas y 1,54-2,53% para geles con adición de CPS, estando estos valores por debajo del contenido graso que se dispone en yogures tradicionales, con 3-4% de grasa láctea (Tamime y Robinson, 2007).

Los geles ácidos fortificados con CPS bovino, con CPS caprino clarificado y los evaporados a 3,3% de proteína presentan un contenido graso próximo al 1,5%, lo que se corresponde con una composición lipídica típica de un yogur con un contenido medio de grasa (1,5g/100g) (Tamime y Robinson, 2007), mientras que el resto de geles ácidos (2,02-2,53% de contenido lipídico) se encuentran entre los de contenido medio de grasa y los yogures tradicionales.

Se ha señalado que la firmeza del yogur (Aguilera y Kessler, 1989) aumenta con el incremento del contenido graso de la leche base; no obstante, también se ha escrito que cuanto mayor sea el porcentaje lipídico, más débil será el gel del yogur firme, porque los glóbulos grasos pueden interrumpir la red tridimensional formada (Walstra et al., 2006).

En nuestros geles ácidos de leche evaporada, un incremento del contenido proteico va acompañado de una mayor proporción de grasa, pero parece que no afecta a la dureza de los geles obtenidos a diferentes porcentajes de proteína. Las diferencias de firmeza encontradas son consecuencia del nivel de sólidos de la leche de partida, ya que un incremento de contenido de sólidos aumenta la G' de los geles ácidos, sin influir el contenido graso (Cobos et al., 1995).

Por el contrario, en los geles ácidos con adición de CPS caprino, la cantidad de lípidos parece que puede haber influido en la firmeza. Tal como se comentó en el capítulo de composición de los CPS, el CPS no clarificado posee un contenido lipídico de 53,18% ,superior al del CPS clarificado (5,91%), por lo que al añadir tanto la misma cantidad de sólidos como de proteína, implica la adición de más grasa cuando se utiliza el CPS no clarificado en la formulación de los geles ácidos (2,02-2,53% de contenido graso). Este mayor contenido graso puede haber contribuido, junto a otros factores, a la formación de geles más débiles que el de CPS clarificado caprino.

Un tratamiento térmico previo de la leche durante 30 minutos a 80°C, tanto con adición (Lucey et al., 1999) o no (Lucey et al., 1997a; 1999) previa de CPS, provoca un aumento en la G' de los geles ácidos formados, en relación a leches no calentadas con o sin adición de CPS. Lucey et al. (1997a, 1998c) comprobaron que este tipo de tratamiento provocaba la desnaturalización de más del 90% de las proteínas séricas presentes en la leche en polvo desnatada. Esta combinación de tiempo y temperatura fue la aplicada en este estudio, por lo parece que es suficiente para asegurar que las proteínas séricas se desnaturalicen y se asocien a las micelas de caseína.

A pesar de ello, una excesiva desnaturalización puede ser la causa de que la leche de cabra a la que se ha añadido 4% de proteína caprina gelifique incluso durante la aplicación del tratamiento térmico, sin necesidad de añadir GDL. El incremento del contenido de proteínas sérica añadida, junto con el hecho de que el tratamiento térmico aplicado es suficiente para desnaturalizar una gran cantidad de proteínas séricas, hace que se asocien a las caseínas y gelifiquen únicamente por calor; sin embargo, esto no ocurre con el CPS bovino.

Tal como se comentó en el capítulo sobre gelificación térmica de los CPS, un 5% de proteína es suficiente para que los concentrados caprinos formen geles, pero es imprescindible hacer uso de cantidades proteicas mayores en el caso del concentrado bovino. Al igual que sucede ahora, la adición de 4% de CPS bovino no es suficiente para desencadenar la gelificación mediante tratamiento térmico, sino que es necesario añadir GDL para producir la gelificación por acidificación.

En leches sin tratamiento térmico, la gelificación ocurre a pH próximo al pI (4,6) de las caseínas, mientras que las proteínas séricas nativas permanecen solubles, por lo que no juegan un papel importante en la estructura de geles ácidos sin tratamiento térmico (Graveland-Bikker y Anema, 2003), y el gel formado será el resultado de una agregación de micelas de caseínas, en las que las proteínas séricas "nativas" actúan únicamente como un relleno "inactivo" (Schorsch et al., 2001). De

Resultados y Discusión

hecho, la adición de más proteínas séricas nativas, mediante CPS antes del tratamiento térmico de la leche, tampoco contribuyen a la matriz del gel, porque se cree que actúan como un relleno inerte que tampoco se asocian a las micelas de caseína (Lucey et al., 1999).

En la formación de nuestros geles ácidos, el tratamiento térmico previo de la leche es una de las etapas fundamentales, lo que ayuda a mejorar la estructura del gel, formándose un gel más fuerte por los complejos formados entre las proteínas séricas y las caseínas (Schorsch et al., 2001), lo que demuestra cómo estas interacciones son importantes en la formación de la estructura del gel durante la subsiguiente acidificación (Lucey et al. 1998c).

También influye el tratamiento térmico a los que ha sido sometido el CPS. En este sentido, Cho et al. (1999) observaron, respecto de la influencia de la adición de CPS en las propiedades reológicas de geles ácidos, que, cuando se elaboran con CPS calentados (80°C 30 minutos), los valores del módulo de almacenamiento G' son superiores que cuando se elaboran con CPS sin calentar. Además encontraron que el calentamiento posterior a 80°C durante 30 minutos (como en nuestro caso) de la leche recombinada tanto con CPS calentado como sin calentar incrementó el valor de G' en ambos tipos de geles ácidos, pero el incremento fue superior en los geles elaborados con CPS calentado.

A pesar de ello, un alto grado de desnaturalización de las proteínas séricas tiene un efecto perjudicial en la estructura del gel formado, porque disminuye la firmeza (De Wit et al., 1986; Sodini et al., 2006), formándose un gel menos homogéneo por la presencia de agregados de proteína séricas previamente desnaturalizados (Schorsch et al., 2001).

Por estos motivos es importante conocer los tratamientos térmicos que han experimentado tanto la leche como el suero o los CPS, pues pueden influir en el gel formado.

En nuestro estudio, la leche era un producto comercial y pertenecía a la misma marca, por lo que se espera que haya sufrido un tratamiento térmico similar. Igualmente, el tratamiento térmico previo a la elaboración del gel ácido fue el mismo en todos los casos. Pero, por otro lado, como ya se comentó con anterioridad, se desconoce los procesos que ha experimentado el CPS bovino. Es posible que haya sufrido un tratamiento térmico durante su elaboración que provoque un alto grado de desnaturalización de las proteínas séricas que, como se ha mencionado, provoca una disminución de la firmeza de los geles (De Wit et al., 1986; Sodini et al., 2006) y de

ahí, el menor valor de G' en los geles elaborados con CPS bovino. Como se comentó anteriormente, las diferentes características de las proteínas bovinas y caprinas también podría explicar la menor consistencia de los geles elaborados con CPS bovino en relación a los que se añadió nuestros CPS caprinos.

5.1.4. SINÉRESIS

Uno de los defectos más comunes que aparece durante el almacenamiento de las leches fermentadas, como el yogur, es la separación del suero (Lucey, 2002) o sinéresis (Keogh y O'Kennedy, 1998), sobre todo en los yogures firmes que se fermentan en su envase comercial (Guzmán-González et al., 1999).

La sinéresis se define como la contracción del gel que conduce a la expulsión del líquido o la separación del suero (Li y Guo, 2006). Mientras que este fenómeno es una etapa fundamental en la fabricación quesera, la separación del suero es indeseable en los yogures (Lucey, 2001) porque supone una pérdida de atractivo del producto por parte del consumidor.

A nivel industrial, para prevenir la separación del suero se incrementa el contenido de sólidos totales de la leche, se somete a la leche a tratamiento térmico o se añaden estabilizadores (gelatina, pectina, almidón, gomas) (Lucey y Singh, 1998; Lucey et al., 2001; Lucey, 2002; Li y Guo, 2006).

En la tabla 41 se refleja la sinéresis de los geles ácidos elaborados medida como gramos de suero drenado por 100g del gel ácido tras la centrifugación de los geles.

A la vista de los resultados de la tabla 41, se distingue, por un lado, que los geles ácidos de la leche de cabra poseen una menor sinéresis que los de vaca y, por otro lado, que la fortificación con CPS reduce la pérdida de suero con relación a las leches evaporadas.

Un mayor contenido de sólidos o de proteína implica una reducción de la sinéresis. De igual manera, a igual concentración de proteína, los CPS caprinos provocan una mejor capacidad de retención del suero que el concentrado bovino.

La sinéresis de un yogur convencional de leche de cabra reconstituida con 12% de sólidos totales (Li y Guo, 2006) (parecido al de nuestro gel ácido de leche de cabra evaporada al 3,3%), fue de alrededor del 14%, muy similar al de nuestro gel ácido. Si se añade proteína sérica polimerizada se reduce un 25% la sinéresis, con valores del 10-11% (Li y Guo, 2006).

Tabla 41: Sinéresis (g suero /100g de gel) de los geles ácidos (n=2)

	Leche de Cabra	Leche de Vaca	
Geles ácidos sin adición de CPS	3,3 %	21,90 ± 0,32	CPS Bovino
	4 %	15,94 ± 3,24	
Geles ácidos con adición de CPS	CPS-C		CPS-SC
	3,3%	12,14 ± 2,92	11,27 ± 0,38
	Igual E.S. que CPS-C		13,09 ± 0,26
			12,40 ± 0,37

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados; CPS bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino; CPS: Concentrado de proteínas séricas; E.S.: Extracto Seco

La adición de diferentes CPS comerciales para fortificar la leche a 43-45g proteína/kg conduce a la formación de yogures con una sinéresis mayor (Guzmán-González et al., 1999; Sodini et al., 2005) o similar (Remeuf et al., 2003) a la de todos nuestros geles ácidos. Si se suplementa la leche de vaca con 3% de CPS 35 (Martín-Diana et al., 2004a) o la leche de cabra con 3 y 5% de CPS 35 (Martín-Diana et al., 2003), se forma un yogur con mayor sinéresis al de nuestros geles ácidos. La adición de concentrados de proteínas lácteas (Guzmán-González et al., 1999) o caseinatos (Guzmán-González et al., 2000) también provoca la formación de yogures con una sinéresis muy superior a la de todos nuestros geles ácidos.

Si relacionamos la sinéresis con los resultados reológicos, se observa que, en general, los geles más firmes (G' alta) son los que presentan una menor tendencia a exhibir separación del suero, tal como señala Lucey (2001). Así, los geles ácidos con un mayor contenido proteico presentan un mayor valor de G' y corresponde con una menor sinéresis. Igualmente, los geles ácidos de leches fortificadas con CPS muestran un mayor valor de G' y menor sinéresis que los elaborados con leche evaporada. Sin embargo, los geles ácidos de leche evaporada de cabra presentan una menor sinéresis y un menor valor de G' que los de leche concentrada de vaca. Este resultado guarda relación con lo señalado por Vargas et al. (2008), pues recogen que la adición de leche de cabra a la de vaca para elaborar yogures, disminuye la firmeza del gel, pero también su sinéresis.

La sinéresis decrece a medida que aumenta la concentración de proteína (Modler et al., 1983). Independientemente del método de fortificación aplicado, en nuestro estudio, un mayor contenido proteico va acompañado de una mejor retención de lactosuero de nuestros geles. Pero al tener en cuenta el método de fortificación llevado a cabo se reconoce que la adición de CPS es más efectiva que la concentración por evaporación en la reducción de la sinéresis.

La adición de CPS disminuye la sinéresis de los geles ácidos, tal como ocurre en yogures (Guzmán-González et al. 1999; Bhullar et al., 2002; Puvanenthiran et al., 2002; Remeuf et al., 2003; Haque y Ji, 2003; Hugunin, 2004; Martín-Diana et al., 2004a; Sodini et al., 2004; Aziznia et al., 2008), incluso en los formados con leche de cabra (Martín-Diana et al., 2003, 2004b). En general los yogures enriquecidos con CPS presentan una menor sinéresis que la de yogures con adición de otros productos lácteos, como leche desnatada en polvo (Aguilera y Kessler, 1989; Bhullar et al. 2002; Burrington, 2004a; Sodini et al., 2005), concentrados de proteínas lácteas (Guzmán-González et al., 1999) o caseinatos (Guzmán-González et al., 2000). Sin embargo

Resultados y Discusión

existen otros autores que señalan el efecto opuesto de la adición de CPS en la retención de suero de los yogures (Remeuf et al., 2003).

En el caso particular de la concentración por evaporación, el aumento del contenido de proteínas, principalmente caseínas, ayuda a reforzar la densidad de la matriz del gel y mejora la retención del suero del gel (Sodini et al., 2004), tal como se observa al aumentar con la evaporación, del 3,3% al 4% de proteína.

Los valores de sinéresis son mayores en los geles ácidos de leche evaporada que en los de leche enriquecida con CPS. Estos resultados sugieren que un aumento de la proporción proteínas séricas/caseínas en la leche eleva la retención de suero del yogur (Sodini et al., 2004). Al agregar CPS, estamos incrementado el nivel de proteínas séricas añadidas, mientras que la adición de leche en polvo o caseinatos o la evaporación implica la fortificación del nivel de caseínas, manteniendo o reduciendo la relación proteínas séricas /caseínas.

En estudios previos, se ha señalado que a medida que la relación entre caseínas y proteínas totales desciende, la red se vuelve más estructurada, las interacciones son más densas, y los poros más pequeños (Puvanenthiran et al., 2002), con lo que disminuye la sinéresis (Puvanenthiran et al., 2002; Amatayakul et al., 2006). En este sentido, la adición de CPS provoca que exista un alto nivel de interacciones (Remeuf et al., 2003) y la formación de una estructura más densa o compacta (Bhullar et al., 2002; Puvanenthiran et al., 2002; Aziznia et al., 2008), con poros más pequeños (Puvanenthiran et al., 2002), con lo que disminuye la sinéresis (Puvanenthiran et al., 2002). Por el contrario, los yogures que contienen suero en polvo o leche en polvo desnatada poseen más "vacíos" y espacios intersticiales (Bhullar et al., 2002).

La grasa no sólo participa en la estructura del gel sino que reduce la separación del suero en el yogur (Sodini et al., 2004). Además, hay que tener en cuenta que, en la elaboración del yogur se utiliza la homogenización, la cual ayuda a reducir la sinéresis como consecuencia de la interacción de proteínas con la membrana del glóbulo de grasa (Tamime y Robinson, 2007). Este mayor contenido de grasa podría explicar las ligeras diferencias entre los geles ácidos con adición de CPS caprino al 3,3% de proteína. El gel ácido con CPS no clarificado posee un contenido lipídico mayor junto con una menor sinéresis comparado con el gel ácido con CPS clarificado a igual concentración de proteína.

5.1.5. COLOR

La aceptación de un producto por parte del consumidor depende de los atributos sensoriales que éste exhiba. De todos ellos, el color es, habitualmente, la primera característica sensorial que percibe el consumidor, por lo que es imprescindible evaluar las coordenadas de color de los geles ácidos elaborados.

Las tablas 42, 43, 44 Y 45 reflejan los resultados obtenidos para los parámetros de color (CIE $L^*a^*b^*$) medidos sobre fondo blanco y sobre fondo negro de los geles ácidos de leches evaporadas y de los elaborados con leches fortificadas con CPS.

Al igual que los geles térmicos preparados a partir de soluciones de CPS (véase capítulo anterior), la determinación de las coordenadas de color se realizó sobre fondo blanco y sobre fondo negro, siendo los resultados obtenidos bastante similares independientemente del fondo.

La luminosidad de los yogures elaborados con 100% de leche de cabra (Vargas et al., 2008), con leche de vaca, suplementado o no con CPS (Martín-Diana et al., 2004a), es superior a la de todos nuestros geles ácidos, con o sin adición de concentrados. Por el contrario, los valores de a^* y b^* que presentan los productos de Martín-Diana et al. (2004a) suelen ser inferiores y superiores respectivamente a los de nuestros geles ácidos.

Si comparamos las coordenadas de color con la de los yogures fortificados con suero en polvo en el día 1 de almacenamiento (González-Martínez et al., 2002), se observa que nuestros geles ácidos poseen un valor de L^* , en general, superior.

La luminosidad (89,56) y la coordenada b^* (7,93) de los yogures fortificados con 19g/l de CPS y una maduración de toda la noche a 4°C (Needs et al. 2000) son ligeramente superiores a los de nuestros geles, mientras que la a^* (-1,70) posee unos valores similares. Hay que tener en cuenta que Martín-Diana et al. (2004a) y Needs et al. (2000) realizaron las medidas con un colorímetro Hunter, lo que puede dar resultados diferentes que CIE Lab.

Tabla 42: Coordenadas de color (CIE L*a*b*) (media ± desviación estándar) de los geles ácidos obtenidos a partir de leche evaporada (n=2) (Fondo blanco)

		Leche de Cabra		Leche de Vaca	
Gel ácido sin CPS (Fondo blanco)	3,3 % PROTEÍNA	L*	69,89 ± 8,26	67,61 ± 8,12	
		a*	-1,74 ± 0,36	-1,56 ± 0,35	
		b*	6,08 ± 0,78	7,19 ± 0,28	
	4 % PROTEÍNA	L*	62,35 ± 0,85	66,72 ± 3,24	
		a*	-1,27 ± 0,17	-1,09 ± 0,23	
		b*	6,17 ± 0,19	7,74 ± 0,02	

CPS: Concentrado de proteína séricas

Tabla 43: Coordenadas de color (CIE L*a*b*) (media ± desviación estándar) de los geles ácidos obtenidos a partir de leche evaporada (n=2) (Fondo negro)

		Leche de Cabra		Leche de Vaca	
Gel ácido sin CPS (Fondo negro)	3,3 % PROTEÍNA	L*	68,17 ± 7,62	64,57 ± 7,88	
		a*	-1,70 ± 0,28	-1,60 ± 0,33	
		b*	5,82 ± 0,66	6,99 ± 0,40	
4 % PROTEÍNA		L*	60,88 ± 4,99	65,50 ± 0,88	
		a*	-1,33 ± 0,20	-1,10 ± 0,14	
		b*	6,19 ± 0,25	7,64 ± 0,05	

CPS: Concentrado de proteína séricas

Tabla 44: Coordenadas de color (CIE L*a*b*) (media ± desviación estándar) de los geles ácidos con leche fortificada mediante adición de CPS (n=2) (Fondo blanco)											
Gel ácido con adición de CPS (Fondo blanco)	3,3% PROTEÍNA	CPS-C			CPS-SC			CPS Bovino			
		L*	a*	b*	media	±	media	±	media	±	
A igual E.S. que CPS-C	3,3% PROTEÍNA	L*	75,37	±	5,34	75,85	±	3,61	65,86	±	5,98
		a*	-1,83	±	0,04	-1,74	±	0,01	-1,47	±	0,08
		b*	5,95	±	0,42	5,87	±	0,31	5,88	±	0,02
A igual E.S. que CPS-C	3,3% PROTEÍNA	L*				66,34	±	3,90	73,31	±	2,37
		a*				-1,60	±	0,05	-1,48	±	0,03
		b*				5,48	±	0,04	6,27	±	0,04

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados; CPS bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino; CPS: Concentrado de proteínas séricas; E.S.: Extracto Seco

Tabla 45: Coordenadas de color (CIE L*a*b*) (media ± desviación estándar) de los geles ácidos con leche fortificada mediante adición de CPS (n=2) (Fondo negro)

Gel ácido con adición de CPS (Fondo negro)		CPS-C	CPS-SC	CPS Bovino
3,3% PROTEINA	L*	74,39 ± 5,04	75,35 ± 3,88	65,12 ± 4,48
	a*	-1,84 ± 0,03	-1,75 ± 0,01	-1,48 ± 0,05
	b*	5,92 ± 0,19	5,77 ± 0,30	5,81 ± 0,16
A igual E.S que CPS-C.	L*		64,26 ± 0,23	73,11 ± 0,32
	a*		-1,61 ± 0,03	-1,51 ± 0,17
	b*		5,41 ± 0,05	6,26 ± 0,18

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados; CPS bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino; CPS: Concentrado de proteínas séricas; E.S.: Extracto Seco

Resultados y Discusión

En los resultados de color en leches evaporadas no hay diferencias importantes entre los geles ácidos elaborados con leche de vaca y de cabra excepto que los de vaca presentan unos mayores valores de b^* (más amarillo). La ausencia de β -caroteno en la leche de cabra junto con su elevada proporción de glóbulos grasos y su diferente proporción de caseínas, tal como se comentó en la introducción, pueden explicar las diferencias con yogures de leche de vaca de otros autores y entre nuestros geles ácidos de cabra y vaca.

La adición de CPS a yogures tampoco provoca cambios de color aparentes (Martín-Diana et al., 2004a), aunque otros autores (González-Martínez et al., 2002), en yogures con diferentes proporciones de suero en polvo/leche en polvo desnatados, y tras evaluar el color a diferentes días durante su almacenamiento, observaron que las muestras con suero en polvo presentan un color más estable y más homogéneo (González-Martínez et al., 2002).

En nuestro caso, se puede observar como los geles ácidos de leche fortificada con CPS caprinos muestran unos valores mayores de luminosidad que los fortificados con CPS bovino y que los elaborados con leche evaporada. Como se señaló en los geles térmicos, un alto valor de L^* indica que la luz se refleja, lo que puede relacionarse con una red mejor estructurada. Esta mayor luminosidad también se correlaciona, como en geles térmicos, con G^* y G' , ya que los geles ácidos de leche fortificada con CPS caprinos presentaban los mayores valores de los módulos G^* y G' . También se puede señalar en los geles con CPS, que un mayor contenido de proteína conlleva una elevación de G^* y G' y paralelamente, de la luminosidad y del valor de b^* .

5.2. SALSAS

Las salsas o aliños son aderezos alimentarios que se caracterizan porque su estructura consiste en una emulsión. Para evitar la separación de ambas fases y la desestabilización de la emulsión, es necesario hacer uso de agentes emulsificantes. Una de las propiedades funcionales que define a las proteínas séricas es su capacidad de formar y estabilizar emulsiones, tal como señalamos en la introducción. En nuestro trabajo se cumple esta pauta, pues los CPS y los agregados caprinos estudiados se caracterizan por sus buenas propiedades emulsionantes.

A raíz de ello, decidimos preparar salsas con diferentes concentraciones de proteína porque es conocido la utilización, por sus buenas propiedades emulsionantes, de las proteínas séricas en salsas, aliños para ensaladas o salsa tipo mayonesa (Thompson y Reniers, 1982; Turgeon et al., 1996; Charles et al., 2000; Christiansen

et al., 2004; Ofstad et al., 2005; Liu et al., 2007) pero, en ningún caso, con CPS de origen caprino.

Tras evaluar las propiedades emulsionantes de nuestros CPS (véase apartado 4.3. de Resultados y Discusión) con 2% de proteína según el método de Bradford, se optó por probar concentraciones menores para preparar las salsas. En primer lugar, se observó que un 1% de proteína era suficiente, no sólo para formar emulsiones, sino también para que fueran estables; por ello se decidió reducir a la mitad la concentración proteica empleada, lo cual también tuvo resultados positivos.

Por estos motivos, hemos evaluado la formación de salsas con 0,5 y 1% de agente emulsionante. Asimismo, para poder comparar nuestros resultados se hizo uso de ovoalbúmina, que es la principal proteína de la clara del huevo.

5.2.1. TIPO EMULSIÓN y pH

En primer lugar, estudiamos el tipo de emulsión (O/W o W/O) de nuestras salsas. En general, las salsas, aliños o mayonesas son emulsiones tipo O/W (Charles et al., 2000); así, la mayoría de nuestras salsas son emulsiones O/W donde la fase dispersa consiste en gotas pequeñas de un líquido de naturaleza oleosa, por lo tanto hidrófobo, inmersas o suspendidas en una fase continua acuosa (Dalgleish, 2004; Muñoz et al., 2007). Estas salsas son emulsiones O/W, como la leche, mayonesa, nata... (Dalgleish, 2004; Muñoz et al., 2007). En nuestras salsas, la fase dispersa es el aceite, la fase acuosa es el vinagre, el agua y el resto de ingredientes (sal, azúcares y especias), y el agente emulsionante son los diferentes CPS empleados. No obstante, las salsas formuladas con 1% de proteína de agregados suponen una excepción ya que poseen una naturaleza distinta; son del tipo W/O, donde la fase dispersa es de naturaleza acuosa y la continua oleosa, tal como, la mantequilla, margarina, cremas de protección solar... (Dalgleish, 2004; Muñoz et al., 2007). En concreto, en esta salsa parece que domina la parte apolar del emulsionante aplicado, lo que hace que se disuelva más fácilmente en un medio graso y, como consecuencia, es más útil en la formación de emulsiones W/O (Muñoz et al., 2007). Hay que tener en cuenta que, debido al bajo contenido proteico de los agregados, para llegar a 1% de proteína es necesario añadir 18,69 g de polvo por 100g de producto, lo que aporta también una alta cantidad de lípidos a la salsa.

La formulación utilizada en nuestras salsas recuerda a la de la mayonesa, que se prepara mezclando aceite vegetal, huevo, vinagre, sal y otras especias (Belitz et al., 2009). Es una emulsión tipo aceite en agua (Depree y Savage, 2001; Belitz et al.,

Resultados y Discusión

2009), a pesar de que se caracteriza por su alto contenido de aceite (50-85% del peso) (Belitz et al., 2009). Igual sucede con nuestras salsas, que en su formulación contenían un 62% de aceite de girasol.

El aceite de la fase dispersa está en estado líquido a la temperatura a la que se elabora la salsa o la que se suele consumir, por lo que tiene poco efecto en el comportamiento de la emulsión, porque actúa principalmente como un relleno. Por supuesto, se puede producir la coalescencia de las gotas de grasa si éstas se desestabilizan y la película proteica es débil, pero, aparte de estas premisas, apenas tienen significado estructural (Dalglish, 2004; 2006).

Independientemente del tipo de emulsión de nuestras salsas, la fase acuosa no consiste solo de agua, sino que es una mezcla de varios productos de naturaleza hidrofílica: sal, azúcar, vinagre y especias. El vinagre, la sal y las especias contribuyen al sabor, aunque el vinagre también se aprovecha para evitar el crecimiento y desarrollo de microorganismos, y la sal como conservante (O'Brien, 2009). El vinagre provoca la disminución del pH de las salsas, tal como se refleja en la tabla 46. En dicha tabla se recoge el pH de las muestras, el día que se hacen (día 0), al día siguiente y una semana después de su conservación en refrigeración.

Tabla 46: pH de las salsas, el día que se hacen, al día siguiente y una semana después de su conservación en refrigeración

		CPS-C	CPS-SC	Agreg.	CPS Bovino	Ovo.
0,5% Proteína	Día 0	3,66	3,75	4,91	3,90	3,92
	Día siguiente	3,67	3,74	4,91	3,87	3,90
	Semana siguiente	3,67	3,76	4,95	3,87	3,91
1% Proteína	Día 0	3,78	3,88	5,10	4,17	4,10
	Día siguiente	3,79	3,83	5,03	4,13	4,12
	Semana siguiente	3,82	3,85	5,10	4,11	4,14

(CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificado, CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificado; Agreg.: Agregados en polvo; CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino; Ovo.:Ovoalbúmina)

La mayoría presenta un pH próximo a 4, siendo más ácidas cuanto menos proteína se añade. Las salsas con agregados poseen un pH más elevado, y cercano a 5, lo cual puede relacionarse con la mayor cantidad de producto que fue necesario añadir para alcanzar el contenido de proteína deseado, aunque también puede influir un mayor efecto tampón de los agregados. Las salsas con CPS caprinos presentan un pH menor que las elaboradas con CPS bovino y ovoalbúmina. En el capítulo anterior observamos que los geles ácidos elaborados con CPS bovino tardaban más en acidificarse. Por tanto, se confirma un mayor efecto tampón del CPS bovino que de nuestros CPS caprinos, lo cual puede deberse a las distintas propiedades de las proteínas o de otros componentes o al proceso de elaboración de los CPS (mayor desnaturalización proteica en la obtención del CPS bovino).

Independientemente de la muestra, el pH aumenta conforme se incrementa la cantidad de proteína añadida, siendo claramente mayor con 1% de proteína frente a las de 0,5% proteína. Si tenemos en cuenta el tiempo de almacenamiento en refrigeración, el pH permanece bastante estable tras 1 semana.

5.2.1. PROPIEDADES REOLÓGICAS

La mayoría de salsas y aliños exhiben un comportamiento viscoelástico (Ford et al., 2004) y, tras la elaboración de nuestras salsas, se comprobó que poseen una viscosidad suficiente que permite la evaluación de sus propiedades reológicas a través de la reología oscilatoria.

Tras la aplicación de diferentes barridos de tensión (stress sweep) a la frecuencia de 0,1 Hz para determinar la zona de comportamiento viscoelástica lineal de nuestras muestras, se realizaron barridos de frecuencias (frequency sweep) a una tensión de 0,5 Pa.

Las figuras 32, 33, 34 y 35 nos descubren como varía el módulo elástico (G') y el viscoso (G'') con la frecuencia para las salsas con 1% de proteína al día y a la semana siguiente de su elaboración, respectivamente, tras su conservación en refrigeración. En el caso de las salsas, con 0,5% de proteína, se observa una tendencia muy similar, por esos motivos, no se muestran las figuras.

Resultados y Discusión

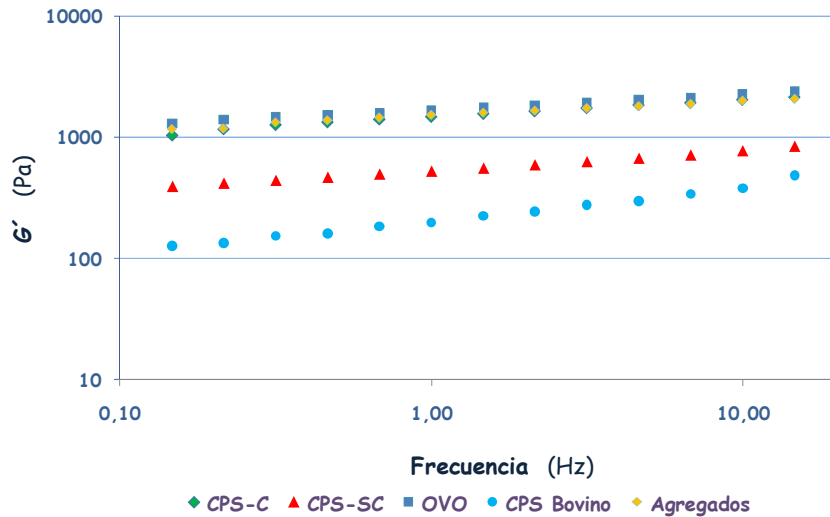


Figura 32: Evolución de G' (Pa) a la frecuencia aplicada a las salsas con 1% de proteína al día siguiente de su elaboración

(CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificado, CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificado; OVO: Ovoalbúmina; CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino; Agregados: Agregados en polvo)

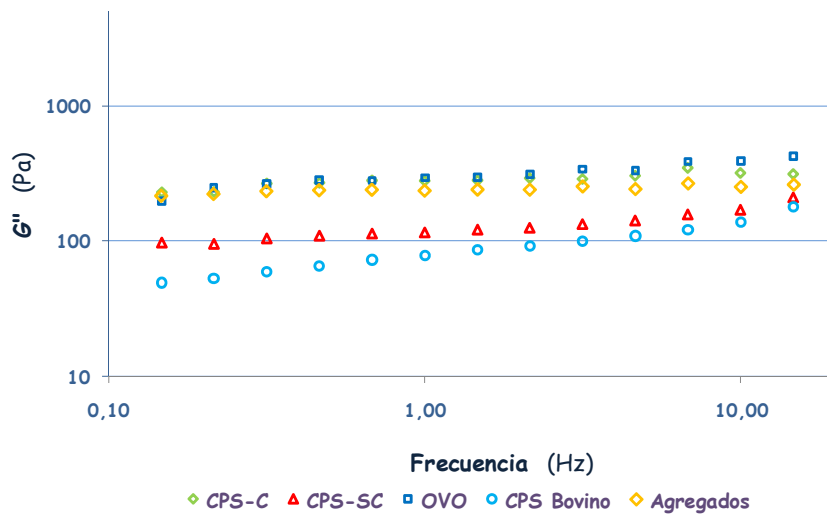


Figura 33: Evolución de G'' (Pa) a la frecuencia aplicada a las salsas con 1% de proteína al día siguiente de su elaboración

(CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificado, CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificado; OVO: Ovoalbúmina; CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino; Agregados: Agregados en polvo)

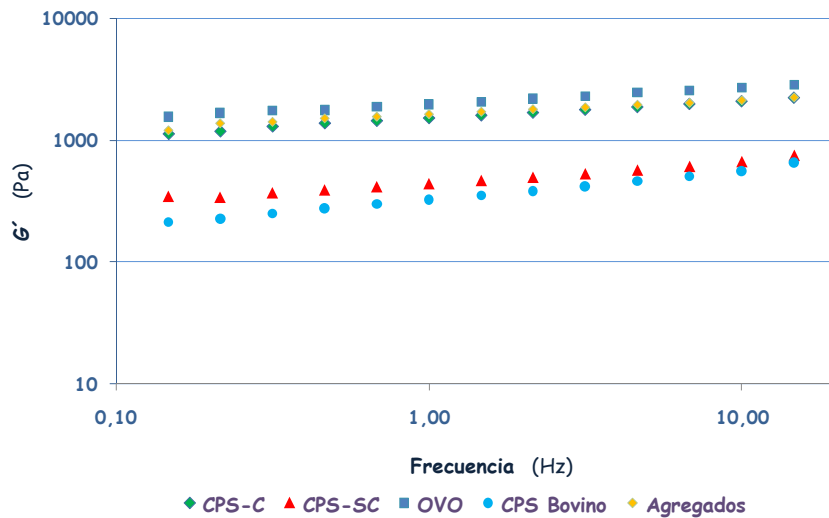


Figura 34: Evolución de G' (Pa) a la frecuencia aplicada a las salsas con 1% de proteína a la semana siguiente de su elaboración

(CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificado, CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificado; Ovo: Ovoalbúmina; CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino; Agregados: Agregados en polvo)

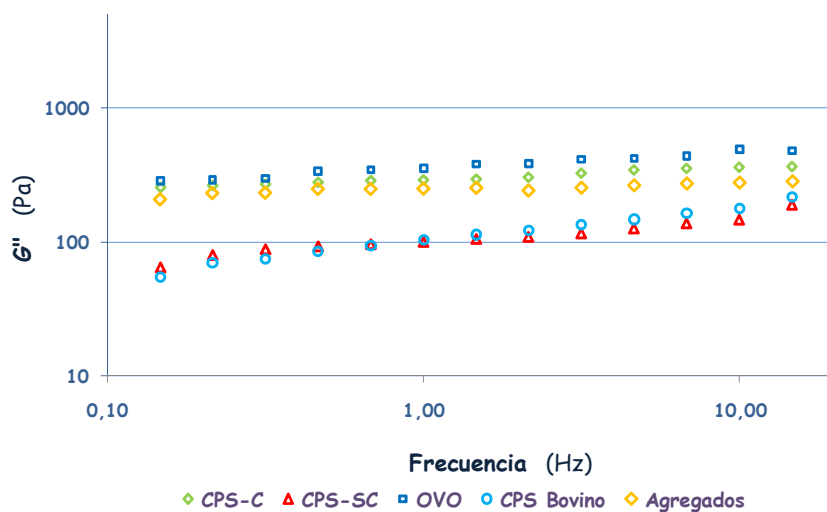


Figura 35: Evolución de G'' (Pa) a la frecuencia aplicada a las salsas con 1% de proteína a la semana siguiente de su elaboración

(CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificado, CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificado; Ovo: Ovoalbúmina; CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino; Agregados: Agregados en polvo)

Resultados y Discusión

Las emulsiones, tanto al día siguiente como tras una semana de almacenamiento, exhiben un comportamiento tipo sólido o tipo gel predominantemente elástico, como demuestra que todos los valores del módulo elástico sean superiores a los del módulo viscoso en todo el rango de frecuencias evaluadas.

El hecho de que G' sea mayor que G'' es un comportamiento habitual que también se produce en otros aliños o aderezos de ensalada formulados con péptidos de proteínas séricas o CPS tratados térmicamente (Turgeon et al., 1996), con yema de huevo con o sin otros emulsificantes (Riscardo et al., 2005; Martínez et al., 2007), con caseinato de sodio (Riscardo et al., 2003) con almidón y goma xantana (Dolz et al., 2006), con proteína de soja y mezclas de dextrano y APS (Diftis et al., 2005), en mayonesas (Liu et al., 2007; Maruyama et al., 2007) o en emulsiones estabilizadas con yema de huevo (Moros et al., 2002). Algunas de las salsas elaboradas por Christiansen et al. (2004) con hidrolizados de proteínas séricas o con β -LG también formaron emulsiones tipo gel. En general, emulsiones, como las mayonesas, con un alto contenido graso muestran altos valores de G' , y un comportamiento más tipo gel que las de menor concentración grasa (Ma y Barbosa-Cánovas, 1995).

También se puede distinguir que G'' y que G' tienen una baja dependencia de la frecuencia, lo que indica, como se señaló en los geles térmicos, la presencia de una red bien estructurada dentro de las frecuencias aplicadas. Este comportamiento es típico de emulsiones estabilizadas por proteínas en la que se desarrolla una red elástica. Bengoechea et al. (2008) indicaron que cuando sucede esto en emulsiones concentradas evidencia el desarrollo de una estructuración que favorece la estabilidad de la emulsión.

Las tablas 47 y 48 muestran los valores de G^* , G' y G'' al día y a la semana siguiente de su elaboración, respectivamente, tras su conservación en refrigeración.

A diferencia de nuestras salsas, Turgeon et al. (1996) con CPS 35% sólo fueron capaces de preparar aliños con 0,5-1% de proteína con una consistencia muy pobre, que eran imposibles de medir reológicamente. Sin embargo, las preparadas con CPS tratado térmicamente o fracciones peptídicas de proteína séricas a distintas concentraciones, presentan valores similares a los módulos dinámicos de nuestras salsas.

Tabla 47: Módulo elástico (G' , Pa), Módulo viscoso (G'' , Pa), y Módulo complejo (G^* , Pa), (media \pm desviación estándar) de los salsas con adición de los productos en polvo obtenidos del suero caprino, del concentrado de proteínas séricas bovino y de ovoalbúmina (n=2) al día siguiente de la elaboración (frecuencia 1 Hz, 0,5 Pa, 15°C)

	CPS-C	CPS-SC	Agregados	CPS Bovino	Ovoalbúmina	
Proteína 0,5%	G^*	1074,71 \pm 72,82	361,26 \pm 7,67	338,56 \pm 25,37	192,80 \pm 1,37	1456,80 \pm 36,49
	G'	1051,01 \pm 73,81	345,20 \pm 0,38	329,18 \pm 25,53	179,74 \pm 1,24	1437,48 \pm 36,38
	G''	223,73 \pm 3,61	88,83 \pm 2,09	78,78 \pm 1,99	69,74 \pm 0,36	236,54 \pm 2,92
Proteína 1%	G^*	1505,13 \pm 12,90	536,49 \pm 49,91	1552,50 \pm 73,54	212,47 \pm 22,04	1749,25 \pm 88,74
	G'	1478,63 \pm 12,20	523,80 \pm 49,36	1534,04 \pm 73,83	197,12 \pm 23,81	1722,75 \pm 85,21
	G''	280,82 \pm 4,89	115,71 \pm 7,90	237,16 \pm 4,19	78,52 \pm 0,18	304,06 \pm 26,46

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados;

CPS bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino; Agregados: Agregados en polvo

Tabla 48: Módulo elástico (G' , Pa), Módulo viscoso (G'' , Pa), y Módulo complejo (G^* , Pa), (media \pm desviación estándar) de los salsas con adición de los productos en polvo obtenidos del suero caprino, del concentrado de proteínas séricas bovino y de ovalbúmina ($n=2$) a la semana siguiente de la elaboración (frecuencia 1 Hz, 0,5 Pa, 15°C)

		CPS-C	CPS-SC	Agregados	CPS Bovino	Ovalbúmina
0,5% Proteína	G^*	1080,82 \pm 41,04	388,48 \pm 7,46	497,66 \pm 0,34	332,00 \pm 7,27	1577,78 \pm 3,70
	G'	1056,73 \pm 40,45	376,08 \pm 7,05	488,10 \pm 0,35	318,69 \pm 6,72	1556,77 \pm 4,86
	G''	225,59 \pm 6,59	97,25 \pm 2,53	96,94 \pm 0,11	92,78 \pm 3,18	257,29 \pm 6,94
1% Proteína	G^*	1538,50 \pm 6,84	450,29 \pm 8,29	1654,58 \pm 65,30	339,14 \pm 21,84	1910,33 \pm 82,97
	G'	1510,92 \pm 7,19	439,14 \pm 7,58	1635,53 \pm 64,66	322,94 \pm 18,44	1880,50 \pm 75,66
	G''	288,74 \pm 0,15	99,47 \pm 4,14	250,29 \pm 8,75	103,20 \pm 14,13	334,82 \pm 51,88

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados;
 CPS bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino; Agregados: Agregados en polvo

Los valores del módulo complejo a frecuencia de 1 Hz de las diferentes salsas preparadas por Christiansen et al. (2004), con CPS 80%, β -LG o hidrolizados de proteínas séricas, a 2-4% de proteína, son menores a los de nuestras salsas, aunque hay que tener en cuenta que estos autores se valieron de un microfluidizador para realizar las emulsiones.

En general, nuestras salsas poseen módulos dinámicos con valores altos. La cantidad de aceite añadido para su formulación es elevada, tal como en mayonesas, y puede ser en parte responsable de estos resultados, ya que a medida que se incrementa la cantidad de aceite añadido, se obtienen emulsiones con valores de los módulos dinámicos mayores (Franco et al., 1997; Moros et al., 2002).

En las mayonesas, debido al alto volumen de la fase dispersa, las gotas entran en contacto más cercano unas con otras, y su forma esférica original se puede ver deformada, pero la película debe ser fuerte para evitar la coalescencia (Ford et al., 2004). Estos factores son los responsables de viscosidad de las mayonesas (Depree y Savage, 2001), y quizás también de nuestras salsas.

Este empaquetamiento compacto de las gotas de de grasa en la red pueden ser también la causa del carácter elástico y la resistencia a la deformación de las emulsiones preparadas (Liu et al., 2007).

Si comparamos todas las salsas, se observa que la ovoalbúmina es la que forma los productos con valores de G' mayores, tanto a 0,5% de proteína como a 1% de proteína; no obstante, las salsas preparadas con CPS caprinos clarificados a ambos valores de proteína evaluados y las elaboradas con agregados con 1% de proteína presentaron valores cercanos a los de las salsas con ovoalbúmina con el mismo porcentaje de proteína.

También se puede señalar que las salsas preparadas con los tres productos caprinos estudiados son capaces de formar salsas con valores de G' superiores al del CPS bovino a ambos valores de proteína evaluados. Pero, dentro de los productos caprinos, el CPS clarificado es más firme que el resto de ellos al 0,5% de proteína, y al 1% tanto el CPS clarificado como los agregados presentan valores de G' similares y bastante superiores al CPS no clarificado.

Al comparar los resultados en función del porcentaje de proteína añadida, se observa que, al aumentar el contenido proteico o de emulgente, se obtienen salsas más firmes (G' mayor) principalmente los agregados. Se ha señalado que las emulsiones más concentradas exhiben valores mayores del módulo de almacenamiento (G') y del

Resultados y Discusión

módulo de pérdida (G'') (Moros et al., 2002). Igualmente Turgeon et al. (1996) observaron un aumento de la viscosidad compleja de las emulsiones al aumentar el nivel de proteína incorporado, lo que indica que puede ser consecuencia de una mayor inmovilización del agua por los péptidos adsorbidos.

Uno de los factores, aparte del contenido graso y de proteína, que también puede haber influido en las salsas formuladas es la cantidad de sales, tanto la sal común añadida como las sales originalmente presentes en los diferentes productos en polvo empleados.

La adición de sales en diferentes aliños con yema de huevo y otros agentes emulsionantes provoca el incremento de los parámetros viscoelásticos y de la estabilidad de la emulsión (Martínez et al., 2007). Un aumento del contenido de proteína de 0,5 a 1%, suscita no sólo un incremento del producto en polvo añadido, sino también de la cantidad de sales presentes, lo que favorece el aumento de los parámetros viscoelásticos de las salsas. El incremento de G' y G'' al aumentar el contenido proteico es mayor en las salsas formadas con agregados caprinos probablemente debido a que, por su bajo contenido proteico, es necesario aumentar en gran cantidad el polvo añadido para llegar a 1% de proteína. Los agregados poseen el mayor contenido de cenizas (10,72%), (tabla 23), con lo que un incremento de la cantidad de proteína supone un aumento considerable de la cantidad de cenizas añadidas.

La adición de sales ayuda a neutralizar las cargas de las proteínas, lo que les permite adsorberse y aumentar la fuerza de la película de la superficie de las gotas de grasa. Además la neutralización de las cargas permite que las gotas de grasa adyacentes interactúen con mayor fuerza (Depree y Savage, 2001). A pesar de ello, un aumento de la fuerza iónica puede ser perjudicial para la capacidad emulsionante, tal como se comentó en el apartado 4.3, ya que disminuye la repulsión entre las gotas con lo que pueden interaccionar entre sí. Sin embargo, parece que en nuestro caso la adición de NaCl en la formulación de las salsas no resultó perjudicial, al igual que sucedió con el alto contenido de cenizas de los agregados.

Todas las medidas reológicas también se llevaron a cabo siete días después de su elaboración, porque tal como señalan algunos autores (Riscardo et al., 2005), se necesita un mínimo de 6 días de almacenamiento para que las determinaciones reológicas se vean afectadas por el envejecimiento de las emulsiones.

Tras el periodo de almacenamiento, se observa un ligero aumento de los valores de G' (a excepción de la salsa con 1% de proteína de CPS-SC) con relación a

las medidas realizadas al día siguiente. Rivas y Sherman (1983) también señalan un incremento de los parámetros viscoelásticos de sus emulsiones estabilizadas por proteínas tras 5-7 días de almacenamiento. Estos resultados señalan que las interacciones entre proteínas continúan durante este período, lo que retarda la coalescencia (Turgeon et al., 1996).

Las salsas formuladas con CPS de origen bovino poseen valores de G' menores a los de CPS caprino, y aún incrementando la concentración proteica, los valores del módulo elástico siguen siendo inferiores. Incluso con 1% de CPS bovino, los valores fueron inferiores que con un 0,5% de los productos caprinos. Estas diferencias pueden relacionarse con las propiedades emulsionantes estudiadas en el apartado 4.3, donde se observó que el CPS bovino presentaba unos valores a pH 4 inferiores a los obtenidos en los CPS y agregados caprinos.

5.2.2. ESTABILIDAD

Los alimentos cuya estructura está basada en una emulsión, como la leche, mayonesas..., necesitan que ésta permanezca estable durante toda la vida útil del producto, que puede ser por un período de un año o más. A pesar de ello, todas las emulsiones son termodinámicamente inestables y, si se les da el tiempo necesario, se separarán. Sin embargo, se pueden preparar para que sean estables durante su vida útil, y que conserven su apariencia, textura y flavor, que son parámetros deseables por el consumidor (Ford et al., 2004). De igual forma, las emulsiones con una fracción de volumen de aceite elevada, tal como las salsas que preparamos, pueden desestabilizarse en el momento en que se preparan, con lo que necesitan presentar una alta estabilidad frente a mecanismos que desestabilizan las emulsiones, como la coalescencia.

De este modo, la estabilidad de una emulsión puede dividirse en dos categorías: estabilidad en el momento de la formación y la estabilidad a largo plazo (Ford et al., 2004). A raíz de ello, hemos evaluado la estabilidad de nuestras salsas, tanto el día que se elaboran como a las 24 horas [mediante centrifugación, método de Christiansen et al. (2004)], y después de 6 meses [mediante drenaje, método de Turgeon et al. (1996)], a dos temperaturas diferentes: temperatura ambiente y a temperaturas de refrigeración (tabla 49).

Resultados y Discusión

Tabla 49: Estabilidad (%) de las salsas con adición de los productos en polvo obtenidos del suero caprino, del concentrado de proteínas séricas bovino y de ovalbúmina (n=2) , el día que se hacen, al día siguiente y tras un período de almacenamiento de 6 meses (temperatura ambiente y temperatura de refrigeración)

		CPS-C	CPS-SC	Agregados	CPS Bovino	Ovalbúmina
0,5% Proteína	Día 0 *	83,26 ± 0,98	82,60 ± 0,89	81,81 ± 0,78	81,45 ± 0,30	85,24 ± 1,10
	* T. Amb.	83,04 ± 0,98	83,93 ± 0,55	83,79 ± 0,14	81,86 ± 0,96	85,56 ± 0,69
	Refriger.	84,23 ± 0,86	84,62 ± 0,47	82,76 ± 0,32	82,31 ± 0,48	84,24 ± 1,13
	6 meses**	94,81 ± 1,56	92,35 ± 0,32	94,78 ± 1,68	90,52 ± 0,13	95,45 ± 0,10
	Refriger.	96,78 ± 0,61	93,63 ± 0,16	92,15 ± 0,92	91,56 ± 0,83	96,19 ± 0,67
1% Proteína	Día 0 *	84,52 ± 0,35	85,72 ± 1,48	91,04 ± 0,47	81,99 ± 0,29	88,51 ± 0,02
	* T. Amb.	88,12 ± 1,99	87,86 ± 0,08	93,35 ± 0,77	83,59 ± 0,43	87,04 ± 0,95
	Refriger.	88,00 ± 0,01	87,85 ± 0,06	92,86 ± 0,11	83,96 ± 1,44	86,18 ± 0,75
	6 meses**	100,00 ± 0,00	96,94 ± 1,13	100,00 ± 0,00	88,85 ± 1,58	100,00 ± 0,00
	Refriger.	100,00 ± 0,00	97,13 ± 0,01	100,00 ± 0,00	93,81 ± 1,19	100,00 ± 0,00

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados;
 CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino; Agregados: Agregados en polvo; T. Amb.: Temperatura ambiente;
 Refriger.: Refrigeración; *: Método de Christianisen et al. (2004); **: Método de Turgeon et al. (1996)

La estabilidad de las salsas medida mediante centrifugación, tanto el día que se hacen como al día siguiente, es superior en todos los casos al 80%, presentando valores entre el 81 y 85% con salsas con 0,5% de proteína añadida y entre el 82 y 93% con las salsas con 1% de proteína, aunque sólo las salsas con agregados presenta valores superiores al 90%. Es destacable que la estabilidad es ligeramente mayor con concentraciones de proteína superiores. No se observó gran influencia de la temperatura de almacenamiento en la estabilidad de las salsas.

Respecto a la estabilidad de las salsas a los 6 meses medida mediante drenaje, se puede distinguir que, en general, presentan una estabilidad muy alta, mostrando valores entre 90 y 96% con 0,5% de proteína y entre 88 y 100% con 1% de proteína. Es necesario subrayar que, con 1% de proteína, la estabilidad de las salsas preparadas con ovoalbúmina, CPS clarificado o agregados es del 100%. Tampoco se observó influencia de la temperatura de almacenamiento en la estabilidad de las salsas.

Thompson y Reniers (1982) obtuvieron aliños con un producto de suero con una estabilidad del 100% a 4°C y tras 24 h, por tanto superior al de nuestras muestras, mientras que la de los diferentes aderezos de Christiansen et al. (2004), también a temperaturas de refrigeración y tras 24 h, osciló entre 60,3-100%, rango en el que se encuentran nuestras salsas.

Al aumentar la concentración proteica, la estabilidad de nuestras salsas mejora, al igual que los aliños de Christiansen et al. (2004) formulados con β -LG e hidrolizados de proteínas séricas. Por el contrario, a las que se ha añadido CPS (Christiansen et al., 2004), se vuelven menos estables al aumentar el contenido proteico (2-4%) o lipídico (5-30%).

A diferencia de nuestras salsas, los aderezos de ensalada de Turgeon et al. (1996) preparados con CPS 35%, con una formulación similar al de nuestras salsas, fueron muy inestables (<4 días) independientemente de la temperatura de almacenamiento y de la cantidad de proteína añadida (0,5-1,5% proteína). Estos autores señalan que bien la concentración proteica empleada (0,5-1,5% de proteína) o bien la propiedad emulsionante de las proteínas séricas es insuficiente, lo que puede provocar que las proteínas séricas no están preparadas para formar membranas resistentes a la coalescencia. Nuestros resultados discrepan totalmente de la afirmación de Turgeon et al. (1996), puesto que nuestros CPS, tanto caprinos como bovino, fueron capaces de formar emulsiones muy estables a concentraciones de 0,5 y 1% de proteína. Para obtener emulsiones tan estables como las nuestras (por ejemplo

Resultados y Discusión

con CPS clarificado a 1% de proteína), estos autores necesitaron someter el CPS a un tratamiento térmico previo y/o hidrólisis enzimática.

Como se ha señalado anteriormente, la estabilidad es muy similar independientemente de la temperatura de almacenamiento empleada, aunque se aprecia que, a excepción del la salsa con 0,5% de proteína de agregados, el almacenamiento a temperatura de refrigeración mejora la estabilidad de las emulsiones, tal como señalan Turgeon et al. (1996). Esto puede deberse a que bajo estas circunstancias se incrementa la viscosidad, como consecuencia de que se forman interacciones más fuertes entre las proteínas y el solvente, y porque se favorece las interacciones proteicas entre glóbulos adyacentes, en detrimento de las interacciones entre proteínas de la película proteica que rodean el glóbulo graso (Turgeon et al., 1996).

En relación al efecto de los distintos productos utilizados para la obtención de las salsas, los aliños elaborados tanto con 0,5% como con 1% de proteína fueron más estables cuando se emplearon ovoalbúmina y los CPS y agregados caprinos que cuando se utilizó el CPS bovino. La menor estabilidad del CPS bovino puede relacionarse con los resultados que se obtuvieron en el estudio de la actividad emulsionante de los CPS. El CPS bovino fue el que presentó las peores propiedades emulsionantes a pH 4 (pH de las salsas).

No hay diferencias importantes entre los dos CPS caprinos utilizados como tampoco las había en las propiedades emulsionantes a pH 4 entre ambos productos. Las salsas con agregados también presentan una estabilidad comparable a la de las elaboradas con los dos CPS caprinos e incluso la estabilidad de las hechas con 1% de proteína es superior, lo que podría relacionarse con el índice de estabilidad emulsionante de los agregados caprinos a pH 4, que era significativamente superior al de los CPS caprinos (tabla 30), aunque probablemente también se deba a la mayor cantidad de sales presentes en estas salsas, como se señaló en el estudio de las propiedades reológicas.

En la figura 36 se puede observar la estabilidad de las salsas con 1% de proteína tras 6 meses de almacenamiento.

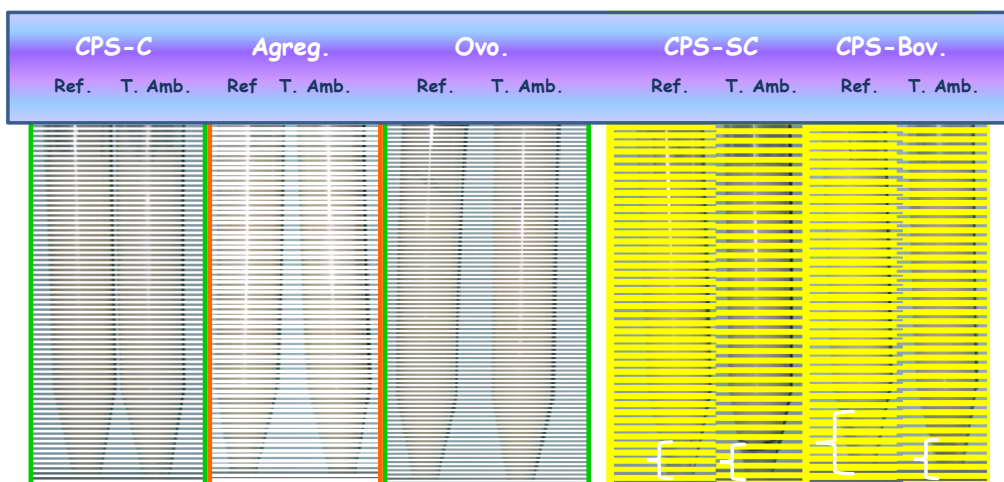


Figura 36: Estabilidad de las salsas con 1% de proteína tras 6 meses de almacenamiento a refrigeración (Ref.) o a temperatura ambiente (T. Amb)

(CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; Agreg.: Agregados en polvo; Ovo: Ovoalbúmina; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados; CPS Bov.: Concentrado de proteínas séricas bovino)

Ninguna de nuestras salsas presentó separación de la fase oleosa, al igual que las elaboradas por otros autores en salsas conservadas mucho menos tiempo (Christiansen et al., 2004; Surh et al., 2006). Esta buena estabilidad puede atribuirse al hecho de que los CPS forman una solución con viscosidad alta, que ralentiza el movimiento de las gotas y/o estas gotas de grasa se agregan dentro de una red que les impide que se muevan (Surh et al., 2006). En todos los casos en los que se produjo una desestabilización de nuestras emulsiones, se detectó por la separación de una fase acuosa en el fondo del tubo (sinéresis) tal como sucede en emulsiones preparadas por otros autores (Turgeon et al., 1996; Christiansen et al., 2004).

El alto contenido lipídico de nuestras salsas puede haber influido positivamente en la estabilidad. De hecho, en la mayonesas, su alto contenido lipídico hace que se establezcan interacciones fuertes entre las gotas, lo que ayuda a la estabilidad de las emulsiones (Depree y Savage, 2001).

En general, nuestras emulsiones son bastante estables, principalmente con 1% de proteína. Parece que los emulgentes utilizados están preparados para adsorberse a la interfase y formar una película estable alrededor de las gotas, con lo que no sólo son capaces de formar emulsiones, sino también de estabilizarlas.

5.2.3. COLOR

En las tablas 50, 51, 52, 53 aparecen reflejados las coordenadas de color (L^* , a^* , b^*) sobre fondo negro y blanco, evaluadas a las 24 horas y a la semana siguiente tras su conservación en refrigeración.

Se puede señalar que hay ciertas diferencias en la luminosidad de las muestras. Al igual que se indicó en los geles térmicos y ácidos, un alto valor de L^* indica que la luz se refleja, lo que puede relacionarse con una red mejor estructurada. Esta mayor luminosidad también se correlaciona, como en geles térmicos y ácidos, con G^* y G' . Así, mostraron valores superiores de L^* las salsas elaboradas con 1% de proteína, y entre los diferentes productos añadidos, fue mayor L^* en las salsas con ovoalbúmina, el CPS clarificado y los agregados caprinos, lo que se corresponde en cierta medida con lo que sucedía en las determinaciones reológicas de G^* y G' .

También cabe destacar que las salsas suplementadas con agregados, pero fundamentalmente, con 1% de proteína, posee un valor de b^* superior al resto. La coordenada b^* varía desde el azul al amarillo, con lo que valores más positivos están relacionados con un color más amarillo. Las preparadas con 1% y 0,5% de proteína de agregados se han elaborado con la adición de 18,69 g y 9,35 g de polvo por cada 100 g de producto, y eso implica añadir 6,45 y 3,22 g de grasa por cada 100 g de producto. La grasa es responsable de este color, y al añadir más grasa, ésta contribuye a que presenten un color más amarillento. Estas diferencias de las salsas con agregados del resto, se observan claramente en la figura 50, donde se muestran las fotos de las distintas salsas a 0,5% y 1% de proteína. En las imágenes se puede observar que todas presentan un color blanquecino excepto las elaboradas con agregados que presentan un color amarillento.

Finalmente, señalar que, tras un almacenamiento de una semana a temperaturas de refrigeración, apenas se modifican los parámetros de color.

Tabla 50: Coordenadas de color (CIE L*a*b*) (media \pm desviación estándar) de las salsas con adición de los productos en polvo obtenidos del suero caprino, del concentrado de proteínas séricas bovino y de ovalbúmina (n=2) al día siguiente de la elaboración (Fondo blanco)

	CPS-C	CPS-SC	Agregados	CPS Bovino	Ovalbúmina
Proteína 0,5%	L*	55,92 \pm 2,25	55,73 \pm 0,19	49,63 \pm 0,78	59,03 \pm 2,23
	a*	-0,74 \pm 0,10	-0,64 \pm 0,00	-0,57 \pm 0,00	-0,83 \pm 0,01
	b*	5,27 \pm 0,28	5,08 \pm 0,03	7,00 \pm 0,13	5,60 \pm 0,17
Proteína 1%	L*	66,93 \pm 4,77	62,63 \pm 0,39	63,79 \pm 7,57	67,40 \pm 12,40
	a*	-0,92 \pm 0,07	-0,89 \pm 0,00	-0,66 \pm 0,03	-0,94 \pm 0,18
	b*	5,64 \pm 0,12	5,40 \pm 0,03	9,54 \pm 0,32	6,58 \pm 0,44

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados;
CPS bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino; Agregados: Agregados en polvo

Tabla 51 : Coordenadas de color (CIE L*a*b*) (media ± desviación estándar) de las salsas con adición de los productos en polvo obtenidos del suero caprino, del concentrado de proteínas séricas bovino y de ovalbúmina (n=2) a la semana siguiente de la elaboración (Fondo blanco)

	CPS-C	CPS-SC	Agregados	CPS Bovino	Ovalbúmina
0,5% Proteína	L*	59,36 ± 3,87	52,84 ± 3,17	54,72 ± 3,79	60,19 ± 2,16
	a*	-0,80 ± 0,12	-0,68 ± 0,00	-0,56 ± 0,05	-0,78 ± 0,06
	b*	5,52 ± 0,59	4,22 ± 1,11	7,42 ± 0,11	5,81 ± 0,11
1% Proteína	L*	63,67 ± 5,11	57,65 ± 0,74	62,11 ± 0,21	63,87 ± 11,71
	a*	-0,95 ± 0,14	-0,78 ± 0,07	-1,83 ± 0,09	-0,41 ± 0,59
	b*	5,38 ± 0,40	5,00 ± 0,21	9,37 ± 0,35	6,43 ± 0,56

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados;
 CPS bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino; Agregados: Agregados en polvo

Tabla 52: Coordenadas de color (CIE L*a*b*) (media ± desviación estándar) de las salsas con adición de de los productos en polvo obtenidos del suero caprino, del concentrado de proteínas séricas bovino y de ovalbúmina (n=2) al día siguiente de la elaboración (Fondo negro)

	CPS-C	CPS-SC	Agregados	CPS Bovino	Ovalbúmina
Proteína 0,5%	L*	58,57 ± 2,11	54,40 ± 0,48	51,53 ± 2,46	59,94 ± 3,22
	a*	-0,78 ± 0,06	-0,60 ± 0,05	-0,61 ± 0,02	-0,85 ± 0,00
	b*	5,32 ± 0,10	4,91 ± 0,06	6,84 ± 0,07	5,64 ± 0,58
Proteína 1%	L*	68,34 ± 3,27	64,71 ± 1,10	66,57 ± 3,50	66,63 ± 13,49
	a*	-0,94 ± 0,04	-0,92 ± 0,04	-0,98 ± 1,42	-0,93 ± 0,24
	b*	5,74 ± 0,02	5,34 ± 0,13	9,74 ± 0,38	6,43 ± 0,63

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados;
 CPS bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino; Agregados: Agregados en polvo

Tabla 53: Coordenadas de color (CIE L*a*b*) (media ± desviación estándar) de las salsas con adición de los productos en polvo obtenidos del suero caprino, del concentrado de proteínas séricas bovino y de ovalbúmina (n=2) a la semana siguiente de la elaboración
(Fondo negro)

	CPS-C	CPS-SC	Agregados	CPS Bovino	Ovalbúmina
Proteína 0,5%	L*	59,62 ± 4,42	55,10 ± 6,04	52,90 ± 2,32	54,59 ± 3,36
	a*	-0,86 ± 0,20	-0,69 ± 0,02	-1,31 ± 0,04	-0,60 ± 0,03
	b*	5,46 ± 0,81	4,61 ± 0,56	7,10 ± 0,06	5,44 ± 0,37
Proteína 1%	L*	64,10 ± 4,18	57,90 ± 1,22	63,98 ± 0,86	63,39 ± 12,05
	a*	-0,95 ± 0,12	-0,84 ± 0,01	-1,91 ± 0,11	-0,74 ± 0,17
	b*	5,50 ± 0,52	5,03 ± 0,12	9,37 ± 0,42	6,01 ± 1,09
					60,97 ± 4,63
					-0,81 ± 0,11
					5,95 ± 0,11
					66,81 ± 7,81
					-1,00 ± 0,16
					6,30 ± 0,34

CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificados; CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificados;
CPS bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino; Agregados: Agregados en polvo

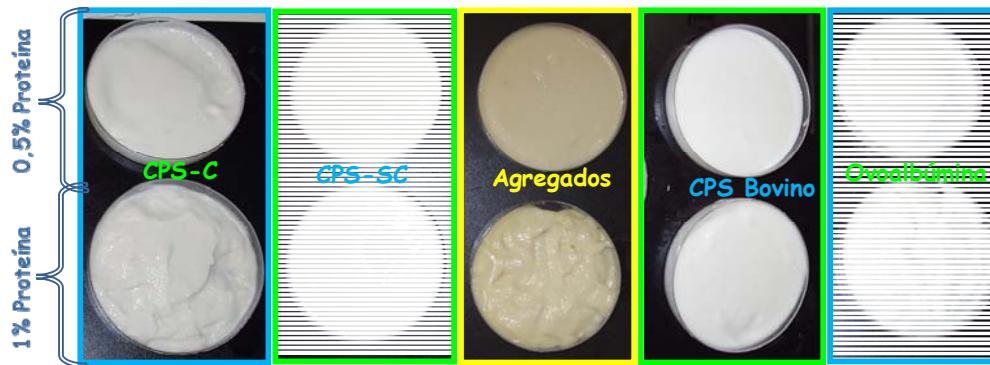


Figura 50: Imágenes de las salsas elaboradas con 0,5% y 1% de proteína.

(CPS-C: Concentrados de proteínas de suero clarificado, CPS-SC: Concentrados de proteínas de suero no clarificado; Agreg.: Agregados en polvo; CPS Bovino: Concentrado de proteínas séricas bovino)

1. The clarification of caprine cheese whey by thermocalcic precipitation followed by separation of the aggregates improves posterior ultrafiltration/diafiltration treatments.
2. The clarification procedure makes possible to obtain caprine whey protein concentrates with high protein content (74%). The lipid content decreases below 6%. However, the ash and calcium contents are higher than those observed in unclarified by-products. The phospholipid proportion and the protein and fatty acid compositions are not influenced by the clarification procedure.
3. Thermocalcic aggregation followed by aggregates separation improves some functional properties of caprine whey protein concentrates. This pre-treatment increases the emulsifying and gelling capacities at pH 7. Other functional properties (solubility, emulsifying stability at pH 7 and 4 and emulsifying and gelling capacities at pH 4) are not influenced by the clarification procedure.
4. Both caprine whey protein concentrates show higher solubility, gelling capacity and emulsifying stability than commercial bovine whey protein concentrate. The minimum concentration of product that is capable of producing heat-induced gels in caprine whey concentrates at pH 7 is lower than that observed in the bovine whey protein concentrate. The caprine whey protein concentrate obtained after clarification also shows better emulsifying capacity than bovine whey protein concentrate. Both caprine whey protein concentrates and bovine whey protein concentrate do not show foaming capacity.
5. The aggregates, the by-products in the clarification treatment, could also be of potential use in food manufacturing due to their interesting functional properties (solubility and emulsifying properties).
6. The acid caprine milk gels manufactured with caprine whey protein concentrates increase the firmness and decrease the syneresis more than the acid caprine milk gels made with bovine whey protein concentrates. The caprine yoghourts are usually weaker than bovine yoghourts; so, the use of caprine whey protein concentrates would be very useful in the manufacture of caprine fermented milks.
7. The emulsifying properties of caprine whey protein concentrates and aggregates are very useful in order to prepare salad dressings with high stability and strength. A more yellow salad dressing is obtained when aggregates are used.
8. The salad dressing made with the supplementation of caprine whey protein concentrates or aggregates show higher firmness than the dressings manufactured with the addition of bovine whey protein concentrate.

- ✦ **A.O.A.C. (2005a).** Ash of dried milk. En W. Horwitz, *Official methods of analysis* Gaithersburg, MD, USA.
- ✦ **A.O.A.C. (2005b).** Fat in dried milk. En W. Horwitz, *Official methods of analysis* Gaithersburg, MD, USA.
- ✦ **A.O.A.C. (2005c).** Moisture in dried milk. En W. Horwitz, *Official methods of analysis* Gaithersburg, MD, USA.
- ✦ **Aguilera, J.M. (1995).** Gelation of whey proteins. *Food Technology*, 49(10), 83-89.
- ✦ **Aguilera, J.M. & Kessler, H.G. (1989).** Properties of mixed and filled-type dairy gels. *Journal of Food Science*, 54(5), 1213-1217.
- ✦ **Allmere, T., Åkerlind, M., & Andrén, A. (1999).** Rheological properties of acidified gels of skim milk from cows selected for high or low milk fat concentration. *International Dairy Journal*, 9(10), 703-707.
- ✦ **Alonso, L., Fontecha, J., Lozada, L., Fraga, M.J., & Juárez, M. (1999).** Fatty acid composition of caprine milk: major, branched-chain, and trans fatty acids. *Journal of Dairy Science*, 82(5), 878-884.
- ✦ **Amatayakul, T., Halmos, A.L., Sherkat, F., & Shah, N.P. (2006).** Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal*, 16(1), 40-51.
- ✦ **Anema, S.G. (2008).** Effect of milk solids concentration on the gels formed by the acidification of heated pH-adjusted skim milk. *Food Chemistry*, 108(1), 110-118.
- ✦ **Anema, S.G., Lee, S.K., Lowe, E.K., & Klostermeyer, H. (2004).** Rheological properties of acid gels prepared from heated pH-adjusted skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2), 337-343.
- ✦ **Anónimo. (2010).** History. Alberta Goat Breeders Association. Acceso el 1/11/2010 en <http://www.albertagoatbreeders.ca/default.asp?contentID=658>.
- ✦ **Arshad, M., Paulsson, M., & Dejmek, P. (1993).** Rheology of buildup, breakdown and rebodding of acid casein gels. *Journal of Dairy Science*, 76(11), 3310-3316.
- ✦ **Attaie, R. & Richter, R.L. (2000).** Size distribution of fat globules in goat milk. *Journal of Dairy Science*, 83(5), 940-944.
- ✦ **Aziznia, S., Khosrowshahi, A., Madadlou, A., & Rahimi, J. (2008).** Whey protein concentrate and gum tragacanth as fat replacers in nonfat yogurt: Chemical, physical, and microstructural properties. *Journal of Dairy Science*, 91(7), 2545-2552.
- ✦ **Banavara, D.S., Anupama, D., & Rankin, S.A. (2003).** Studies on physicochemical and functional properties of commercial sweet whey powders. *Journal of Dairy Science*, 86(12), 3866-3875.

Bibliografía

- ✦ **Bañón, S., Vila, R., Price, A., Ferrandini, E., & Garrido, M.D. (2006).** Effects of goat milk or milk replacer diet on meat quality and fat composition of suckling goat kids. *Meat Science*, 72(2), 216-221.
- ✦ **Barbosa, A.S., Araújo, A.S., Florenzio, I.M., Bezerra, R.R.A., & Florentino, E.R. (2010).** Estudo cinético da fermentação do soro de queijo de coalho para produção de aguardente. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável Grupo Verde de Agricultura Alternativa (GVAA)*, 5(3), 237-254.
- ✦ **Bastian, E. (2004).** Nutritional properties of whey, lactose, and milk minerals products: Balance in dietary mineral consumption. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, & A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products (77)*. Acceso el 15/10/2010 en http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey_Lactose_Reference_Manual_Complete2_Optimized.pdf.
- ✦ **Baomy, J.J., Gestin, L., Fauquant, J., Boyaval, E., & Maubois, J.L. (1990).** Technologies de purification des phospholipides du lactosérum. *Process*, 1047, 29-33.
- ✦ **Belitz, H.D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009).** *Food chemistry*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.
- ✦ **Bengoechea, C., Romero, A., Cordobés, F., & Guerrero, A. (2008).** Estudio reológico y microestructural de emulsiones concentradas de aceite de girasol en agua estabilizadas con proteínas agroalimentarias. *Grasas y Aceites*, 59(1), 62-68.
- ✦ **Berry, D. (2006).** The future for dairy proteins. *Dairy Foods*, 107, 34-36,38,40,42.
- ✦ **Bhullar, Y.S., Uddin, M.A., & Shah, N.P. (2002).** Effects of ingredients supplementation on textural characteristics and microstructure of yoghurt. *Milchwissenschaft*, 57(6), 328-332.
- ✦ **Bikker, J.F., Anema, S.G., Li, Y., & Hill, J.P. (2000).** Rheological properties of acid gels prepared from heated milk fortified with whey protein mixtures containing the A, B and C variants of β -lactoglobulin. *International Dairy Journal*, 10(10), 723-732.
- ✦ **Blecker, C., Paquot, M., Lamberti, I., Sensidoni, A., Lognay, G., & Deroanne, C. (1997).** Improved emulsifying and foaming of whey proteins after enzymic fat hydrolysis. *Journal of Food Science*, 62(1), 48-52.
- ✦ **Blecker, C., Paquot, M., & Deroanne, C. (2000).** Gelling properties of whey proteins after enzymic fat hydrolysis. *Journal of Food Science*, 65(4), 561-563.
- ✦ **Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959).** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917.
- ✦ **Boirie, Y., Dangin, M., Gachon, P., Vasson, M.P., Maubois, J.L., & Beaufrere, B. (1997).** Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(26), 14930-14935.

- ✎ **Bonnaillie, L.M. & Tomasula, P.M. (2008).** Whey protein Fractionation. En C.I. Onwulata & P.J. Huth, *Whey processing, functionality and health benefits* (15-38). Iowa: Wiley-Blackwell IFT press.
- ✎ **Bordenave-Juchereau, S., Almeida, B., Piot, J.M., & Sannier, F. (2005).** Effect of protein concentration, pH, lactose content and pasteurization on thermal gelation of acid caprine whey protein concentrates. *Journal of Dairy Research*, 72(01), 34-38.
- ✎ **Borderías, A.J. & Montero, P. (1988).** Fundamentos de la funcionalidad de las proteínas en alimentos. *Revista Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 28(2), 159-169.
- ✎ **Boumba, V.A., Voutsinas, L.P., & Philippopoulos, C.D. (2001).** Composition and nutritional value of commercial dried whey products from feta cheese manufacture. *International Journal of Dairy Technology*, 54(4), 141-145.
- ✎ **Bounous, G. & Gold, P. (1991).** The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. *Clinical and Investigative Medicine*, 14(4), 296-309.
- ✎ **Boutin, R. (2004).** Confectionery applications for whey and lactose products: An overview and new developments. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, & A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products* (124-126). Acceso el 15/10/2010 en http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey_Lactose_Reference_Manual_Complete2_Optimized.pdf.
- ✎ **Bouzas, J. (2004a).** Confectionery applications for whey and lactose products: Whey products and lactose in confectionary applications, En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, & A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products* (127-132). Acceso el 15/10/2010 en http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey_Lactose_Reference_Manual_Complete2_Optimized.pdf.
- ✎ **Bouzas, J. (2004b).** Nutritional products applications for whey products: Whey applications in sports and nutrition bars. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, & A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products* (205). Acceso el 15/10/2010 en http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey_Lactose_Reference_Manual_Complete2_Optimized.pdf.
- ✎ **Boyazoglu, J., Hatziminaoglou, I., & Morand-Fehr, P. (2005).** The role of the goat in society: Past, present and perspectives for the future. *Small Ruminant Research*, 60(1-2), 13-23.
- ✎ **Boye, J.I., Alli, I., Ismail, A.A., Gibbs, B.F., & Konishi, Y. (1995).** Factors affecting molecular characteristics of whey protein gelation. *International Dairy Journal*, 5(4), 337-353.
- ✎ **Boye, J.I., Alli, I., Ramaswamy, H., & Raghavan, V.G.S. (1997).** Interactive effects of factors affecting gelation of whey proteins. *Journal of Food Science*, 62(1), 57-65.

Bibliografía

- ✎ **Brandenberg, A.H., Morr, C.V., & Weller, C.L. (1992).** Gelation of commercial whey protein concentrates: effect of removal of low-molecular-weight components. *Journal of Food Science*, 57(2), 427-432.
- ✎ **Britten, M. & Lavoie, L. (1992).** Foaming properties of proteins as affected by concentration. *Journal of Food Science*, 57(5), 1219-1241.
- ✎ **Britten, M. & Pouliot, Y. (1996).** Characterization of whey protein isolate obtained from milk microfiltration permeate. *Le Lait*, 76(3), 255-265.
- ✎ **Bryant, C.M. & McClements, D.J. (1998).** Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends in Food Science & Technology*, 9(4), 143-151.
- ✎ **Bryant, C.M. & McClements, D.J. (2000).** Optimizing preparation conditions for heat-denatured whey protein solutions to be used as cold-gelling ingredients. *Journal of Food Science*, 65(2), 259-263.
- ✎ **Burling, H. (2003).** Whey processing: Demineralization. En H. Roginski, J.W. Fuquay, & P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (Vol. 4) (2745-2751). Londres: Academic Press (Elsevier Science).
- ✎ **Burrington, K.J. (2004a).** Functional properties of whey products. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, & A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products* (81-84). Acceso el 15/10/2010 en http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey_Lactose_Reference_Manual_Complete2_Optimized.pdf.
- ✎ **Burrington, K.J. (2004b).** Bakery applications for whey and lactose products: Whey products in baked goods. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, & A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products* (100-105). Acceso el 15/10/2010 en http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey_Lactose_Reference_Manual_Complete2_Optimized.pdf.
- ✎ **Burrington, K.J. (2008).** Whey inclusions. En C.I. Onwulata & P.J. Huth, *Whey processing, functionality and health benefits* (201-211). Iowa: Wiley-Blackwell IFT press.
- ✎ **Cameron, D.R., Weber, M.E., Idziak, E.S., Neufeld, R.J., & Cooper, D.G. (1991).** Determination of interfacial-areas in emulsions using turbidimetric and droplet size data: correction of the formula for emulsifying activity index. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(4), 655-659.
- ✎ **Casper, J.L., Wendorff, W.L., & Thomas, D.L. (1998).** Seasonal changes in protein composition of whey from commercial manufacture of caprine and ovine specialty cheeses. *Journal of Dairy Science*, 81(12), 3117-3122.
- ✎ **Casper, J.L., Wendorff, W.L., & Thomas, D.L. (1999).** Functional properties of whey protein concentrates from caprine and ovine specialty cheese wheys. *Journal of Dairy Science*, 82(2), 265-271.

- ✎ **Castillo, M., Jordan, M.J., Abellan, A., Laencina, J., & Lopez, M.B. (1996).** Tecnología de aprovechamiento del lactosuero. *Revista Española de Lechería*, marzo, 24-30.
- ✎ **Cayot, P. & Lorient, D. (1997).** Structure-function relationships of whey proteins. En S. Damodaran & A. Paraf, *Food proteins and their applications* (225-256). New York: Marcel Dekker, Inc.
- ✎ **Chantrapornchai, W. & McClements, D.J. (2002).** Influence of NaCl on optical properties, large-strain rheology and water holding capacity of heat-induced whey protein isolate gels. *Food Hydrocolloids*, 16(5), 467-476.
- ✎ **Charles, M., Rosselin, V., Beck, L., Sauvageot, F., & Guichard, E. (2000).** Flavor release from salad dressings: Sensory and physicochemical approaches in relation with the structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1810-1816.
- ✎ **Cheftel, J.C., Cuq, J.L., & Lorient, D. (1989).** *Proteínas alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas.* Zaragoza: Editorial Acribia.
- ✎ **Cho, Y.H., Lucey, J.A., & Singh, H. (1999).** Rheological properties of acid milk gels as affected by the nature of the fat globule surface material and heat treatment of milk. *International Dairy Journal*, 9(8), 537-545.
- ✎ **Christiansen, K.F., Vegarud, G., Langsrud, T., Ellekjaer, M.R., & Egelanddal, B. (2004).** Hydrolyzed whey proteins as emulsifiers and stabilizers in high-pressure processed dressings. *Food Hydrocolloids*, 18(5), 757-767.
- ✎ **Cobos, A., Horne, D.S., & Muir, D.D. (1995).** Rheological properties of acid milk gels. I. Effect of composition, process and acidification conditions on products from recombined milks. *Milchwissenschaft*, 50(8), 444-448.
- ✎ **Creamer, L.K. & Sawyer, L. (2003).** Milk Proteins: Beta-Lactoglobulin. En H. Roginski, J.W. Fuquay, & P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (Vol. 3) (1932-1939). Londres: Academic Press (Elsevier Science).
- ✎ **Dalgleish, D.G. (2004).** Food emulsion: Their structures and properties. En Friberg S.E., Larsson K., & Sjoblom J., *Food Emulsions. 4th Ed.* (1-44). New York, USA: Marcel Dekker Inc.
- ✎ **Dalgleish, D.G. (2006).** Food emulsions--their structures and structure-forming properties. *Food Hydrocolloids*, 20(4), 415-422.
- ✎ **Damodaran, S. (1996).** Functional properties. En S. Nakai & H.W. Modler, *Food proteins, properties and characterization* (167-234). New York: VCH Publishers Inc.
- ✎ **Damodaran, S. (1997a).** Food Proteins: An Overview. En S. Damodaran & A. Paraf, *Food proteins and their applications* (1-24). New York: Marcel Dekker, Inc.
- ✎ **Damodaran, S. (1997b).** Protein-stabilized foams and emulsions. En S. Damodaran & A. Paraf, (57-110). New York: Marcel Dekker, Inc.

Bibliografía

- ✎ **Damodaran, S. (2005).** Protein stabilization of emulsions and foams. *Journal of Food Science*, 70(3), 54-66.
- ✎ **Dangaran, K. & Krochta, J.M. (2008).** Whey protein films and coatings. En C.I. Onwulata & P.J. Huth, *Whey processing, functionality and health benefits* (133-167). Iowa: Wiley-Blackwell IFT press.
- ✎ **De la Fuente, M.A., Hemar, Y., Tamehana, M., Munro, P.A., & Singh, H. (2002).** Process-induced changes in whey proteins during the manufacture of whey protein concentrates. *International Dairy Journal*, 12(4), 361-369.
- ✎ **De Wit, J.N. (1989).** Functional properties of whey proteins. En P.F. Fox, *Developments in dairy chemistry-4. Functional milk proteins* (285-321). Barking: Elsevier Science Publishers.
- ✎ **De Wit, J.N. (1998).** Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science*, 81(3), 597-608.
- ✎ **De Wit, J.N. (2003).** Dairy ingredients in non-dairy foods. En H. Roginski, J.W. Fuquay, & P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (Vol. 2) (718-727). Londres: Academic Press (Elsevier Science).
- ✎ **De Wit, J.N. & De Boer, R. (1975).** Ultrafiltration of cheese whey and some functional properties of the resulting whey protein concentrate. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 29(2/3), 198-211.
- ✎ **De Wit, J.N. & Klarenbeek, G. (1984).** Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 67(11), 2701-2710.
- ✎ **De Wit, J.N., Klarenbeek, G., & Adamse, M. (1986).** Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates. 2. Effects of processing history and composition. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 40, 41-56.
- ✎ **De Wit, J.N., Hontelez-Backx, E., & Adamse, M. (1988).** Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates. 3. Functional properties in aqueous solution. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 42, 155-172.
- ✎ **Depree, J.A. & Savage, G.P. (2001).** Physical and flavour stability of mayonnaise. *Trends in Food Science & Technology*, 12(5-6), 157-163.
- ✎ **DeVilbiss, E.D., Holsinger, V.H., Posati, L.P., & Pallansch, M.J. (1974).** Properties of whey protein concentrate foams. *Food Technology*, 28(3), 40.
- ✎ **Díaz, O., Pereira, C.D., & Cobos, A. (2004).** Functional properties of ovine whey protein concentrates produced by membrane technology after clarification of cheese manufacture by-products. *Food Hydrocolloids*, 18(4), 601-610.
- ✎ **Díaz, O., Pereira, C.D., & Cobos, A. (2006).** Rheological properties and microstructure of heat-induced gels of ovine whey protein concentrates obtained from clarified cheese whey. *Milchwissenschaft*, 61(2), 193-196.

- ✎ Dickinson, E. & Hong, S.T. (1994). Surface coverage of β -Lactoglobulin at the oil-water interface: influence of protein heat treatment and various emulsifiers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(8), 1602-1606.
- ✎ Diftis, N.G., Biliaderis, C.G., & Kiosseoglou, V.D. (2005). Rheological properties and stability of model salad dressing emulsions prepared with a dry-heated soybean protein isolate-dextran mixture. *Food Hydrocolloids*, 19(6), 1025-1031.
- ✎ Doi, E. (1993). Gels and gelling of globular proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 4, 1-1.
- ✎ Dolz, M., Hernández, M.J., & Delegido, J. (2006). Oscillatory measurements for salad dressings stabilized with modified starch, xanthan gum, and locust bean gum. *Journal of Applied Polymer Science*, 102(1), 897-903.
- ✎ D´Souza, N.M. & Mawson, A.J. (2005). Membrane cleaning in the dairy industry: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(2), 125-134.
- ✎ Elgar, D.F., Norris, C.S., Ayers, J.S., Pritchard, M., Otter, D.E., & Palmano, K.P. (2000). Simultaneous separation and quantitation of the major bovine whey proteins including proteose peptone and caseinomacropeptide by reversed-phase high-performance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene. *Journal of Chromatography A*, 878(2), 183-196.
- ✎ Errington, A.D. & Foegeding, E.A. (1998). Factors determining fracture stress and strain of fine-stranded whey protein gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(8), 2963-2967.
- ✎ Etzel, M.R. (2004). Manufacture and use of dairy protein fractions. *Journal of Nutrition*, 134(4S), 996S-1002S.
- ✎ Euston, S.R. & Hirst, R.L. (1999). Comparison of the concentration-dependent emulsifying properties of protein products containing aggregated and non-aggregated milk protein. *International Dairy Journal*, 9(10), 693-701.
- ✎ Evans, J., Zulewska, J., Newbold, M., Drake, M.A., & Barbano, D.M. (2009). Comparison of composition, sensory, and volatile components of thirty-four percent whey protein and milk serum protein concentrates. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4773-4791.
- ✎ Fachin, L. & Viotto, W.H. (2005). Effect of pH and heat treatment of cheese whey on solubility and emulsifying properties of whey protein concentrate produced by ultrafiltration. *International Dairy Journal*, 15(4), 325-332.
- ✎ FAO. (2010a). Acceso el 4/10/2010 en <http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>.
- ✎ FAO. (2010b). Acceso el 5/10/2010 en <http://faostat.fao.org/site/569/DesktopDefault.aspx?PageID=569#ancor>.

Bibliografía

- ✦ **Farell, E.C. (1984).** Calcium. En L.A. Kaplan & A.J. Pesce, *Clinical Chemistry: Theory, analysis and correlation* (1051-1255 y 1418). St Louis, Toronto: The C.V. Mosby Company.
- ✦ **Fauquant, J., Vieco, E., Brulé, G., & Maubois, J.L. (1985).** Clarification des lactosérums doux par agrégation thermocalcique de la matière grasse résiduelle. *Le Lait*, 65(647-648), 1-20.
- ✦ **FIAB (Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas). (2010).** Producción de leche y productos lácteos. Acceso el 1/7/2010 en <http://www.fenil.org/Sector/Produccion.asp>.
- ✦ **Foegeding, E.A., Davis, J.P., Doucet, D., & McGuffey, M.K. (2002).** Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 13(5), 151-159.
- ✦ **Foegeding, E.A. & Luck, P.J. (2003).** Milk proteins: Whey protein products. En H. Roginski, J.W. Fuquay, & P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (Vol. 3) (1957-1960). Londres: Academic Press (Elsevier Science).
- ✦ **Ford, L.D., Borwankar, R.P., Pechak, D., & Schwimmer, B. (2004).** Dressings and sauces. En Friberg S.E., Larsson K., & Sjoblom J., *Food Emulsions. 4th Ed.* (525-572). New York, USA: Marcel Dekker Inc.
- ✦ **Fox, P.F. (2001).** Milk proteins as food ingredients. *International Journal of Dairy Technology*, 54(2), 41-55.
- ✦ **Franco, J.M., Berjano, M., & Gallegos, C. (1997).** Linear viscoelasticity of salad dressing emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 713-719.
- ✦ **Gau, N. (1984).** Lactic acid. En L.A. Kaplan & A.J. Pesce, *Clinical Chemistry: Theory, analysis and correlation* (1040-1042 and 418). St Louis, Toronto: The C.V. Mosby Company.
- ✦ **Gezimati, J., Creamer, L.K., & Singh, H. (1997).** Heat-induced interactions and gelation of mixtures of β -Lactoglobulin and α -Lactalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4), 1130-1136.
- ✦ **Girardet, J.M. & Linden, G. (1996).** PP3 component of bovine milk: a phosphorylated whey glycoprotein. *Journal of Dairy Research*, 63(2), 333-350.
- ✦ **Glover, F.A. (1985).** Ultrafiltration and reverse osmosis for the dairy industry. *National Institute for Research in Dairying. Reading. England. Technical Bulletin*, 5, 100-119.
- ✦ **González-Martínez, C., Becerra, M., Cháfer, M., Albors, A., Carot, J.M., & Chiralt, A. (2002).** Influence of substituting milk powder for whey powder on yoghurt quality. *Trends in Food Science & Technology*, 13(9-10), 334-340.

- ✎ **Graveland-Bikker, J.F. & Anema, S.G. (2003).** Effect of individual whey proteins on the rheological properties of acid gels prepared from heated skim milk. *International Dairy Journal*, 13(5), 401-408.
- ✎ **Gunasekaran, S. (2008).** Whey protein hydrogels and nanoparticles for encapsulation and controlled delivery of bioactive compounds. En C.I. Onwulata & P.J. Huth, *Whey processing, functionality and health benefits* (227-284). Iowa: Wiley-Blackwell IFT press.
- ✎ **Gupta, V.K. & Reuter, H. (1992).** Protein solubility and gelation behaviour of whey protein concentrates prepared by ultrafiltration of sweet cheese whey. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 46, 89-100.
- ✎ **Guzmán-González, M., Morais, F., Ramos, M., & Amigo, L. (1999).** Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low fat set-type yoghurt model system. I: Use of whey protein concentrates, milk protein concentrates and skimmed milk powder. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(8), 1117-1122.
- ✎ **Guzmán-González, M., Morais, F., & Amigo, L. (2000).** Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low-fat set-type yoghurt model system. Use of caseinates, co-precipitate and blended dairy powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(4), 433-438.
- ✎ **Haenlein, G.F.W. (2001).** Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. *Journal of Dairy Science*, 84(9), 2097-2115.
- ✎ **Haggarty, N.W. (2003).** Milk proteins: Minor proteins, bovine serum albumin and vitamin-binding proteins. En H. Roginski, J.W. Fuquay, & P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (Vol. 3) (1939-1946). Londres: Academic Press (Elsevier Science).
- ✎ **Haggett, T.O.R. (1976).** The whipping, foaming and gelling properties of whey protein concentrates. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 11, 244-250.
- ✎ **Hall, G.M. (1996).** Basic concepts. En G.M. Hall, *Methods of testing protein functionality* (1-10). London: Chapman & Hall.
- ✎ **Halling, P.J. (1981).** Protein-stabilized foams and emulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15(2), 155-203.
- ✎ **Hanson, S.W.F. & Olley, J. (1963).** Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *Biochemical Journal*, 89, 101-102.
- ✎ **Haque, Z.U. & Ji, T. (2003).** Cheddar whey processing and source: II. Effect on non-fat ice cream and yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, 38(4), 463-473.

Bibliografía

- ✎ Harper, W. J. (1991). Whey and whey protein composition. *Proceedings of Center for Dairy Research/American Dairy Products Institute. Whey Protein Workshop*, October. 21-23, Madison (Wisconsin, U.S.A.).
- ✎ Harper, W.J. (1992). Functional properties of whey protein concentrates and their relationship to ultrafiltration. *New Applications of Membrane Processes. IDF Special Issue 9201*, 77-107.
- ✎ Hatziminaoglou, Y. & Boyazoglu, J. (2004). The goat in ancient civilisations: from the Fertile Crescent to the Aegean Sea. *Small Ruminant Research*, 51(2), 123-129.
- ✎ Hawks, S.E., Phillips, L.G., Rasmussen, R.R., Barbano, D.M., & Kinsella, J.E. (1993). Effects of processing treatment and cheese-making parameters on foaming properties of whey protein isolates. *Journal of Dairy Science*, 76(9), 2468-2477.
- ✎ Heino, A., Uusi-Rauva, J.O., Rantamäki, P.R., & Tossavainen, O. (2007). Functional properties of native and cheese whey protein concentrate powders. *International Journal of Dairy Technology*, 60(4), 277-285.
- ✎ Herceg, Z., Režek, A., Lelas, V., Krešić, G., & Franetović, M. (2007). Effect of carbohydrates on the emulsifying, foaming and freezing properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*, 79(1), 279-286.
- ✎ Herrero, A.M. & Requena, T. (2006). The effect of supplementing goats milk with whey protein concentrate on textural properties of set-type yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(1), 87-92.
- ✎ Hiddink, J., De Boer, R., & Nooy, P.F.C. (1981). Effect of various pre-treatments on the ultrafiltration of sweet cheese whey at about 55 °C. *Milchwissenschaft*, 36(11), 657-663.
- ✎ Hill, S.E. (1996). Emulsions. En G.M. Hall, *Methods of testing protein functionality* (153-185). London: Chapman & Hall.
- ✎ Hines, M.E. & Foegeding, E.A. (1993). Interactions of α -lactalbumin and bovine serum albumin with β -lactoglobulin in thermally induced gelation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(3), 341-346.
- ✎ Hobman, P.G. (1992). Ultrafiltration and manufacture of WPC. En J.G. Zadow, *Whey and lactose processing* (195-230). Barking: Elsevier Science Publishers LTD.
- ✎ Holsinger, V.H., Posati, L.P., & DeVilbiss, E.D. (1974). Whey Beverages: A Review. *Journal of Dairy Science*, 57(8), 849-859.
- ✎ Holt, C., McPhail, D., Nevison, I., Nylander, T., Otte, J., Ipsen, R.H., Bauer, R., Ogendal, L., Olieman, K., Kruif, K.G., Léonil, J., Mollé, D., Henry, G., Maubois, J.L., Pérez, M.D., Puyol, P., Calvo, M., Bury, S.M., Kontopidis, G., McNae, I., Sawyer, L., Ragona, L., Zetta, L., Molinari, H., Klarenbeek, B., Jonkman, M.J., Moulin, J., & Chatterton, D. (1999a). Apparent chemical composition of nine commercial or semi-commercial whey protein concentrates,

- isolates and fractions. *International Journal of Food Science and Technology*, 34(5-6), 543-556.
- ✎ Holt, C., McPhail, D., Nylander, T., Otte, J., Ipsen, R.H., Bauer, R., Ogendal, L., Olieman, K., Kruif, K.G., Léonil, J., Mollé, D., Henry, G., Maubois, J.L., Pérez, M.D., Puyol, P., Calvo, M., Bury, S.M., Kontopidis, G., McNae, I., Sawyer, L., Ragona, L., Zetta, L., Molinari, H., Klarenbeek, B., Jonkman, M.J., Moulin, J., & Chatterton, D. (1999b). Some physico-chemical properties of nine commercial or semi-commercial whey protein concentrates, isolates and fractions. *International Journal of Food Science and Technology*, 34(5-6), 587-601.
- ✎ Hongsprabhas, P., Barbut, S., & Marangoni, A.G. (1999). The structure of cold-set whey protein isolate gels prepared with Ca⁺⁺. *LWT-Food Science and Technology*, 32(4), 196-202.
- ✎ Huffman, L.M. & Harper, W.J. (1999). Maximizing the value of milk through separation technologies. *Journal of Dairy Science*, 82(10), 2238-2244.
- ✎ Hugunin, A. (2004). Dairy applications for whey and lactose products: whey products in yogurt and fermented dairy products. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, & A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products* (151-155). Acceso el 15/10/2010 en http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey_Lactose_Reference_Manual_Complete2_Optimized.pdf.
- ✎ Hung, S.C. & Zayas, J.F. (1992). Protein solubility, water retention, and fat binding of corn germ protein flour compared with milk proteins. *Journal of Food Science*, 57(2), 372-376.
- ✎ Huth, P.J., Rains, T.M., Yang, Y., & Phillips, S.M. (2008). Current and emerging role of whey protein on muscle accretion. En C.I. Onwulata & P.J. Huth, *Whey processing, functionality and health benefits* (385-368). Iowa: Wiley-Blackwell IFT press.
- ✎ Ikeda, S. & Foegeding, E.A. (1999). Effects of lecithin on thermally induced whey protein isolate gels. *Food Hydrocolloids*, 13(3), 239-244.
- ✎ Jaeggi, J.J., Wendorff, W.L., Romero, J., Berger, Y.M., & Johnson, M.E. (2005). Impact of seasonal changes in ovine milk on composition and yield of a hard-pressed cheese. *Journal of Dairy Science*, 88(4), 1358-1363.
- ✎ Jameson, G.W. & Lelievre, J. (1996). Effects of whey proteins on cheese characteristics. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 313, 3-8.
- ✎ Jandal, J.M. (1996). Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 22(2), 177-185.
- ✎ Jelen, P. (1992). Whey: composition, properties, processing and uses. En Y.H. Hui, *Encyclopedia of food science and technology* (2835-2845). New York: John Wiley & Sons (Wiley-Interscience Publication).

Bibliografía

- ✎ **Jelen, P. (2003).** Whey processing: Utilization and products. En H. Roginski, J.W. Fuquay, & P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (Vol. 4) (2739-2745). Londres: Academic Press (Elsevier Science).
- ✎ **Jenness, R. (1980).** Composition and characteristics of goat milk: Review 1968-1979. *Journal of Dairy Science*, 63(10), 1605-1630.
- ✎ **Ji, T. & Haque, Z.U. (2003).** Cheddar whey processing and source: I. Effect on composition and functional properties of whey protein concentrates. *International Journal of Food Science and Technology*, 38(4), 453-461.
- ✎ **Johansen, A.G., Vegarud, G.E., & Skeie, S. (2002).** Seasonal and regional variation in the composition of whey from Norwegian Cheddar-type and Dutch-type cheeses. *International Dairy Journal*, 12(7), 621-629.
- ✎ **Johnson, B. (2004).** Processed foods and snacks applications for whey and lactose products: Whey products in snack applications. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, & A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products* (184-187). Acceso el 15/10/2010 en http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey_Lactose_Reference_Manual_Complete2_Optimized.pdf.
- ✎ **Johnson, B.R. (2000).** Whey protein concentrates in low-fat applications. Applications monograph. U.S. Dairy Export Council Arlington, U.S.A. Acceso el 15/01/2010 en http://www.usdec.org/files/PDFs/2008Monographs/WheyInLowFatApplications_English.pdf, 1-8.
- ✎ **Johnson, M.E., Chen, C.M., & Jaeggi, J.J. (2001).** Effect of rennet coagulation time on composition, yield, and quality of reduced-fat Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 84(5), 1027-1033.
- ✎ **Joseph, M.S.B., Mangino, M.E. (1988a).** Contribution of milk fat globule membrane proteins to the effective hydrophobicity of whey protein concentrates. *Australian Journal of Dairy Technology*, 43, 6-8.
- ✎ **Joseph, M.S.B. & Mangino, M.E. (1988b).** The effects of milk fat globule membrane protein on the foaming and gelation properties of β -lactoglobulin solutions and whey protein concentrates. *Australian Journal of Dairy Technology*, 43, 9-11.
- ✎ **Ju, Z.Y. & Kilara, A. (1998).** Textural properties of cold-set gels induced from heat-denatured whey protein isolates. *Journal of Food Science*, 63(2), 288-292.
- ✎ **Kalantzopoulos, G.C. (1993).** Cheeses from ewes' and goats' milk. En P.F. Fox, *Cheese: chemistry, physics and microbiology. Vol.II: Major cheese groups* (507-543). Londres: Chapman & Hall.
- ✎ **Kaluzny, M.A., Duncan, L.A., Merritt, M.V., & Epps, D.E. (1985).** Rapid separation of lipid classes in high-yield and purity using bonded phase columns. *Journal of Lipid Research*, 26(1), 135-140.

- ✎ **Karleskind, D., Laye, I., Mei, F.I., & Morr, C.V. (1995a).** Chemical pretreatment and microfiltration for making delipidized whey protein concentrate. *Journal of Food Science*, 60(2), 221-226.
- ✎ **Karleskind, D., Laye, I., Mei, F.I., & Morr, C.V. (1995b).** Gelation properties of lipid-reduced, and calcium-reduced whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 60(4), 731-737.
- ✎ **Karleskind, D., Laye, I., Mei, F.I., & Morr, C.V. (1995c).** Foaming properties of lipid-reduced and calcium-reduced whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 60(4), 738-741.
- ✎ **Karleskind, D., Laye, I., Morr, C.V., & Schenz, T.W. (1996).** Emulsifying properties of lipid-reduced, and calcium-reduced whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 61(1), 54-58.
- ✎ **Keeton, J. (2004).** Processed meat and fish applications for whey and lactose products: Whey protein and lactose products in processed meats. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, & A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products* (171-174). Acceso el 15/10/2010 en http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey_Lactose_Reference_Manual_Complete2_Optimized.pdf.
- ✎ **Kelly, P.M. (2003).** Membrane separation. En H. Roginski, J.W. Fuquay, & P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (Vol. 3) (1777-1786). Londres: Academic Press (Elsevier Science).
- ✎ **Keogh, M.K. & O'kenedy, B.T. (1998).** Rheology of stirred yogurt as affected by added milk fat, protein and hydrocolloids. *Journal of Food Science*, 63(1), 108-112.
- ✎ **Khwaldia, K., Perez, C., Banon, S., Desobry, S., & Hardy, J.O. (2004).** Milk proteins for edible films and coatings. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 239-251.
- ✎ **Kilara, A. & Vaghela, M.N. (2004).** Whey proteins. En R.D. Yada, *Proteins in food processing* (72-99). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- ✎ **Kim, Y.A., Chism, G.W.I., & Mangino, M.E. (1987).** Determination of the beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin and bovine serum albumin of whey protein concentrates and their relationship to protein functionality. *Journal of Food Science*, 52(1), 124-127.
- ✎ **Kim, H.J., Decker, E.A., & McClements, D.J. (2002).** Impact of protein surface denaturation on droplet flocculation in hexadecane oil-in-water emulsions stabilized by β -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(24), 7131-7137.
- ✎ **Kim, S.H., Morr, C.V., Seo, A., & Surak, J.G. (1989).** Effect of whey pretreatment on composition and functional properties of whey protein concentrate. *Journal of Food Science*, 54(1), 25-29.

Bibliografía

- ✎ Kitabatake, N. & Doi, E. (1993). Improvement of protein gel by physical and enzymatic treatment. *Food Reviews International*, 9(4), 445-471.
- ✎ Klemaszewski, J.L., Das, K.P., & Kinsella, J.E. (1992). Formation and coalescence stability of emulsions stabilized by different milk proteins. *Journal of Food Science*, 57(2), 366-371.
- ✎ Korhonen, H. & Marnila, P. (2003). Milk proteins: Lactoferrin. En H. Roginski, J.W. Fuquay, & P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (Vol. 3) (1946-1950). Londres: Academic Press (Elsevier Science).
- ✎ Korhonen, H. & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960.
- ✎ Krog, N. (2003). Emulsifiers and emulsions in dairy foods. En H. Roginski, J.W. Fuquay, & P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (Vol. 2) (891-900). Londres: Academic Press (Elsevier Science).
- ✎ Kruger, N.J. (1996). The Bradford method for protein quantification. En J.M. Walker, *The protein protocols handbook* (15-20). Totowa, New Jersey, USA: Humana Press Inc.
- ✎ Kuhn, P.R. & Foegeding, E.A. (1991). Mineral salt effects on whey protein gelation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(6), 1013-1016.
- ✎ Kulmyrzaev, A., Bryant, C., & McClements, D.J. (2000a). Influence of sucrose on the thermal denaturation, gelation, and emulsion stabilization of whey proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1593-1597.
- ✎ Kulmyrzaev, A., Sivestre, M.P.C., & McClements, D.J. (2000b). Rheology and stability of whey protein stabilized emulsions with high CaCl₂ concentrations. *Food Research International*, 33(1), 21-25.
- ✎ Kurt, S. & Zorba, O. (2005). The effects of different levels of non-fat dry milk and whey powder on emulsion capacity and stability of beef, turkey and chicken meats. *International Journal of Food Science & Technology*, 40(5), 509-516.
- ✎ Lagrange, V. & Pasin, G. (2004). Beverage applications for whey and lactose products: Whey proteins in dairy-based drinks. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, & A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products* (118-120). Acceso el 15/10/2010 en http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey_Lactose_Reference_Manual_Complete2_Optimized.pdf.
- ✎ Law, A.J.R. (1995). Heat denaturation of bovine, caprine and ovine whey proteins. *Milchwissenschaft*, 50(7), 384-388.
- ✎ Law, A.J.R. & Brown, J.R. (1994). Compositional changes in caprine whey proteins. *Milchwissenschaft*, 49(12), 674-678.
- ✎ Lawrence, R.J. (1993). Incorporation of whey proteins in cheese. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 9301, 79-87.

- ✎ **Lewis, M.J. (2008).** Separaciones en el procesado de alimentos. Procesos de membrana. En J.G. Brennan, *Manual del procesado de alimentos* (480-497). Zaragoza: Acribia S.A.
- ✎ **Ley 10/1998 de 21 de abril, de Residuos.** Boletín Oficial del Estado, del 22 de abril de 1998, número 96, páginas 13372 a 13384 (BOE-A-1998-9478).
- ✎ **Li, J. & Guo, M. (2006).** Effects of polymerized whey proteins on consistency and water-holding properties of goat's milk yogurt. *Journal of Food Science*, 71(1), C34-C38.
- ✎ **Liao, S.Y. & Mangino, M.E. (1987).** Characterization of the composition, physicochemical and functional properties of acid whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 52(4), 1033-1037.
- ✎ **Lieske, B. & Konrad, G. (1996).** Physico-chemical and functional properties of whey protein as affected by limited papain proteolysis and selective ultrafiltration. *International Dairy Journal*, 6(1), 13-31.
- ✎ **Liu, H., Xu, X.M., & Guo, S.D. (2007).** Rheological, texture and sensory properties of low-fat mayonnaise with different fat mimetics. *LWT-Food Science and Technology*, 40(6), 946-954.
- ✎ **Lizarraga, M.S., Piante Vicin, D.D., Gonzalez, R., Rubiolo, A., & Santiago, L.G. (2006).** Rheological behaviour of whey protein concentrate and λ -carrageenan aqueous mixtures. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 740-748.
- ✎ **Lloyd, B. (2004).** Nutritional products applications for whey products: Whey products in infant formula/child nutrition. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, & A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products* (202-204). Acceso el 15/10/2010 en http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey_Lactose_Reference_Manual_Complete2_Optimized.pdf.
- ✎ **Lorenzen, P.C. & Schrader, K. (2006).** A comparative study of the gelation properties of whey protein concentrate and whey protein isolate. *Le Lait*, 86(4), 259-271.
- ✎ **Lorient, D., Closs, B., & Caurthaudan, J.L. (1991).** Connaissances nouvelles sur les propriétés fonctionnelles des protéines du lait et des dérivés. *Le Lait*, 71(2), 141-171.
- ✎ **Lucas, A., Coulon, J.B., Agabriel, C., Chilliard, Y., & Rock, E. (2008).** Relationships between the conditions of goat's milk production and the contents of some components of nutritional interest in Rocamadour cheese. *Small Ruminant Research*, 74(1-3), 91-106.
- ✎ **Lucey, J.A. (2001).** The relationship between rheological parameters and whey separation in milk gels. *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), 603-608.
- ✎ **Lucey, J.A. (2002).** Formation and physical properties of milk protein gels. *Journal of Dairy Science*, 85(2), 281-294.

Bibliografía

- ✎ **Lucey, J.A., Teo, C.T., Munro, P.A., & Singh, H. (1997a).** Rheological properties at small (dynamic) and large (yield) deformations of acid gels made from heated milk. *Journal of Dairy Research*, 64(4), 591-600.
- ✎ **Lucey, J.A., Van Vliet, T., Grolle, K., Geurts, T., & Walstra, P. (1997b).** Properties of acid casein gels made by acidification with glucono- δ -lactone. 1. Rheological properties. *International Dairy Journal*, 7(6-7), 381-388.
- ✎ **Lucey, J.A. & Singh, H. (1998).** Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food Research International*, 30(7), 529-542.
- ✎ **Lucey, J.A., Munro, P.A., & Singh, H. (1998a).** Rheological properties and microstructure of acid milk gels as affected by fat content and heat treatment. *Journal of Food Science*, 63(4), 660-664.
- ✎ **Lucey, J.A., Tamehana, M., Singh, H., & Munro, P.A. (1998b).** A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono-delta-lactone. *Food Research International*, 31(2), 147-155.
- ✎ **Lucey, J.A., Tamehana, M., Singh, H., Munro, P.A., & Singh, H. (1998c).** Effect of interactions between denatured whey proteins and casein micelles on the formation and rheological properties of acid skim milk gels. *Journal of Dairy Research*, 65(4), 555-567.
- ✎ **Lucey, J.A., Munro, P.A., & Singh, H. (1999).** Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. *International Dairy Journal*, 9(3-6), 275-279.
- ✎ **Lucey, J.A., Tamehana, M., Singh, H., & Munro, P.A. (2000).** Rheological properties of milk gels formed by a combination of rennet and glucono- δ -lactone. *Journal of Dairy Research*, 67(03), 415-427.
- ✎ **Lucey, J.A., Tamehana, M., Singh, H., & Munro, P.A. (2001).** Effect of heat treatment on the physical properties of milk gels made with both rennet and acid. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 559-565.
- ✎ **Lupano, C.E., Dumay, E., & Cheftel, J.C. (1992).** Gelling properties of whey protein isolate: influence of calcium removal by dialysis or diafiltration at acid or neutral pH. *International Journal of Food Science and Technology*, 27(6), 615-628.
- ✎ **Lupano, C.E., Renzi, L.A., & Romera, V. (1996).** Gelation of whey protein concentrate in acidic conditions: effect of pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(10), 3010-3014.
- ✎ **Ma, L. & Barbosa-Cánovas, G.V. (1995).** Rheological characterization of mayonnaise. Part II: Flow and viscoelastic properties at different oil and xanthan gum concentrations. *Journal of Food Engineering*, 25(3), 409-425.

- ✎ Madrid, A. (1981). *Modernas técnicas de aprovechamiento del lactosuero*. Madrid: Iragra.
- ✎ Mahe, S., Roos, N., Benamouzig, R., Davin, L., Luengo, C., Gagnon, L., Gausserges, N., Rautureau, J., & Tome, D. (1996). Gastrojejunal kinetics and the digestion of [¹⁵N] β-lactoglobulin and casein in humans: the influence of the nature and quantity of the protein. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 63(4), 546-552.
- ✎ Mangino, M.E. (1984). Physicochemical aspects of whey protein functionality. *Journal of Dairy Science*, 67(11), 2711-2722.
- ✎ Mangino, M.E. (1992a). Gelation of whey protein concentrates. *Food Technology*, 46(1), 114-117.
- ✎ Mangino, M.E. (1992b). Properties of whey protein concentrates. En J.G. Zadow, *Whey and lactose processing* (231-270). Barking: Elsevier Science Publishers LTD.
- ✎ Mangino, M.E., Liao, Y.Y., Harper, N.J., Morr, C.V., & Zadow, J.G. (1987). Effects of heat processing on the functionality of whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 52(6), 1522-1524.
- ✎ Mangino, M.E., Huffman, L.M., & Regester, G.O. (1988). Changes in the hydrophobicity and functionality of whey during the processing of whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 53(6), 1684-1686.
- ✎ Marinova, K.G., Basheva, E.S., Nenova, B., Temelska, M., Mirarefi, A.Y., Campbell, B., & Ivanov, I.B. (2009). Physico-chemical factors controlling the foamability and foam stability of milk proteins: Sodium caseinate and whey protein concentrates. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1864-1876.
- ✎ Marnila, P. & Korhonen, H. (2003). Milk proteins: Immunoglobulins. En H. Roginski, J.W. Fuquay, & P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (Vol. 3) (1950-1956). Londres: Academic Press (Elsevier Science).
- ✎ Martín-Diana, A.B., Janer, C., Peláez, C., & Requena, T. (2003). Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 13(10), 827-833.
- ✎ Martín-Diana, A.B., Janer, C., Peláez, C., & Requena, T. (2004a). Effect of milk fat replacement by polyunsaturated fatty acids on the microbiological, rheological and sensorial properties of fermented milks. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(12), 1599-1605.
- ✎ Martín-Diana, A.B., Peláez, C., & Requena, T. (2004b). Rheological and structural properties of fermented goat's milk supplemented with caseinomacropptide and whey protein concentrate. *Milchwissenschaft*, 59(7-8), 383-386.
- ✎ Martínez, I., Angustias Riscardo, M., & Franco, J.M. (2007). Effect of salt content on the rheological properties of salad dressing-type emulsions stabilized by emulsifier blends. *Journal of Food Engineering*, 80(4), 1272-1281.

Bibliografía

- ✎ **Maruyama, K., Sakashita, T., Hagura, Y., & Suzuki, K. (2007).** Relationship between Rheology, Particle Size and Texture of Mayonnaise. *Food Science and Technology Research*, 13(1), 1-6.
- ✎ **Matsudomi, N., Oshita, T., Sasaki, E., & Kobayashi, K. (1992).** Enhanced heat-induced gelation of β -lactoglobulin by α -lactalbumin. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry (Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Biochemistry)*, 56(11), 1697-1700.
- ✎ **Matsudomi, N., Oshita, T., Kobayashi, K., & Kinsella, J.E. (1993).** α -Lactalbumin enhances the gelation properties of bovine serum albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(7), 1053-1057.
- ✎ **Matsudomi, N., Oshita, T., & Kobayashi, K. (1994).** Synergistic interaction between β -lactoglobulin and bovine serum albumin in heat-induced gelation. *Journal of Dairy Science*, 77(6), 1487-1493.
- ✎ **Matsumura, Y. & Mori, T. (1996).** Gelation. En G.M. Hall, *Methods of testing protein functionality* (76-109). London: Chapman & Hall.
- ✎ **Maubois, J.L., Pierre, A., Fauquant, J., & Piot, M. (1987).** Industrial fractionation of main whey proteins. *Bulletin of the IDF*, 212, 154-159.
- ✎ **McBean, L. (2004).** Nutritional properties of whey, lactose, and milk minerals products: Nutritional and physiological properties of lactose. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, & A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products* (79). Acceso el 15/10/2010 en http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey_Lactose_Reference_Manual_Complete2_Optimized.pdf.
- ✎ **McClements, D.J. (2008).** Whey protein-stabilized emulsions. En C.I. Onwulata & P.J. Huth, *Whey processing, functionality and health benefits* (63-97). Iowa: Wiley-Blackwell IFT press.
- ✎ **McCrae, C.H., Law, A.J.R., & Leaver, J. (1999).** Emulsification properties of whey proteins in their natural environment: effect of whey protein concentration at 4 and 18% milk fat. *Food Hydrocolloids*, 13(5), 389-399.
- ✎ **McDonough, F.E., Hargrove, R.E., Mattingly, W.A., Posati, L.P., & Alford, J.A. (1974).** Composition and properties of whey protein concentrates from ultrafiltration. *Journal of Dairy Science*, 57(12), 1438-1443.
- ✎ **Mehra, R. & O'Kennedy, B.T. (2008).** Separation of β -Lactoglobulin from whey: Its physico-chemical properties and potential uses. En C.I. Onwulata & P.J. Huth, *Whey processing, functionality and health benefits* (39-62). Iowa: Wiley-Blackwell IFT press.
- ✎ **Mei, F.I., Laye, I., Karleskind, D., & Morr, C.V. (1996).** Gelation of calcium-reduced and lipid-reduced whey protein concentrates as affected by total and ionic mineral concentrations. *Journal of Food Science*, 61(5), 899-905.

- ✎ Mistry, V.V. & Maubois, J.L. (1993). Application of membrane separation technology to cheese production. En P.F. Fox, *Cheese: chemistry, physics and microbiology. Vol.I: General aspects* (493-522). Londres: Chapman & Hall.
- ✎ Moatsou, G., Hatzinaki, A., Samolada, M., & Anifantakis, E. (2005). Major whey proteins in ovine and caprine acid wheys from indigenous greek breeds. *International Dairy Journal*, 15(2), 123-131.
- ✎ Modler, H.W., Larmond, M.E., Lin, C.S., Froehlich, D., & Emmons, B. (1983). Physical and sensory properties of yogurt stabilized with milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 66(3), 422-429.
- ✎ Monahan, F.J., McClements, D.J., & Kinsella, J.E. (1993). Polymerization of whey proteins in whey protein-stabilized emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(11), 1826-1829.
- ✎ Morand-Fehr, P., Boutonnet, J.P., Devendra, C., Dubeuf, J.P., Haenlein, G.F.W., Holst, P., Mowlem, L., & Capote, J. (2004). Strategy for goat farming in the 21st century. *Small Ruminant Research*, 51(2), 175-183.
- ✎ Moreno-Indias, I., Castro, N., Morales-delaNuez, A., Sanchez-Macias, D., Assuncao, P., Capote, J., & Arguello, A. (2009). Farm and factory production of goat cheese whey results in distinct chemical composition. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4792-4796.
- ✎ Moros, J.E., Franco, J.M., & Gallegos, C. (2002). Rheology of spray-dried egg yolk-stabilized emulsions. *International Journal of Food Science & Technology*, 37(3), 297-307.
- ✎ Morr, C.V. (1985). Composition, physicochemical and functional properties of reference whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 50(5), 1406-1411.
- ✎ Morr, C.V. (1989). Beneficial and adverse effects of water-protein interactions in selected dairy products. *Journal of Dairy Science*, 72(2), 575-580.
- ✎ Morr, C.V. (1992a). Improving the texture and functionality of whey protein concentrate. *Food Technology*, 46(1), 110-113.
- ✎ Morr, C.V. (1992b). Whey utilization. En J.G. Zadow, *Whey and lactose processing* (133-155). Barking: Elsevier Science Publishers LTD.
- ✎ Morr, C.V., German, B., Kinsella, J.E., Regenstein, J.M., Van Buren, J.P., Kilara, A., Lewis, B.A., & Mangino, M.E. (1985). A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *Journal of Food Science*, 50(6), 1715-1728.
- ✎ Morr, C.V. & Foegeding, E.A. (1990). Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: a status report. *Food Technology*, 44(4), 100-112.

Bibliografía

- ✎ **Morr, C.V. & Ha, E.Y.W. (1993).** Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(6), 431-431.
- ✎ **Morris, P.E. & FitzGerald, R.J. (2008).** Whey proteins and peptides in human health. En C.I. Onwulata & P.J. Huth, *Whey processing, functionality and health benefits* (285-384). Iowa: Wiley-Blackwell IFT press.
- ✎ **Moulin, G. & Galzy, P. (1984).** Whey, a potential substrate for biotechnology. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 1, 347-374.
- ✎ **Mulvihill, D.M. (1992).** Production, functional properties and utilization of milk protein products. En P.F. Fox, *Advanced Dairy Chemistry, Vol I: Proteins* (369-404). London: Elsevier Science Publishers.
- ✎ **Mulvihill, D.M. & Kinsella, J.E. (1987).** Gelation characteristics of whey proteins and beta-lactoglobulin. *Food Technology*, 41(9), 103-111.
- ✎ **Mulvihill, D.M. & Kinsella, J.E. (1988).** Gelation of β -lactoglobulin: effects of sodium chloride and calcium chloride on the rheological and structural properties of gels. *Journal of Food Science*, 53(1), 231-236.
- ✎ **Muñoz, J., Alfaro, M.C., & Zapata, I. (2007).** Avances en la formulación de emulsiones. *Grasas y Aceites*, 58(1), 64-73.
- ✎ **Musale, D.A. & Kulkarni, S.S. (1998).** Effect of whey composition on ultrafiltration performance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(11), 4717-4722.
- ✎ **Mutilangi, W.A.M., Panyam, D., & Kilara, A. (1996).** Functional properties of hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey protein isolate. *Journal of Food Science*, 61(2), 270-275.
- ✎ **Nakai, S. (1983).** Structure-function relationships of food proteins: with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(4), 676-683.
- ✎ **Needs, E.C., Capellas, M., Bland, A.P., Manoj, P., MacDougall, D., & Paul, G. (2000).** Comparison of heat and pressure treatments of skim milk, fortified with whey protein concentrate, for set yogurt preparation: effects on milk proteins and gel structure. *Journal of Dairy Research*, 67(3), 329-348.
- ✎ **Ng-Kwai-Hang, K.F. (2003).** Milk proteins: Heterogeneity, fractionation and isolation. En H. Roginski, J.W. Fuquay, & P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (Vol. 3) (1881-1894). Londres: Academic Press (Elsevier Science).
- ✎ **Nielsen, P.S. (1988).** *Membrane filtration for whey protein concentrate*. Aarhus, Dinamarca: APV Pasilac AS.
- ✎ **Oakenfull, D., Pearce, J., & Burley, R.W. (1997).** Protein Gelation. En S. Damodaran & A. Paraf, *Food proteins and their applications* (111-142). New York: Marcel Dekker, Inc.

- ✎ O'Brien, R.D. (2009). *Fats and oils: formulating and processing for applications*. United States of America: CRC Press Taylor & Francis Group.
- ✎ Ofstad, R., Langsrud, Ø., Nyvold, T.E., Enersen, G., Høst, V., Pilman Willers, E., Nordvi, B., & Egelanddal, B. (2005). Heat processed whey-protein food emulsions and growth of shear-induced cracks during cooling. *Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie*, 38(1), 29-39.
- ✎ Onwulata, C.I. (2008). Milk whey processes: Current and future trends. En C.I. Onwulata & P.J. Huth, *Whey processing, functionality and health benefits* (369-389). Iowa: Wiley-Blackwell IFT press.
- ✎ Ordóñez, J.A., Cambero, M.I., Fernández, L., García, M.L., García de Fernando, G.D., Hoz, L., & Selgas, M.D. (1998). Proteínas. En J.A. Ordóñez, *Tecnología de los alimentos. Vol I. Componentes de los alimentos y procesos*. (59-75). Madrid: Editorial Síntesis.
- ✎ Ostojić, S., Pavlović, M., Živić, M., Filipović, Z., Gorjanović, S., Hranisavljević, S., & Dojčinović, M. (2005). Processing of whey from dairy industry waste. *Environmental Chemistry Letters*, 3(1), 29-32.
- ✎ Pal, D. (1993a). Membrane techniques: Principles of ultrafiltration. En R. Macrae, R. Robinson, & M. Sadler, *Encyclopedia of food science, food technology and nutrition* (2975-2980). Orlando: Academic Press.
- ✎ Pal, D. (1993b). Membrane techniques: Applications of ultrafiltration. En R. Macrae, R. Robinson, & M. Sadler, *Encyclopedia of food science, food technology and nutrition* (2980-2985). Orlando: Academic Press.
- ✎ Park, Y.W. (1990). Nutrient profiles of commercial goat milk cheeses manufactured in the United States. *Journal of Dairy Science*, 73(11), 3059-3067.
- ✎ Park, Y.W. (2006). Goat milk. Chemistry and nutrition. En Y.W. Park & G.F.W. Haenlein, *Handbook of milk of non-bovine mammals* (34-58). Londres: Blackwell Publishing.
- ✎ Park, Y.W. & Haenlein, G.F.W. (2006). Overview of milk of non-bovine mammals. En Y.W. Park & G.F.W. Haenlein, *Handbook of milk of non-bovine mammals* (3-9). Londres: Blackwell Publishing.
- ✎ Park, Y.W. & Guo, M. (2006). Goat milk. Goat milk products: Types of products, manufacturing, technology, chemical composition, and marketing. En Y.W. Park & G.F.W. Haenlein, *Handbook of milk of non-bovine mammals* (59-106). Londres: Blackwell Publishing.
- ✎ Park, Y.W., Juárez, M., Ramos, M., & Haenlein, G.F.W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68(1-2), 88-113.

Bibliografía

- ✎ **Pasin, G. & Miller, S. (2000).** Nutritional properties of whey, lactose, and milk minerals products: Whey protein and sports nutrition. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, & A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products* (64-67). Acceso el 15/10/2010 en http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey_Lactose_Reference_Manual_Complete2_Optimized.pdf.
- ✎ **Patel, M.T. & Kilara, A. (1990).** Studies on whey protein concentrates. 2. Foaming and emulsifying properties and their relationships with physicochemical properties. *Journal of Dairy Science*, 73(10), 2731-2740.
- ✎ **Patel, M.T., Kilara, A., Huffman, L.M., Hewitt, S.A., & Houlihan, A.V. (1990).** Studies on whey protein concentrates. 1. Compositional and thermal properties. *Journal of Dairy Science*, 73(6), 1439-1449.
- ✎ **Paulsson, M., Hegg, P.O., & Castberg, H.B. (1986).** Heat-induced gelation of individual whey proteins. A dynamic rheological study. *Journal of Food Science*, 51(1), 87-90.
- ✎ **Paulsson, M., Dejmek, P., & Van Vliet, T. (1990).** Rheological properties of heat-induced β -Lactoglobulin gels. *Journal of Dairy Science*, 73(1), 45-53.
- ✎ **Pearce, R.J. (1992a).** Whey processing. En J.G. Zadow, *Whey and lactose processing* (73-89). Barking: Elsevier Science Publishers LTD.
- ✎ **Pearce, R.J. (1992b).** Whey protein recovery and whey protein fractionation. En J.G. Zadow, *Whey and lactose processing* (271-316). Barking: Elsevier Science Publishers LTD.
- ✎ **Pearce, K.N. & Kinsella, J.E. (1978).** Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(3), 716-723.
- ✎ **Pearce, R.J., Marshall, S.C., & Dunkerley, J.A. (1991).** Reduction of lipids in whey protein concentrates-effect on functional properties. En *New Applications of Membrane Processes. IDF Special Issue*, 9201, 118-129.
- ✎ **Peltonen-Shalaby, R. & Mangino, M.E. (1986).** Compositional factors that affect the emulsifying and foaming properties of whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 51(1), 91-95.
- ✎ **Pereira, C.D., Díaz, O., & Cobos, A. (2002).** Valorization of by-products from ovine cheese manufacture: clarification by thermocalcic precipitation. *International Dairy Journal*, 12(9), 773-783.
- ✎ **Pereira, C.D., Díaz, O., & Cobos, A. (2007).** Impact of ovine whey protein concentrates and clarification by-products on the yield and quality of whey cheese. *Food Technology and Biotechnology*, 45(1), 32-37.

- ✦ Pesta, G., Meyer-Pittroff, R., & Russ, W. (2007). Utilization of whey. En V. Oreopoulou & W. Russ, *Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry* (193-207). New York, USA: Springer.
- ✦ Philippopoulos, C.D. & Papadakis, M.T. (2001). Current trends in whey processing and utilization in Greece. *International Journal of Dairy Technology*, 54(1), 14-19.
- ✦ Phillips, L.G., Haque, Z., & Kinsella, J.E. (1987). A method for the measurement of foam formation and stability. *Journal of Food Science*, 52(4), 1074-1077.
- ✦ Phillips, L.G., German, J.B., Oneill, T.E., Foegeding, E.A., Harwalkar, V.R., Kilara, A., Lewis, B.A., Mangino, M.E., Morr, C.V., Regenstein, J.M., Smith, D.M., & Kinsella, J.E. (1990). Standardized procedure for measuring foaming properties of three proteins, a collaborative study. *Journal of Food Science*, 55(5), 1441-1453.
- ✦ Phillips, L.G., Yang, S.T., & Kinsella, J.E. (1991). Neutral salt effects on stability of whey protein isolate foams. *Journal of Food Science*, 56(2), 588-589.
- ✦ Pintado, M.E. & Malcata, F.X. (1996). Effect of thermal treatment on the protein profile of whey from ovine and caprine milk throughout lactation. *International Dairy Journal*, 6(5), 497-518.
- ✦ Pintado, M.E., Lopes da Silva, J.A., & Malcata, F.X. (1999). Comparative characterization of whey protein concentrates from ovine, caprine and bovine breeds. *Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie*, 32(4), 231-237.
- ✦ Pintado, M.E., Macedo, A.C., & Malcata, F.X. (2001). Review: Technology, chemistry and microbiology of whey cheeses. *Food Science and Technology International*, 7(2), 105-116.
- ✦ Písecký, J. (2004). Spray drying in the cheese industry. IDF Symposium on cheese: Ripening, characterization & technology. Acceso el 16/02/2009 en <http://www.niro.com/niro/cmsdoc.nsf/WebDoc/ndkw5ywael?opendocument&q=pisecky>.
- ✦ Pordesimo, L.O. & Onwulata, C.I. (2008). Whey texturization for snacks. En C.I. Onwulata & P.J. Huth, *Whey processing, functionality and health benefits* (169-184). Iowa: Wiley-Blackwell IFT press.
- ✦ Pour-El, A. (1981). Protein functionality: classification, definition, and methodology. En J.P. Cherry, *Protein functionality in foods* (1-19). Washington, D.C.: American Chemical Society.
- ✦ Pringle, H. (1998). Neolithic agriculture: The slow birth of agriculture. *Science*, 282(5393), 1446-1446.
- ✦ Puvanenthiran, A., Williams, R.P.W., & Augustin, M.A. (2002). Structure and visco-elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal*, 12(4), 383-391.

Bibliografía

- ✎ Puyol, P., Cotter, P.F., & Mulvihill, D.M. (1999a). Thermal gelation of commercial whey protein concentrate: influence of pH 4.6 insoluble protein on thermal gelation. *International Journal of Dairy Technology*, 52(3), 81-91.
- ✎ Puyol, P., Pérez, M.D., & Calvo, M. (1999b). Rheological properties of commercial whey protein samples from the MADGELAS survey. *International Journal of Food Science & Technology*, 34(5-6), 565-572.
- ✎ Quiles, A. & Hevia, M.L. (1994). *La leche de cabra*. Murcia: Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Murcia.
- ✎ Quiles, A., Gonzalo, C., Barcina, Y., Fuentes, F., & Hevia, M. (1994). Protein quality of spanish murciano-granadina goat milk during lactation. *Small Ruminant Research*, 14(1), 67-72.
- ✎ Radford, J.B., Galpin, D.B., & Parkin, M.F. (1986). Utilization of whey as a fertilizer replacement for dairy pasture. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 21, 65-72.
- ✎ Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas. Boletín Oficial del Estado, 24 de julio de 2001, número 176, páginas 26791 a 2681 (BOE-A-2001-14276).
- ✎ Regester, G.O. & Smithers, G.W. (1991). Seasonal changes in the β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin, glycomacropeptide, and casein content of whey protein concentrate. *Journal of Dairy Science*, 74(3), 796-802.
- ✎ Regester, G.O., Smithers, G.W., Mangino, M.E., & Pearce, R.J. (1992). Seasonal changes in the physical and functional properties of whey protein concentrates. *Journal of Dairy Science*, 75(11), 2928-2936.
- ✎ Remeuf, F., Mohammed, S., Sodini, I., & Tissier, J.P. (2003). Preliminary observations on the effects of milk fortification and heating on microstructure and physical properties of stirred yogurt. *International Dairy Journal*, 13(9), 773-782.
- ✎ Renner, E. (1992). Nutritional aspects. En J.G. Zadow, *Whey and lactose processing* (449-471). Barking: Elsevier Science Publishers LTD.
- ✎ Renner, E. & Abd El-Salam, M.H. (1991). *Applications of ultrafiltration in the dairy industry*. Londres: Elsevier Applied Science.
- ✎ Rich, L.M. & Foegeding, E.A. (2000). Effects of sugars on whey protein isolate gelation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 5046-5052.
- ✎ Riera, F.A., Álvarez, R., Arguello, M.A., & Cabero, M. (1996a). Fraccionamiento y aprovechamiento de proteínas del suero lácteo (I). Propiedades físico-químicas y biológicas de las proteínas. *ILE*, 206(abril), 49-61.
- ✎ Riera, F.A., Álvarez, R., Arguello, M.A., & Cabero, M. (1996b). Fraccionamiento y aprovechamiento de proteínas del suero lácteo (II). Métodos de fraccionamiento mediante tecnologías con membranas. *ILE*, 208(junio), 33-44.

- ✦ **Rinn, J.C., Morr, C.V., Seo, A., & Surak, J.G. (1990).** Evaluation of nine semi-pilot scale whey pretreatment modifications for producing whey protein concentrate. *Journal of Food Science*, 55(2), 510-515.
- ✦ **Riscardo, M.A., Moros, J.E., Franco, J.M., & Gallegos, C. (2005).** Rheological characterisation of salad-dressing-type emulsions stabilised by egg yolk/sucrose distearate blends. *European Food Research and Technology*, 220(3), 380-388.
- ✦ **Rivas, H.J. & Sherman, P. (1983).** Soy and meat proteins as food emulsion stabilizers 1. Viscoelastic properties of corn oil-in-water emulsions incorporating soy or meat proteins. *Journal of Texture Studies*, 14(3), 251-265.
- ✦ **Robin, O., Turgeon, S., & Paquin, P. (1993).** Functional properties of milk proteins. En Y.H. Hui, *Dairy science and technology handbook. Vol. 1: Principles and properties* (277-353). New York: VCH Publishers Inc.
- ✦ **Robinson, R.K. (2003).** Fermented milks: Yoghurt types and manufacture. En H. Roginski, J.W. Fuquay, & P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (Vol. 2) (1055-1058). Londres: Academic Press (Elsevier Science).
- ✦ **Rosenberg, M. (1995).** Current and future applications for membrane processes in the dairy industry. *Trends in Food Science & Technology*, 6(1), 12-19.
- ✦ **Saxholt, E., Christensen, A.T., Møller, A., Hartkopp, H.B., Hess Ygil, K., & Hels, O.H. (2009).** Whey, sweet fluid. Danish Food Composition Databank, revision 7. Department of Nutrition, National Food Institute, Technical University of Denmark. Acceso el 20/02/2009 en http://www.foodcomp.dk/v7/fcdb_details.asp?FoodId=0515.
- ✦ **Schmidt, R.H. & Illingworth, B.L. (1978).** Gelation properties of whey-protein and blended protein systems. *Food Product Development*, 12(10), 60.
- ✦ **Schmidt, R.H. & Morris, H.A. (1984).** Gelation properties of milk proteins, soy proteins, and blended protein systems. *Food Technology*, 38(5), 85-94.
- ✦ **Schmidt, R.H., Packard, V.S., & Morris, H.A. (1984).** Effect of processing on whey protein functionality. *Journal of Dairy Science*, 67(11), 2723-2733.
- ✦ **Schmidt, R.H., Smith, D.E., Packard, V.S., & Morris, H.A. (1986).** Compositional and selected functional properties of whey protein concentrates and lactose-hydrolyzed whey protein concentrates. *Journal of Food Protection*, 49, 192-195.
- ✦ **Schorsch, C., Wilkins, D.K., Jones, M.G., & Norton, I.T. (2001).** Gelation of casein-whey mixtures: effects of heating whey proteins alone or in the presence of casein micelles. *Journal of Dairy Research*, 68(03), 471-481.
- ✦ **Scott, R. (1991).** *Fabricación de queso*. Zaragoza: Acibia S.A.
- ✦ **Sedmak, J.J. & Grossberg, S.E. (1977).** A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Analytical Biochemistry*, 79(1-2), 544-552.

Bibliografía

- ✎ Shimada, K. & Cheftel, J.C. (1988). Texture characteristics, protein solubility, and sulfhydryl group/disulfide bond contents of heat-induced gels of whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(5), 1018-1025.
- ✎ Shimada, K. & Cheftel, J.C. (1989). Sulfhydryl group/disulfide bond interchange reactions during heat-induced gelation of whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(1), 161-168.
- ✎ Shimizu, M., Kamiya, T., & Yamauchi, K. (1981). The adsorption of whey proteins on the surface of emulsified fat. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(11), 2491-2496.
- ✎ Shimizu, M., Saito, M., & Yamauchi, K. (1985). Emulsifying and structural properties of β -Lactoglobulin at different pHs. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(1), 189-194.
- ✎ Shoemaker, C.F., Nantz, J., Bonnans, S., & Noble, A.C. (1992). Rheological characterization of dairy products. *Food Technology*, 46(1), 98-104.
- ✎ Singh, H. (2003). Milk proteins: Functional properties. En H. Roginski, J.W. Fuquay, & P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (Vol. 3) (1976-1982). Londres: Academic Press (Elsevier Science).
- ✎ Slack, A.W., Amundson, C.H., & Hill, C.G. (1986). Foaming and emulsifying characteristics of fractionated whey protein. *Journal of Food Processing and Preservation*, 10(2), 81-88.
- ✎ Smith, K. (2004). Production technologies. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, & A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products* (19-26). Acceso el 15/10/2010 en http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey_Lactose_Reference_Manual_Complete2_Optimized.pdf.
- ✎ Smithers, G.W. (2008). Whey and whey proteins - From 'gutter-to-gold'. *International Dairy Journal*, 18(7), 695-704.
- ✎ Sodini, I., Remeuf, F., Haddad, S., & Corrieu, G. (2004). The relative effect of milk base, starter, and process on yogurt texture: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(2), 113-137.
- ✎ Sodini, I., Montella, J., & Tong, P.S. (2005). Physical properties of yogurt fortified with various commercial whey protein concentrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(5), 853-859.
- ✎ Sodini, I., Mattas, J., & Tong, P.S. (2006). Influence of pH and heat treatment of whey on the functional properties of whey protein concentrates in yoghurt. *International Dairy Journal*, 16(12), 1464-1469.
- ✎ Stading, M. & Hermansson, A.M. (1991). Large deformation properties of β -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids*, 5(4), 339-352.

- ✎ **Staples, K. (2006).** Gut health and whey products. Nutrition monograph. Acceso el 15/01/2010 en http://www.usdec.org/files/PDFs/2008Monographs/GutHealth_English.pdf.
- ✎ **Sternberg, M., Chiang, J.P., & Eberts, N.J. (1976).** Cheese whey proteins isolated with polyacrylic-acid. *Journal of Dairy Science*, 59(6), 1042-1050.
- ✎ **Steventon, A.J., Gladden, L.F., & Fryer, P.J. (1991).** A percolation of the concentration dependence of the gelation of whey protein concentrates. *Journal of Texture Studies*, 22(2), 201-218.
- ✎ **Sullivan, S.T., Khan, S.A., & Eissa, A.S. (2008).** Whey proteins: Functionality and foaming under acidic conditions. En C.I. Onwulata & P.J. Huth, *Whey processing, functionality and health benefits* (99-132). Iowa: Wiley-Blackwell IFT press.
- ✎ **Surh, J., Ward, L.S., & McClements, D.J. (2006).** Ability of conventional and nutritionally-modified whey protein concentrates to stabilize oil-in-water emulsions. *Food Research International*, 39(7), 761-771.
- ✎ **Swaisgood, H.E. (1982).** Chemistry of milk proteins. En P.F. Fox, *Developments in dairy chemistry, 1. Proteins* (63-110). Londres: Elsevier Applied Science Publishers.
- ✎ **Tabilo-Munizaga, G. & Barbosa-Cánovas, G.V. (2005).** Rheology for the food industry. *Journal of Food Engineering*, 67(1-2), 147-156.
- ✎ **Tamime, A.Y. & Robinson, R.K. (2007).** *Yoghurt: Science and technology*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.
- ✎ **Tang, Q., McCarthy, O.J., & Munro, P.A. (1994).** Oscillatory rheological comparison of the gelling characteristics egg white, whey protein concentrates, whey protein isolate, and β -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(10), 2126-2130.
- ✎ **Tang, Q., McCarthy, O.J., & Munro, P.A. (1995).** Oscillatory rheological study of the effects of pH and salts on gel development in heated whey protein concentrate solutions. *Journal of Dairy Research*, 62(3), 469-477.
- ✎ **Thomas, M.E.C., Scher, J., Desobry-Banon, S., & Desobry, S. (2004).** Milk powders ageing: Effect on physical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(5), 297-322.
- ✎ **Thompson, L.U. & Reniers, D.J. (1982).** Succinylated cheese whey protein concentrate in coffee whitener and salad dressing. *Journal of Dairy Science*, 65(7), 1135-1140.
- ✎ **Tomasula, P.M. & Yee, W.C.F. (2001).** Enriched fractions of alpha-lactalbumin(α -la) and beta-lactoglobulin (β -lg) from whey protein concentrate using carbon dioxide. Functional properties in aqueous solution 1. *Journal of Food Processing and Preservation*, 25(4), 267-282.

Bibliografía

- ✎ **Tong, P.S. (2004).** Dairy applications for whey and lactose products: Lactose and other whey products in protein standardization of milk. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, & A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products* (161-162). Acceso el 15/10/2010 en http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey_Lactose_Reference_Manual_Complete2_Optimized.pdf).
- ✎ **Tornberg, E. & Hermansson, A.M. (1977).** Functional characterization of protein stabilized emulsions: Effect of processing. *Journal of Food Science*, 42(2), 468-472.
- ✎ **Trujillo, A.J., Guamis, B., & Carretero, C. (1997).** Las proteínas mayoritarias de la leche de cabra. *Alimentaria*, 285(Septiembre), 19-28.
- ✎ **Tunick, M.H. (2008).** Whey protein production and utilization: a brief history. En C.I. Onwulata & P.J. Huth, *Whey processing, functionality and health benefits* (1-13). Iowa: Wiley-Blackwell IFT press.
- ✎ **Turgeon, S.L., Sanchez, C., Gauthier, S.F., & Paquin, P. (1996).** Stability and rheological properties of salad dressing containing peptidic fractions of whey proteins. *International Dairy Journal*, 6(6), 645-658.
- ✎ **Twomey, M., Keogh, M.K., Mehra, R., & O'Kennedy, T. (1997).** Gel characteristics of β -lactoglobulin, whey protein concentrate and whey protein isolate. *Journal of Texture Studies*, 28(4), 387-403.
- ✎ **Tziboula-Clarke, A. (2003).** Goat milk. En H. Roginski, J.W. Fuquay, & P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (Vol. 2) (1270-1279). Londres: Academic Press (Elsevier Science).
- ✎ **U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. (2004).** USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 17. Nutrient Data Laboratory Home Page. Acceso el 20/02/2009 en http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl.
- ✎ **U.S.D.E.C. (United States Dairy Export Council). (2004a).** Whey products definition, composition, functions. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, & A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products* (27-40). Acceso el 15/10/2010 en http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey_Lactose_Reference_Manual_Complete2_Optimized.pdf).
- ✎ **U.S.D.E.C. (United States Dairy Export Council). (2004b).** Lactose products definition, composition, functions. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, & A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products* (41-48). Acceso el 15/10/2010 en http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey_Lactose_Reference_Manual_Complete2_Optimized.pdf).
- ✎ **Utrilla, R.M., Juárez, M., & Martínez, I. (1976).** El factor tiempo en la conversión de grasa en ésteres metílicos. *Grasas y Aceites*, 27, 323-327.

- ✎ **Vaghela, M.N. & Kilara, A. (1995).** A rapid method for extraction of total lipids from whey protein concentrates and separation of lipid classes with solid phase extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72(10), 1117-1121.
- ✎ **Vaghela, M.N. & Kilara, A. (1996a).** Foaming and emulsifying properties of whey protein concentrates as affected by lipid composition. *Journal of Food Science*, 61(2), 275-280.
- ✎ **Vaghela, M.N. & Kilara, A. (1996b).** Lipid composition of whey protein concentrates manufactured commercially and in the laboratory. *Journal of Dairy Science*, 79(7), 1172-1183.
- ✎ **Vardhanabhuti, B., Foegeding, E.A., McGuffey, M.K., Daubert, C.R., & Swaisgood, H.E. (2001).** Gelation properties of dispersions containing polymerized and native whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 15(2), 165-175.
- ✎ **Vargas, M., Cháfer, M., Albors, A., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2008).** Physicochemical and sensory characteristics of yoghurt produced from mixtures of cows' and goats' milk. *International Dairy Journal*, 18(12), 1146-1152.
- ✎ **Varunsatian, S., Watanabe, K., Hayakawa, S., & Nakamura, R. (1983).** Effects of Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ and Na⁺ on heat aggregation of whey-protein concentrates. *Journal of Food Science*, 48(1), 42-46.
- ✎ **Veisseyre, R. (1988).** *Lactología técnica: composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche*. Zaragoza: Acribia S.A.
- ✎ **Veith, P.D. & Reynolds, E.C. (2004).** Production of a high gel strength whey protein concentrate from cheese whey. *Journal of Dairy Science*, 87(4), 831-840.
- ✎ **Verheul, M. & Roefs, S.P.F.M. (1998).** Structure of whey protein gels, studied by permeability, scanning electron microscopy and rheology. *Food Hydrocolloids*, 12(1), 17-24.
- ✎ **Vlahopoulou, I., Bell, A.E., & Wilbey, R.A. (2001).** Effects of starter culture and its exopolysaccharides on the gelation of glucono-delta-lactone-acidified bovine and caprine milk. *International Journal of Dairy Technology*, 54(4), 135-140.
- ✎ **Vojdani, F. (1996).** Solubility. En G.M. Hall, *Methods of testing protein functionality* (11-60). London: Chapman & Hall.
- ✎ **Walstra, P., Wouters, J.T.M., & Geurts, T.J. (2006).** *Dairy science and technology*. United States of America: CRC Press Taylor & Francis Group.
- ✎ **Walzem, R. (2004).** Nutritional properties of whey, lactose, and milk minerals products: Nutritional properties of whey products. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, & A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products* (53-57). Acceso el 15/10/2010 en http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey_Lactose_Reference_Manual_Complete2_Optimized.pdf.

Bibliografía

- ✎ **Walzem, R.L., Dillard, C.J., & German, J.B. (2002).** Whey components: Millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: What we know and what we may be overlooking. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(4), 353-375.
- ✎ **Westergaard, V. (2010).** Milk powder technology. Evaporation and spray drying. Acceso el 15/01/2010 en [http://www.niro.com/niro/cmsresources.nsf/filenames/en_Milk-Powder-Technology-Book_All.pdf/\\$file/en_Milk-Powder-Technology-Book_All.pdf](http://www.niro.com/niro/cmsresources.nsf/filenames/en_Milk-Powder-Technology-Book_All.pdf/$file/en_Milk-Powder-Technology-Book_All.pdf).
- ✎ **Wilde, P.J. & Clark, D.C. (1996).** Foam formation and stability. En G.M. Hall, *Methods of testing protein functionality* (111-152). London: Chapman & Hall.
- ✎ **Yamauchi, K., Shimizu, M., & Kamiya, T. (1980).** Emulsifying properties of whey proteins. *Journal of Food Science*, 45(5), 1237-1242.
- ✎ **Yamul, D.K. & Lupano, C.E. (2003).** Properties of gels from whey protein concentrate and honey at different pHs. *Food Research International*, 36(1), 25-33.
- ✎ **Ye, A. & Singh, H. (2000).** Influence of calcium chloride addition on the properties of emulsions stabilized by whey protein concentrate. *Food Hydrocolloids*, 14(4), 337-346.
- ✎ **Young, S. (2004a).** Dairy applications for whey and lactose products: Whey products in cold pack and pasteurized processed cheeses. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, & A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products* (147-150). Acceso el 15/10/2010 en http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey_Lactose_Reference_Manual_Complete2_Optimized.pdf.
- ✎ **Young, S. (2004b).** Dairy applications for whey and lactose products: Whey products in ice cream and frozen desserts. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, & A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products* (156-160). Acceso el 15/10/2010 en http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey_Lactose_Reference_Manual_Complete2_Optimized.pdf.
- ✎ **Zall, R.R. (1992).** Sources and composition of whey and permeate. En J.G. Zadow, *Whey and lactose processing* (1-72). Barking: Elsevier Science Publishers LTD.
- ✎ **Zayas, J.F. (1997).** *Functionality of proteins in food*. Berlin: Springer-Verlag.
- ✎ **Zeder, M.A. & Hesse, B. (2000).** The initial domestication of goats (*Capra hircus*) in the Zagros Mountains 10,000 years ago. *Science*, 287(5461), 2254.
- ✎ **Zhang, Y. & Brew, K. (2003).** Milk proteins: Alpha-Lactalbumin. En H. Roginski, J.W. Fuquay, & P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (Vol. 3) (1924-1932). Londres: Academic Press (Elsevier Science).
- ✎ **Zhu, H. & Damodaran, S. (1994a).** Effects of calcium and magnesium ions on aggregation of whey protein isolate and its effect on foaming properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(4), 856-862.
- ✎ **Zhu, H. & Damodaran, S. (1994b).** Proteose peptones and physical factors affect foaming properties of whey protein isolate. *Journal of Food Science*, 59(3), 554-560.