



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA APLICADA Y
TECNOLOGÍA AVANZADA**

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LOS BIOPOLÍMEROS CASEÍNA Y
ALMIDÓN POR EL PROCESO DE EXTRUSIÓN**

TESIS QUE PRESENTA:

M. en C. JAIME ANTONIO FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ

COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
EN TECNOLOGÍA AVANZADA

México, D. F. Noviembre. del 2004



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 11:00 horas del día 21 del mes de octubre del 2004 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA-IPN para examinar la tesis de grado titulada: **“Estudio de la Interacción de los biopolímeros caseína y almidón por el proceso de extrusión”**

Presentada por el alumno:

FERNANDEZ
Apellido paterno

GUTIERREZ
materno

JAIME ANTONIO
nombre(s)

Con registro:

0	0	0	6	9	0
---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de: **DOCTORADO EN TECNOLOGÍA AVANZADA**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

El Director de Tesis

Dr. Eduardo San Martín Martínez

El Coodirector de Tesis

Dr. Fernando Martínez Bustos

Dr. Alfredo Cruz Orea

Dra. Rocío A. Muñoz Henández

Dr. Samuel Siles Alvarado

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. José Antonio Irán Díaz Góngora



CICATA IPN
Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de **México D. F.** el día **12** del mes de **Noviembre** del año **2004**
el (la) que suscribe **Jaime Antonio Fernández Gutiérrez** alumno (a) del
Programa de **Doctorado en Tecnología Avanzada** con número de registro **B000690**
adscrito a **C.I.C.A.T.A-I.P.N** manifiesta que es autor (a)
intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del
Dr. Eduardo San Martín Martínez y cede los derechos del trabajo intitulado
**“Estudio de la Interacción de los Biopolímeros caseína y almidón por el
Proceso de Extrusión”** al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines
académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos
del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido
escribiendo a la siguiente dirección **Instituto Tecnológico de Celaya. Departamento
de Ingeniería Bioquímica. Av. Tecnológico y Antonio García Cubas s/n C.P
38010. Celaya Guanajuato México. Teléfono 014616117575 ext 209 Fax
014616117979 Email fantoni@itc.mx** Si el premissio se otorga, el usuario deberá dar el
agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Jaime Antonio Fernández Gutiérrez
Nombre y firma

DEDICATORIA

A la memoria de mis padres

Dr. Jorge Fernández Sandoval y Ma. del Carmen Gutiérrez Pérez

A mi esposa

Q. F. B Ernestina Romero Santos

e Hijos

Zelene G., Jaime A., Osmar H. y Jorge Luis

AGRADECIMIENTOS:

Al Instituto Politécnico Nacional y al Programa Institucional de Formación de Investigadores “P.I.F.I” **por el apoyo para la realización de mi Programa Doctoral.**

Al Personal Directivo del **Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada CICATA I.P.N:** Especialmente **los Doctores:** José Antonio. Irán. Díaz Góngora, Javier Pérez Villaseñor, José de la Luz Martínez **de quienes recibí las mas finas atenciones y por permitirme realizar el presente trabajo de Investigación en las instalaciones de Legaria**

A los Doctores **Eduardo San Martín Martínez, Fernando Martínez Bustos, Alfredo Cruz Orea, Samuel Siles Alvarado y Antonio Calderón Arenas** por la dirección de la tesis y por su valioso apoyo y amistad.

Al Director General del SNIT. **Ing. Bulmaro Fuentes Lemus** y a los Directores y Subdirector Académico del Instituto Tecnológico de Celaya **Mtro, Oscar Javier Alonso Banda, Ing José Luis Figueroa Gracián, M en C David Trigueros Cazares y Dr. Ramiro Rico Martínez**

A la Academia y Departamento de **Ingeniería Bioquímica del Instituto Tecnológico de Celaya**

A **todo el personal** Académico, Administrativo, Vigilancia y de Servicios del **CICATA – Legaria** por su valioso apoyo y amistad

A ANUIES- COSNET por su apoyo vía PROMEP especialmente al M en C **Serafín Gutiérrez Aguado**

INDICE GENERAL

CONTENIDO

	Pagina
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
INDICE GENERAL	vi
INDICE DE TABLAS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II ANTECEDENTES	3
2.1 Generalidades del almidón	3
2.1.1 Estructura del almidón	3
2.1.2 Propiedades fisicoquímicas del almidón	5
2.1.2.1 Gelación	5
2.1.2.2 Empastado	6
2.1.2.3 Retrogradación	7
2.2 Generalidades de la caseína	7
2.2.1 La caseína y los caseinatos	9
2.2.2 Propiedades físico-químicas de las caseínas	9
2.2.2.1 Caseínas α_{s1}	10
2.2.2.2 Caseínas α_{s2}	10
2.2.2.3 Caseínas β	10
2.2.2.4 Caseínas k	10
2.3. Interacciones de proteína – carbohidrato	10
2.3.1 Usos de mezclas caseína y almidón	14
2.4 Generalidades del proceso de extrusión	15
2.4.1 Efecto de las variables de extrusión en almidón y proteínas	16
2.4.2 Interacción proteínas - almidón por proceso de extrusión	20
2.4.2a. Caracterización de extrudidos	22
2.4.2.1 Expansión de productos extrudidos	22
2.4.2.2 Índice de solubilidad y absorción de agua	23
2.4.2.3 Fuerza de compresión para la desintegración de los extrudidos	24
2.4.2.4 Propiedades Reológicas de viscosidad de extrudidos	25
2.4.2.5 Diferencial de color en extrudidos	25
2.4.2.6 Difracción de rayos X de extrudidos	26
2.4.2.7 Propiedades térmicas de extrudidos (DCS)	27
2.4.2.7.1 Transición de fase en proteínas	28
2.4.2.7.2 Transición de fase en almidón	28
2.4.2.8 Propiedades reologicas de viscoelasticidad de productos extrudidos	30
2.4.2.9 Espectroscopia infrarrojo	31
III OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo general	33

	Pagina
3.2 Objetivos específicos	33
IV MATERIALES Y METODOS	34
4.1 Materiales	34
4.1.1 Materia prima	34
4.1.2 Equipos	34
4.2 Métodos	35
4.2.1 Métodos analíticos	35
4.2.2 Métodos estadísticos	35
4.2.3 Métodos experimentales	37
4.2.3.1 Preparación de las muestras	38
4.2.3.2 Proceso de extrusión	38
4.2.3.3 Molienda de muestras extrudidas	38
4.3 Métodos de análisis de productos extrudidos	38
4.3.1 Índice de Expansión	38
4.3.2 Fuerza de compresión	39
4.3.3 Densidad volumétrica	39
4.3.4 Métodos de análisis de productos de la molienda de extrudidos	39
4.3.4.1 Índice de absorción y solubilidad en agua	39
4.3.4.2 Determinación del diferencial de color	39
4.3.4.3 Viscosidad	39
4.3.4.4 Reología de pastas y geles de muestras extrudidas	40
4.3.4.5 Difracción de rayos X	40
4.3.4.6 Espectroscopia infrarrojo	41
4.3.4.7 Calorimetría diferencial de barrido	41
4.3.4.8 Azúcares totales reductores y no reductores	41
4.3.4.9 Microscopia confocal	42
V RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
5.1 Análisis de humedad de las materias primas y de extrudidos	43
5.2 Análisis del pH de las materia primas y de extrudidos	43
5.3 Expansión (EXP)	43
5.4 Índice de Solubilidad en agua (ISA)	44
5.5 Índice de absorción en agua (IAA)	46
5.6 Diferencial de color	48
5.7 Fuerza de compresión (FC)	49
5.8 Viscosidad	51
5.9 Difracción de rayos X	56
5.10 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	58
5.11 Espectroscopia infrarroja	62
5.12 Reometria (viscoelasticidad)	69
5.13 Azúcares totales (reductores y no reductores)	73
5.14 Microscopia Confocal	75
VI CONCLUSIONES	77
VII BIBLIOGRAFÍA	79
ANEXO 1	92

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Características de la amilosa y amilopectina	92
Tabla 2 Aproximaciones de tamaños y formas de gránulos de almidón	92
Tabla 3 Variables independientes y niveles de los parámetros de extrusión	35
Tabla 4 Valores reales de las Variables Independientes	36
Tabla 5. Condiciones de ejecución de las corridas de extrusión	93
Tabla 6 Porcentaje de cristalinidad de los extrudidas	68
Tabla 7 Análisis del barrido calorimétrico diferencial asociado a las transiciones de fase	60
Tabla 8. Posición y asignación tentativa de bandas de espectros de IR de almidón	62
Tabla 9. Posición y asignación tentativa de bandas de espectros de IR de caseína	62
Tabla 10. Espectros de IR del complejo almidón caseína	62
Tabla 11 Porcentaje de humedad y actividad de agua (a_w) de extrudidos	105
Tabla 12 Colorantes y muestras seleccionadas para observación en microscopio electrónico láser confocal.	106

INDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura.5.1 Gráficas de superficies de respuesta de la expansión de los biopolímeros extrudidos a las temperaturas de procesamiento de 126°C (5.1a), 160°C (5.1b) y 194°C (5.1c)	43
Figura 5.2 Gráficas de superficies de respuesta de los índices de solubilidad en agua (ISA) de los biopolímeros extrudidos a las temperaturas de procesamiento de 126°C.(5.2a), 160°C (5.2b) y 194°C.(5.2c)	45
Figura 5.3 Gráficas de superficies de respuesta de los índices de absorción en agua (IAA) de los biopolímeros extrudidos a las temperaturasde procesamiento de 126°C.(5.3a), 160°C (5.3b) y 194°C.(5.3c)	46
Figura 5.4. Gráficas de superficie de respuesta del diferencial de color (ΔE) de los biopolímeros extrudidos a las temperaturas de procesamiento de 126°C (5.4a), 160°C (5.4b) y 194°C (5.4c)	48
Figura. 5.5 Gráficas de superficie de respuesta de la fuerza de compresión (FCOM) de los biopolímeros extrudidos a las temperaturas de procesamiento de 126°C (5.5a), 160°C (5.5b) y 194°C (5.5c).	50
Figuras 5.6a. Viscoamilogramas de extrudidos de muestras seleccionadas (5.6.1, 5.6.2, 5.6.3, 5.6.4 y 5.6.5)	51-52
Figura 5.6b Gráficas de superficie de respuesta de la viscosidad inicial (IV) de los biopolímeros extrudidos a las temperaturas de procesamiento de 126°C (5.6a), 160°C (5.6b) y 194°C (5.6c)	53
Figura 5.7 Gráficas de superficie de respuesta de la viscosidad a 90°C (VIS90) de los biopolímeros extrudidos a las temperaturas de procesamiento de 126°C (5.7a), 160°C (5.7b) y 194°C (5.7c)	53-54
Figura. 5.8 Gráficas de superficie de respuesta de la viscosidad a 50°C (VIS50) de los biopolímeros extrudidos a las temperaturas de procesamiento de 126°C (5.8a), 160°C (5.8b) y 194°C (5.8c)	54
Figuras 5.9a. Difractogramas de rayos X de los biopolímeros extrudidos (5.9.1, 5.9.2, 5.9.3 y 5.9.4)	56
Figura 5.9b Gráficas de superficie de respuesta de la cristalinidad (CRIS) de los biopolímeros extrudidos con contenidos de humedad de procesamiento de 18% (5.9a), 25% (5.9b) y 32% (5.9c)	57
Figura 5.10a. Termogramas de extrudidos obtenidas con una relación 2:1 agua - muestra (5.10.2, 5.10.3, y 5.10.4)	58-59
Figura 5.10b Gráficas de superficies de respuesta de la temperatura de fusión T_m de los biopolímeros extrudidos a las humedades de procesamiento de 18%.(5.10a), 25% (5.10b) y 32%.(5.10c)	60
Figura N° 5.11.1 Espectro de IR de una muestra de caseína	65
Figura N° 5.11.2 Espectro de IR de una muestra de almidón de trigo	66
Figura N° 5.11.3 Espectros de IR de muestras de los biopolímeros extrudidos con una proporción de 5% de almidón en la mezcla	66
Figura N° 5.11.4 Espectros de IR de muestras del os biopolímeros extrudidos con una proporción de 23.25% de almidón en la mezcla	67
Figura N° 5.11.5 Espectros de IR de muestras de los biopolímeros extrudidos con una proporción de 50% de almidón en la mezcla	67
Figura N° 5.11.6. Espectros de IR de muestras de los biopolímeros extrudidos con una proporción de 76.75% de almidón en la mezcla	68

Figura N° 5.11.7. Espectros de IR de muestras de los biopolímeros extrudidos con una proporción de 95% de almidón en la mezcla	68
Figuras 5.12.a; 5.12b; 5.12c; 5.12d; 5.12e y 5.12f Reogramas de G' y G'' versus frecuencia de extrudidos	69
Figura 5.12.1 Gráficas de superficies de respuesta del módulo G' de los biopolímeros extrudidos a las humedades de procesamiento de 18% (5.12.1a), 25% (5.12.1b) y 32%. (5.12.1c)	70-71
Figura 5.12.2 Gráficas de Superficies de respuesta del modulo G'' de los biopolímeros extrudidos a las humedades de procesamiento de 18%. (5.12.2a), 25% (5.12.2b) y 32%. (5.12.2c)	71
Figura 5.12.3 Gráficas de superficies de respuesta de la tangente del ángulo G'/G'' de los biopolímeros extrudidos a las humedades de procesamiento de 18%. (5.12.3a), 25% (5.12.3b) y 32%. (5.12.3c)	72
Figura 5.13. Gráficas de superficies de respuesta de los equivalentes en glucosa de azúcares totales de los biopolímeros extrudidos a las humedades de procesamiento de 18%. (5.13a), 25% (5.13b) y 32%. (5.13c)	73
Figura 5.14. Microfotografías de los biopolímeros caseína y almidón nativos y procesados por extrusión en un microscopio electrónico confocal	75-76

Resumen

El objetivo de esta investigación fue el de estudiar las interacciones de los biopolímeros caseína y almidón procesados por extrusión. Las muestras extrudidas fueron procesadas usando un extrusor de tornillo simple marca CICATA-IPN. Caracterizando los extrudidos en sus cambios funcionales mediante el análisis de la expansión (EXP), índice de solubilidad (ISA) y absorción en agua (IAA), así como los cambios en el color (DC), la fuerza de compresión (FC) y las propiedades reológicas de viscosidad y viscoelasticidad. Así como la caracterización de los cambios estructurales por medio de estudios de difracción de rayos X, calorimetría diferencial de barrido y espectroscopia infrarroja, análisis de azúcares totales y reductores y microscopia confocal.

El desarrollo de nuestro estudio fue por medio de un diseño de experimentos teniendo como variables independientes la temperatura de procesamiento por extrusión (126 – 194° C), el contenido de humedad de las mezclas de los biopolímeros (18- 29%) y la variación en la proporción de almidón-caseína en la mezcla (5 – 95%). Se seleccionó la metodología de superficie de respuesta y los resultados fueron analizados estadísticamente a través de un software SAS versión 6.02.

La máxima expansión se obtuvo para una proporción de almidón (>90%) en la mezcla de biopolímeros, con una temperatura de procesamiento de 126°C y con contenidos de humedad mayores que 25%. El incremento de la temperatura de 126°C a 194°C provocó tanto la disminución de la expansión como el aumento de los valores de IAA e ISA. La viscosidad Inicial y Viscosidad a 90°C fueron significativamente afectadas tanto por la temperatura de procesamiento en el extrusor como por la proporción de caseína en la mezcla encontrándose los valores menores de viscosidad al incrementarse la proporción de caseína en la mezcla. El incremento de la intensidad de color fue proporcional al incremento en la temperatura de procesamiento. En relación a la FC esta fue altamente dependiente tanto del contenido de humedad como de la temperatura de procesamiento lográndose los valores máximos en la mayor temperatura y humedad de procesamiento. La pérdida de cristalinidad en el almidón de los extrudidos fue mayor a 90% y la temperatura de fusión (Tm) se incrementó por la presencia de caseína en todos los casos en relación al almidón nativo, debido a que el complejo formado de caseína-almidón necesita mayor temperatura para llegar a fundirse. El perfil de viscosidad de los extrudidos reveló un comportamiento inverso al presentado para almidones nativos tanto en la etapa de calentamiento como en la etapa de enfriamiento en donde la retrogradación es prácticamente inexistente debido primordialmente a la presencia de caseína y la interacción de esta con el almidón.

La capacidad de formación de geles y sus perfiles de viscoelasticidad fueron estudiados por medio de los módulos de almacenamiento y pérdida. Donde el almidón es el principal responsable de las propiedades de elasticidad del producto, en la medida que se incrementa la caseína disminuye esta propiedad debido a la desnaturalización y pérdida de solubilidad de esta proteína.

El desplazamiento de bandas de los espectros de IR indican claramente que las muestras de almidón-caseína después de ser extrudidas llevan a la formación de

complejos o modificaciones estructurales que favorecen la interacción entre un almidón y una proteína. Las microfotografías en confocal de las muestras extrudidas revelan que el proceso de extrusión forma estructuras propias de interacción entre ambos biopolímeros las cuales podrán tener sin duda una modificación en las propiedades funcionales, texturales y reológicas ampliamente aplicativos en la industria alimenticia y otras aplicaciones.

Abstract

The objective of this research was to study the interactions between the casein and starch biopolymers processed by extrusion. The extruded samples were processed by using an extruder of simple screw designed and constructed in CICATA-IPN. The functional changes of the extruded samples were studied by means of the analysis of their expansion (EXP), index of solubility (ISA) and water absorption (IAA), as well as the changes in their color (DC), compression force (FC) and the rheological properties as viscosity and viscoelasticity. The characterization of the structural changes was studied by means of x-rays diffraction, differential scanning calorimetry (DSC), infrared (IR) spectroscopy, total and reducing sugar analysis and confocal microscopy.

Our study was performed by means of an experimental design having as independent variables the processing temperature of extrusion (126 - 194° C), the moisture content of the biopolymer mixtures (18- 29%) and the proportion of starch-casein in the blend (5 - 95%). To analyze the experimental data was selected the methodology of Response Surface and the results were statistically analyzed through the SAS, version 6.02, software.

The maximum expansion was obtained for a starch proportion of in the biopolymer mixture bigger than 90%, with a processing temperature of 126°C and moisture contents greater than 25%. The increase of the temperature from 126°C to 194°C caused the diminution of the expansion as well as the increase of the IAA and ISA values. Initial viscosity and viscosity at 90°C were significantly affected by the processing temperature in the extruder and also by the proportion of casein in the mixture being the smaller viscosity values when the proportion of casein in the mixture was increased. The color intensity was directly proportional to the increase of the processing temperature. FC was highly dependent of the moisture content and processing temperature also having their maximum values in the higher processing temperature and humidity values. The loss of crystallinity in the extruded starch was bigger than 90% and the melting temperature was increased, when compared with the native starch, because the formed casein-starch complex needs greater temperature to be melted. The viscosity profile of the extruded samples revealed an inverse behavior to those presented by native starches in the heating and cooling stages where the retrogradation is practically nonexistent fundamentally due to the casein presence and its interaction with the starch.

The capacity of gel formation and its viscoelasticity profiles were studied by means of their storage and loss modules. The starch is the main responsible by the elasticity properties then when the casein is increased, in the blend, the elasticity diminishes due to the denaturation and loss of solubility of this protein. The band displacement in the IR spectra shows that the extruded starch-casein samples form complexes with structural modifications that favor the interaction between starch and protein. The confocal micro-photography's of the extruded samples reveal that the extrusion process forms structures, as a consequence of the interaction between both biopolymers, which will be able to modify their functional,

textural and rheological properties which are widely applied in the nutritional industry and other applications

Introducción

Muchos alimentos están compuestos de proteína y almidón como constituyentes centrales de un sistema alimentario, como son los cereales, las leguminosas y los tubérculos ellos pueden simplemente cocinarse y consumirse. Otros productos son desarrollados industrialmente como el pan, las pastas, las botanas y los alimentos para desayuno. Estos alimentos tienen una textura y sabor que los caracteriza, siendo atribuido en gran parte a la interacción proteína–almidón *Marshall y Chrastil (1992)*. Estas propiedades así como las funcionales, son los mayores atributos de los alimentos por lo que los estudios de las interacciones almidón-proteína son considerados de alta importancia. Takeuchi et al (1969) reportó que las fuerzas de atracción que ocurren en la interacción de un sistema proteína–almidón son debidas a un fenómeno electrostático de cargas representado por la carga positiva de la proteína y la carga negativa del almidón. Recientemente Zaleska et al (2001) haciendo uso de esta propiedad de cargas en ambos biopolímeros describió una metodología de formación del complejo proteína-almidón por electro - síntesis. Por medio de un análisis termo - gravimétrico estos autores reportan que la mayor interacción del complejo caseína - almidón de papa se obtiene en la proporción 1:1 mientras que un pequeño exceso de la proteína puede dar como resultado la co - precipitación de la caseína por la formación de complejos entre los polipéptidos y las fracciones de aminoácidos de la caseína así como las fracciones de fosfato o de los grupos hidroxilos del almidón. Estudios descritos por Dahle et al (1975) demuestran la gran habilidad de las proteínas para incorporar almidón gelatinizado, siendo altamente dependiente del pH y de la temperatura, encontrando que la máxima interacción en un sistema de proteína – almidón ocurre a un pH de 6.5. Snoeren et al (1976) encontraron para un sistema de interacción de carragenina con las proteínas de la leche a un pH entre 6 y 7 que existe una mayor interacción electrostática debido a la presencia de las cargas negativas de la carragenina y las cargas positivas de la caseína. Este efecto de interacción se intensifica con el aumento de la temperatura observando que a 60° C no se logró la desintegración de las micelas de caseína aunque a temperaturas mayores que 90° C se logra una agregación de estas micelas a la carragenina por medio de uniones electrostáticas. En otros estudios conducidos por Imerson et al (1977) de interacción de carbohidratos con proteína como la mioglobina y / o la albúmina del suero bovino fue reportado que a pH 6.0 la estructura de la mioglobina es perturbada por los cambios de temperatura afectando su estabilidad térmica, sin embargo en mezcla de carbohidratos con la mioglobina a la temperatura de desnaturalización de esta proteína a pH de 6.0 se logra la formación de complejos estables de alto peso molecular debido a la agregación de los carbohidratos a la proteína, inhibiendo así las interacciones proteína - proteína y evitando su precipitación. Estos cambios aparentemente son el resultado de las fuerzas iónicas sugiriendo que la interacción proteína -carbohidratos se deben a las fuerzas electrostáticas derivadas del incremento de la carga positiva neta. Estudios micro -estructurales de la interacción de proteína – carbohidratos fueron ilustrados por Heertje (1993). Por su parte Hermansson (1979) desarrolló complejos por calentamiento de mezclas de diferentes almidones con caseína y / o caseinatos encontrando que las propiedades físicas de viscosidad, gomosidad y adhesividad del almidón fueron modificadas dependiendo de la proporción

proteína - almidón en la mezcla, del tiempo de reacción, temperatura y pH del medio, estos autores encontraron en sus observaciones que la adición de proteína mejora la estabilidad de las emulsiones. Usando un modelo esquemático como guía Moore y Carter (1974) indicaron que las fuerzas moleculares como carga - carga e interacciones de puente de hidrogeno pueden mantener el carbohidrato dentro de la matriz proteica. Pradeep et al (1999) estudiaron almidón de maíz con proteína (caseína o hidrolizados de caseína) encontrando que la presencia de esta proteína modifica la viscosidad y el perfil reológico del almidón.

El efecto de la extrusión en el almidón ha sido extensamente estudiado por Tang y Ding (1994) destacando también los estudios de Colonna et al (1984), Linko et al (1981 y 1992). Reportando que el principal efecto de la extrusión en el almidón es la ruptura de la estructura granular, así como la parcial o total destrucción de la estructura cristalina. Presentando por lo tanto un efecto en las propiedades funcionales como son los índice de absorción y solubilidad en agua, la expansión y cambios en la viscosidad tanto en el ciclo de calentamiento como en el de enfriamiento del almidón extrudido. Muchos otros autores han estudiado los cambios en la estructura macromolecular del almidón provocada por la extrusión como es el caso de Colonna et al (1984), Davidson et al (1984a y 1984b), Diosady et al (1985), Ding y Tang (1990). Gómez – Aguilera en (1984); Hauck (1981) y Meuser et al (1987). En sus respectivos trabajos concluyen que al adicionar proteína al almidón se mejora la textura y el volumen de expansión de productos extrudidos. Estos autores concluyen que aun es escasa la bibliografía referente al estudio de la interacción del complejo proteína – almidón por lo que los futuros trabajos tenderán a elucidar las interacciones del complejo de almidón – proteína.

II Antecedentes

2.1 Generalidades del almidón

Almidón es la fuente primaria de almacenamiento de energía de los granos de los cereales, la cantidad de almidón en estos varía de 60 al 75% y ellos proporcionan del 70 al 80% de calorías diarias que consumen en su dieta los seres humanos. (Thomas y Atwell 1999). De acuerdo con Vega y Bontux en 1998 la producción mundial de almidón fue del orden de 1×10^9 toneladas, de estas el 50% se destinó para alimentación humana o animal y el restante 50% para transformaciones industriales. En otro reporte de la "International Starch Institute" (1997) se estima que la producción mundial de almidón es del orden de 4 a 5×10^9 toneladas, siendo los principales productores por regiones Norte América con 1.5×10^9 , la Unión Europea con 7.8×10^8 , Japón 2.5×10^8 y otros países 9×10^8 toneladas. Las cuatro fuentes principales mundiales de extracción de almidón son el maíz, el trigo, la papa y la yuca siendo el maíz la principal fuente de extracción de almidón y el país donde más se produce son los Estados Unidos de Norte América.

El almidón en el grano de trigo se localiza principalmente en el endospermo que corresponde al 83% en peso del grano de trigo y constituye del 75 al 80% del peso del endospermo en base seca. El porcentaje exacto depende de la variedad, condiciones de cultivo y estado fisiológico de maduración, El almidón se encuentra en forma de plástidos llamados amiloplastidos que contienen un gránulo de almidón por plástido. En el almidón de trigo se encuentran dos tipos de gránulos de almidón los pequeños y esféricos de 3 a 5 micras y los grandes lenticulares y de dimensiones de 25 a 40 micras. El almidón de trigo es el componente de la harina más estudiado y hoy en día no es completamente entendido en términos de su estructura química e interacciones con otras moléculas (Davis 1994). Además de su valor energético el almidón nativo así como el almidón modificado pueden ser usados para modificar las propiedades funcionales de muchos alimentos por ejemplo: los almidones comerciales obtenidos de los cereales de maíz y trigo así como los de raíces y tubérculos como papa, camote y yuca pueden ser usados como agentes gelificantes, espesantes, adhesivos, agentes de retención de humedad, estabilizadores y texturizadores. Por otro lado el almidón también es un producto industrial importante particularmente en la industria del papel y textil (Thomas y Atwell 1999)

2.1.1 Estructura del almidón

Indistintamente de la fuente botánica de donde provenga el almidón es básicamente un polímero estructurado por unidades de la D-glucopiranososa unidos por enlaces glicosídicos α -1,4 y α -1,6 en donde se pueden distinguir dos tipos de polímeros la amilosa que fundamentalmente es un polímero lineal con uniones glucosídicas α -1,4 y la amilopectina que es una molécula más grande que la amilosa y esta además es ramificada con uniones glucosídicas tanto α -1,4 como α -1,6 en los puntos de ramificación Esta diferencia estructural entre los dos

biopolímeros contribuye a establecer diferencias en las propiedades físico - químicas y funcionales del almidón (*Hoseney. 1991*).

La amilosa es considerada como un biopolímero esencialmente lineal compuesto casi enteramente de la D -glucopiranososa con uniones glucosídicas α -1,4. Sin embargo las recientes evidencias de *Curá et al (1995)* han sugerido que algunas ramificaciones pueden estar presentes en la amilosa y además esta se presentan en forma hélicoidal y no exclusivamente lineal ya que en su interior contiene átomos de hidrógeno y es por consiguiente de carácter hidrofóbica por lo que es apta para formar complejos con los ácidos grasos libres, algunos alcoholes y con yodo (*Fennema, 1985*). En anexo 1 tabla 1 se muestran algunas de las características de la amilosa y la amilopectina.

El complejo que forma la amilosa con los lípidos particularmente con los mono y digliceridos es una propiedad aportada por la forma helicoidal de la amilosa. La formación y estructura del complejo amilosa - lípido esta en función de varios factores incluyendo la temperatura, el pH y la estructura del ácido graso o glicérido La formación de este complejo puede cambiar las propiedades del almidón como son la temperatura de gelatinización, así como alterar tanto la textura, los perfiles de viscosidad y limitar la retrogradación(*Thomas y Atwell 1999*)

La amilopectina esta compuesta de segmentos de glucosas unidas por enlaces α - 1,4 y ramificados por uniones glucosídicas α -1,6. Estas ramificaciones se estiman que son del orden de 4 a 6% equivalentes a unas 20,000 puntos de enlace de ramificación. La configuración de la amilopectina contribuye a la naturaleza cristalina y a un arreglo ordenado de las moléculas en el granulo de almidón. Debido a la naturaleza altamente ramificada de la amilopectina durante la gelatinización le confere una textura gomosa y cohesiva.

De acuerdo con *Thomas y Atwell (1999)* tanto los pesos moleculares como el grado de polimerización difieren grandemente para la amilosa y amilopectina. Para la amilosa el grado de polimerización es entre 1500 a 6000 unidades de glucosa mientras que para la amilopectina es de 300,000 a 3,000,000 unidades de glucosa en la base de ese grado de polimerización y dado la unidad de masa atómica de la glucosa de 162, los pesos moleculares de la amilosa esta en el orden de 243,000 a 972,000 UMA (Unidad de Masa Atómica) y de la amilopectina es aproximadamente de 10,000,000 a 500,000,000 UMA.

La amilosa y la amilopectina no existen libres en la naturaleza son componentes de discretos agregados semicristalinos llamados gránulos de almidón. El tamaño, la forma y la estructura de esos gránulos varían dependiendo de la fuente botánica siendo los diámetros de los gránulos entre 1 a 100 micras y las formas pueden ser regulares o irregulares. El trigo la cebada y el centeno contienen gránulos de dos diferentes tamaños y de distinta forma una de ellas es del tipo "A" en donde los gránulos son del orden de 35 μ m de diámetro y de forma oval, el otro grupo de gránulos son mas pequeños y del tipo "B" esféricos y de alrededor de 3 μ m de diámetro. El anexo 1 en la Tabla 2 se muestra el tamaño aproximado y las diversas formas de los gránulos de almidón de las fuentes mas comunes de extracción *Thomas y Atwell (1999)*.

2.1.2 Propiedades fisicoquímicas del almidón

2.1.2.1 Gelatinización,

Por muchos años los investigadores han tratado de definir la gelatinización del almidón algunos simplemente llaman a la gelatinización como la pérdida de la birrefringencia otros dicen que es el inicio del incremento de la viscosidad otros usan palabras para caracterizar el proceso de gelatinización como (cocimiento , solubilización y gelificación), aunque estas definiciones hasta ahora no describe la gelatinización del almidón desde el punto de vista químico. La definición hasta ahora mas comprensiva fue la que se generó de varios científicos y tecnólogos en una conferencia de Ciencia y Tecnología del Almidón en 1988 Formulando la siguiente propuesta. *Thomas y Atwell (1999)*.

La gelatinización del almidón es el colapso o ruptura del orden molecular del granulo de almidón manifestando cambio “irreversible” en las propiedades como hinchamiento granular, fusión de las regiones cristalinas, pérdida de birrefringencia y la solubilización del almidón en agua. El punto inicial de gelatinización y el rango de temperatura en la cual ocurre es gobernado por la concentración del almidonen la suspensión, método de observación, tipo granular y la heterogeneidad de la población de gránulos bajo observación.

Los puntos críticos que marcan la gelatinización son:

- a) Rompimiento del orden molecular
- b) Es dependiente de la humedad y temperatura
- c) Es irreversible (pérdida de birrefringencia)
- d) Se incrementa el tamaño granular, sufre un hinchamiento con el incremento de la temperatura
- e) Se incrementa la viscosidad de la solución
- f) Difiere con respecto a la velocidad de calentamiento, el pH y proporción de sólidos.
- g) Difiere con respecto a la fuente botánica del granulo y la proporción de amilosa y amilopectina

El granulo de almidón es esencialmente insoluble en agua fría (0 a 30°C) y previo a la gelatinización son insignificantes los cambios al inicio de la aplicación de calor. ya que una combinación de calor y agua causa cambios irreversibles en el almidón; los mas sobresalientes son: La destrucción de la estructura semicristalina evidenciada por la pérdida de birrefringencia y el incremento en el tamaño del gránulo, denotando que no todos los gránulos se hinchan a la misma velocidad.

Todos los cambios que ocurren anteceden al incremento de la viscosidad del medio en el cual el almidón es calentado. Cuando la mayoría de los gránulos han alcanzado su máximo de hinchamiento la suspensión de almidón es llamada “pasta cocida” o almidón cocido, en este punto la viscosidad formada tiene la habilidad para darle al almidón las propiedades de funcionalidad como ingrediente en alimentos. La temperatura en la cual se inician los cambios es referido como temperatura de gelatinización. En la actualidad debido a que no todos los gránulos de un almidón gelatinizan a la misma temperatura es mas apropiado establecer un rango de temperaturas para indicar la gelatinización.

El rango de gelatinización varia dependiendo de la fuente botánica de cada almidón en general la temperatura de gelatinización de el almidón de los tubérculos y las raíces es menor que la temperatura de gelatinización de los cereales.

Desde el punto de vista mecánico el calentamiento del almidón en agua causa la ruptura de enlaces de hidrógeno entre las cadenas del polímero por lo cual debilita el granulo. Se cree que el hinchamiento inicial toma lugar en las regiones amorfas del granulo en donde los enlaces de hidrógeno son menos numerosos y los polímeros son mas susceptibles a disolución. Cuando la estructura se debilita el granulo embebe agua y se hincha aun que no todos los gránulos gelatinizan simultáneamente diferenciando el grado de rompimiento estructural del hinchamiento granular. (*Thomas y Atwell 1999*).

2.1.2.2 Gelación o pasta

Debido al continuo calentamiento mas y mas gránulos de almidón se van hinchando y la viscosidad del medio se incrementa hasta que llega a un máximo cuando la mayoría de gránulos se han hinchado y solo el menor porcentaje de gránulos permanecen intactos esto es referido como pico de viscosidad (“peak viscosity”). En este punto el almidón es considerado como empastado,.para almidones nativos la continuidad en el calentamiento eventualmente resulta en una disminución de la viscosidad al disolverse los gránulos por efecto del calor.

La diferencia entre la gelación y la gelatinización,.no esta perfectamente definido ya que la gelación es el fenómeno seguido de la gelatinización en la disolución del almidón. Esta gelación involucra tanto el hinchamiento granular como la exudación de componentes moleculares del gránulo y eventualmente la total destrucción del granulo siendo importante recalcar que la gelificación no es exactamente separado de la gelatinización aunque muchas veces es mejor describirlo como una continuación de la misma. En el punto no definido en donde termina la gelatinización e inicia la gelación es inusualmente relacionado al desarrollo de la viscosidad de la pasta sin embargo, las diferencias entre estos dos términos solo intercambian información para describir el mismo proceso.

Cuando los gránulos de almidón son calentados en agua las pequeñas moléculas lineales de amilosa inician su solubilización y lixivian de los gránulos cuando ellos se hinchan. Si el calentamiento continua la amilosa restante así como la amilopectina son liberadas del gránulo. La viscosidad de la pasta es la mas alta cuando la mayoría de los gránulos están completamente hinchados y también hay gránulos intactos en el medio de cocimiento. Si el calentamiento continua la solubilización de los biopolímeros se incrementa a medida que los gránulos inician la ruptura de enlaces de puentes de hidrógeno y se pierde la integridad estructural. Para muchos almidones la textura y la viscosidad de la pasta resultante cambian cuando esta es enfriada resultando una pasta viscoelástica o un gel dependiendo del contenido de amilosa. En general un alto contenido de amilosa da un gel firme y consistente. Un gel firme es el resultado de una reasociación no covalente de las moléculas lineales de amilosa después del calentamiento. El contenido de amilosa y amilopectina de un almidón en particular determinan las características reologicas de la pasta o del gel resultante por ejemplo almidón conteniendo esencialmente amilopectina (waxy corn) presenta un pico alto de viscosidad seguido de un descenso brusco de la viscosidad durante el calentamiento

continuo. Posterior al enfriamiento a temperatura ambiente o de refrigeración, la pasta resultante es considerada a ser cohesiva y viscoelástica aunque no puede ser un gel consistente. De diferente manera el almidón de maíz dentado el cual contiene aproximadamente el 25% de amilosa muestra un pico relativamente bajo de viscosidad y un limitado descenso de la viscosidad durante el calentamiento, posterior al enfriamiento usualmente se tiene un gel consistente, entendiéndose como gel un sistema líquido con propiedades de sólido. (Thomas y Atwell 1999).

2.1.2.3 Retrogradación

Los polímeros solubles de almidón y los fragmentos que permanecen insolubles tienen una tendencia a reasociarse posterior al calentamiento. Esta reasociación es llamada retrogradación. Una definición de retrogradación de almidón es la siguiente:

La retrogradación de almidón es un proceso que ocurre cuando las cadenas de almidón comienzan a reasociarse en una estructura ordenada. En esta fase inicial dos o más cadenas de almidón pueden formar un simple punto de unión el cual puede desarrollarse dentro de una mayor extensión de regiones ordenadas, cuando las condiciones son favorables hasta un orden cristalino puede aparecer.

La retrogradación es especialmente evidente cuando la amilosa del almidón se enfría. Al enfriarse la pérdida de energía está disponible para mantener separadamente las moléculas de almidón solubilizadas. Retrogradación resulta en la formación de agregados cristalinos y una textura gelatinosa. Aunque la amilopeptina puede retrogradar durante el enfriamiento con las moléculas lineales de amilosa ya que estas tienen una gran tendencia a reasociarse y formar enlaces de hidrógeno a lo largo de las cadenas de amilopeptina. Conforme avanza el proceso de retrogradación la pasta de almidón se va opacando y tiende a la formación de un gel con el tiempo. Este gel gomoso tiende a expulsar agua y esta acción es denominada como sinéresis. Esta sinéresis es muy común encontrarla en productos alimenticios que son formulados con almidón sin modificar.

Debido a que el proceso de retrogradación es aplicado cuando el almidón se enfría la sinéresis es más notoria en productos refrigerados o congelados. La estabilidad de un almidón al congelamiento es una medida del grado de sinéresis o de la cantidad de agua expulsada. Esta es una consideración importante para la estabilidad de almidones en alimentos y esto debe ser tomado en cuenta cuando se refrigeran o se congelan alimentos formulados con almidón. Es también importante recordar que los almidones de diferentes fuentes botánicas retrogradan a diferente velocidad y en varios grados de retrogradación por ejemplo el almidón de yuca con el 19% de amilosa da un gel suave y estable. Sin embargo el almidón de maíz de alta amilosa (40%) proporciona un gel muy firme durante el enfriamiento (Thomas y Atwell 1999).

2.2 Generalidades de la caseína

De acuerdo con Morr (1984) la producción mundial de caseína en el año de 1983 fue de 2.2 a 2.6×10^5 toneladas siendo los principales países productores Nueva Zelanda y Australia con una producción de 8×10^4 toneladas La Comunidad Económica Europea con 1.08×10^5 toneladas y Polonia 2.9×10^4 correspondiendo al 36.66, 44.58 y 13.75% del total de la producción mundial respectivamente.

La caseína y caseinatos han ganado considerable importancia como ingrediente funcional en productos alimenticios (*Morr 1984*) los usos de la caseína o los caseinatos se pueden dividir en dos grandes grupos: el primer grupo de aplicaciones no alimenticias correspondiendo al 40% del total y el segundo grupo de amplia aplicación en la formulación de alimentos correspondiendo al 60% del total.

Subdividiendo el primer grupo las aplicaciones principales son: 13% uso medicinal 7.0%, para la alimentación animal y 20% para aplicaciones industriales. Las aplicaciones en formulación de alimentos son en la preparación de análogos de quesos 32%, crema para café 9.6%, panificación 9.2% elaboración de postres 5.3% y otros usos 3.1% (*Morr1984*). Actualmente basado en sus propiedades físicas y funcionales la utilización de la caseína y/o caseinatos se ha incrementado en usos como películas comestibles, agentes espesantes, estabilizantes, gelificantes y emulsionantes (*Prestige Proteins 2003*).

Las aplicaciones de caseína y caseinatos en la industria alimentaría se desarrolla en quesos fundidos, preparaciones dietéticas y en la alimentación infantil, sin embargo, las aplicaciones recientes de caseína y caseinatos se basan en sus propiedades tanto nutricionales como funcionales, siendo la propiedad funcional de los caseinatos como emulsificante y agente de enlace en helados, cremas para café, cereales para desayuno y crema batida entre otras aplicaciones.

La caseína es un complejo de proteínas fosfatadas de carácter ácido y constituye la parte nitrogenada más característica de la leche representando el 80% del total de sustancias nitrogenadas. Todas las caseínas son moléculas de gran tamaño que contienen fósforo y entre los aminoácidos más abundantes destacan el ácido glutámico y en menor grado la leucina y prolina (*Veisseyre 1988*).

Las principales fracciones de la caseína son $\alpha_{(s1)}$ y $\alpha_{(s2)}$, β y κ siendo la propiedad distintiva de todas las caseínas su baja solubilidad en agua a pH de 4.6. El factor común en su composición es que las caseínas son proteínas conjugadas ya sea con grupos fosfato o esterificados a los residuos de la serina, esos grupos fosfato son importantes en la estructura de las micelas de caseína.

El balance de los grupos ionizables de diversas caseínas conduce a constatar un exceso notable de grupos ácidos sobre los básicos debido al ácido glutámico, y aspártico que son dos amino ácidos diácidos y el caso de la κ caseína que es la única caseína que contienen una fracción glucídica que esta formada por una o varias frecuencias de galactosamina, galactosa –ácido N acetilneuraminico o ácido siálico por lo que las proteínas son electronegativas. Es por ello la gran facilidad de formar caseinatos. (*Veisseyre 1988*).

En solución acuosa a pH de 6.8 las caseínas tienden a formar polímeros es decir asociaciones de moléculas idénticas. Sin embargo se mantienen completamente solubles, aunque en presencia de calcio iónico su comportamiento es diferente en donde solo la κ caseína es soluble a temperatura ambiente, la β caseína sola es soluble a temperatura inferior a 5° C y las caseínas $\alpha_{(s1)}$ y $\alpha_{(s2)}$, son insolubles en agua en un amplio rango de temperatura.

2.2 1. La caseína y los caseinatos

De acuerdo con Segalen (1980) los procesos empleados para extraer la caseína de la leche descremada se basan en su insolubilidad a un determinado pH. En donde se emplean tres diferentes técnicas para la extracción de caseína láctica, vía química y fisicoquímica para obtención de caseína ácida y vía enzimática para la obtención de caseína renina. Al insolubilizar la caseína no solo se permite su extracción sino también su purificación. Este estado insoluble impide su aplicación en diferentes campos donde se requiere un producto soluble. Por esta razón se han utilizado técnicas para solubilizar la caseína como es la adición de un álcali dependiendo de la aplicación en la industria ya sea alimentaria o farmacéutica a los cuales está destinado el caseinato. Se utilizan diversos álcalis para producir diversos caseinatos como por ejemplo el caseinato de sodio que puede ser producido por la adición de hidróxido de sodio, bicarbonato de sodio o fosfato de sodio.

Todas las caseínas son moléculas de gran tamaño que contienen fósforo y un gran número de aminoácidos, muchas aunque no todas las caseínas existen en partículas coloidales llamadas micelas de caseína. Las partículas son voluminosas conteniendo mas agua que caseína. Toda la caseína está en solución cuando la concentración, el pH y fuerza iónica son los de la leche aunque a menor cantidad de Ca^{2+} se forman pequeños agregados No existe acuerdo sobre su tamaño, habiéndose señalado diámetros de 10 a 20 nm y pesos moleculares desde 250,000 a 2,000,000 de aquí que contengan de entre 10 y 100 moléculas de caseína.

2.2.2 Propiedades físicas y químicas de las caseínas.

Las caseínas son proteínas ácidas por ser ricas en ácido glutámico y aspártico en la caseína el contenido de prolina es extraordinariamente alto y este aminoácido esta distribuido con gran regularidad a lo largo de la cadena peptídica lo que hace improbable la presencia de estructuras ordenadas (α hélice o estructuras β), Otros constituyentes como las caseínas α_{s1} y la caseína β no poseen cisteína mientras que la caseína α_{s2} y sus derivados así como la caseína κ contienen dos residuos de cisteína por molécula.

La composición en aminoácidos de las caseínas le confieren una hidrofobicidad media, ligeramente superior a la de la mayoría de las proteínas globulares, esta propiedad le permite a las caseínas asociarse muy fácilmente en complejos. El conocimiento de características estructurales de las proteínas de la leche permite prever un cierto número de propiedades físicas y fisicoquímicas como la carga eléctrica la cual puede ser modificada por la fijación de iones calcio.

El balance de los grupos ionizables de diversas caseínas conduce a constatar un exceso notable de los grupos ácidos de los básicos. Este exceso se explica por la abundancia de aminoácidos diácidos glutámico y aspártico. Las diversas caseínas poseen puntos isoeléctricos diferentes de 4.4 para las α_s 4.9 la caseína β de 3.7 la caseína κ que es la más cargada en glúcidos siendo el punto isoeléctrico de todas las caseínas de 4.6. El conocimiento de la secuencia de los aminoácidos de

las proteínas de la leche proporciona una gran información sobre las características estructurales permitiendo calcular o prever las estructuras tridimensionales y por lo tanto comprender las propiedades fisicoquímicas y funcionales de los diferentes constituyentes proteicos de la leche.

2.2.2.1 Caseínas α_{s1}

La localización de las cargas y de las cadenas laterales hidrófobas es muy irregular. Esto confiere a la molécula un comportamiento dipolar con un polo globular mucho más hidrófobo y un polo cargado; se puede establecer así tres fracciones hidrófobas comprendidos entre los residuos 1-44, 30-113 y 132-199 y una parte muy fosforilada con residuos 41-80 que representa casi en su totalidad la carga negativa (-20.6) a pH de 6.6 en esta región se nota también la presencia de un 9° grupo ortofosfato en la caseína α_{s0} y α_{s1} .

2.2.2.2 Caseínas α_{s2}

Es la más hidrófoba de las caseínas con una hidrofobicidad próxima a la de las proteínas globulares porque es más fosforilada con 10 a 13 residuos fosfoseril / mol y por ser más rica en residuos catiónicos. Los residuos fosfoseril están agrupados en tres polos (residuos 8-16, 56-61 y 129-133) mientras que las partes hidrófobas se limitan a las fracciones 160-207 (secuencia C terminal) y 90-120 (secuencia central). Esta estructura sugiere que las interacciones electrostáticas son muy importantes y dependen del pH resultando así una gran sensibilidad a los iones Ca^{++} .

2.2.2.3 Caseínas β

Es la más hidrófoba de las caseínas las partes fuertemente cargadas están separadas por una fracción hidrófoba muy larga, así la parte N terminal (residuos 1-21) que contienen cuatro de los 5 átomos de fósforo tiene una carga neta de -12 a pH 6.6 mientras que la parte hidrófoba no está cargada. La molécula presenta un carácter anfipolar muy marcado.

2.2.2.4 Caseína k

Entre las diferentes fracciones que constituyen la caseína entera, la caseína **k** se distingue a pesar de su pequeña proporción del 13% debido a que es soluble en la presencia de calcio lo que le da un poder estabilizante frente al calcio. Posee un papel de coloide protector lo que permite la formación de micelas estables en presencia de calcio.

La caseína **k** es pobre en fósforo 0.2% lo que representa de 1 a 2 átomos de fósforo por molécula. Por el contrario, su contenido en serina y treonina es elevado y sobre todo es notable la presencia de cisteína en su molécula en estado nativo. La caseína **k** es la única caseína que contiene una fracción glucídica a esta composición en particular se debe un tipo especial de heterogeneidad debido a que el número de restos glucídicos fijados en la cadena peptídica puede variar.

2.3. Interacciones proteína – carbohidratos

El estudio de la interacción de proteína con carbohidratos tiene sus inicios en la década de los setenta siendo *Takeuchi et al (1969)* uno de los primeros

investigadores en reportar las fuerzas de atracción molecular que tiene lugar en la interacción de un sistema proteína – almidón. Encontrando en sus estudios que la formación de los complejos de la proteína con el almidón es debido a un fenómeno electrostático de cargas representado por la carga positiva de la proteína y la carga negativa del almidón. Otros estudios preliminares de la interacción de proteína – almidón fueron descritos por (*Dahle et al 1975*) en donde demuestra la gran habilidad de las proteínas para incorporarse al almidón gelatinizado, esta capacidad de incorporación, es altamente dependiente del pH y de la temperatura encontrando estos autores que la máxima interacción en un sistema de proteína – almidón ocurre a un pH de 6.5, observando que al decrecer el pH la interacción caseína - almidón también decrece así como al incrementarse el pH del punto óptimo (6.5) la interacción también decrece. Por su parte *Snoeren et al (1976)* estudió el sistema de interacción de carragenina con las proteínas de la leche a un pH entre 6.0 y 7.0 encontrando estos autores que el efecto de interacción se intensificó con el aumento de la temperatura, ya que a la temperatura de 60°C no se logra la desintegración de las micelas de caseína sin embargo a la temperatura de 90°C ocurrió una completa desintegración de estas micelas acompañadas por la aparente disminución de partículas de caseína debido a la agregación de estas a la carragenina por medio de enlaces electrostáticos. Estudios con pectatos, alginatos y carboximetil celulosa con proteínas de la mioglobina y albúmina del suero bovino fueron realizados por (*Imerson et al 1977*) quienes encontraron que a pH 6 la estructura de la mioglobina es perturbada causando cambios espectrales y disminución de la estabilidad térmica, sin embargo, el calor de desnaturalización a este pH provocó la formación de complejos estables de alto peso molecular debido a la agregación polisacárido-proteína, inhibiendo la interacción proteína-proteína como su precipitación. Estos cambios son resultado de la fuerza iónica y pH sugiriendo que la interacción es dada por fuerzas electrostáticas e incrementos en la carga positiva neta.

En esta misma década usando un modelo esquemático como guía (*Moore y Carter 1974*) proponen que las fuerzas moleculares como carga - carga e interacciones de puentes de hidrogeno pueden mantener los carbohidratos dentro de una matriz proteica.

Microfotografías de interacciones de proteína - carbohidratos fueron ilustradas por *Heertje et al (1993)* en donde se observa la formación de complejos estables de alto peso molecular debido a la agregación de los carbohidratos a la proteína, inhibiendo así las interacciones proteína - proteína y evitando su co precipitación. Estos cambios aparentemente son el resultado de las fuerzas iónicas sugiriendo que la interacción proteína - carbohidratos se deben a las fuerzas electrostáticas derivadas del incremento de la carga positiva neta.

Por su parte *Hermansson (1979)* desarrolló complejos de proteína – carbohidrato por calentamiento de mezclas de diferentes almidones con caseína y/o caseinatos encontrando que las propiedades físicas de viscosidad, gomosidad y adhesividad del almidón fueron modificadas dependiendo de la proporción de proteína, el tiempo de reacción, la temperatura y el pH del medio, añadiendo que la adición de proteína mejora la estabilidad de las emulsiones por lo que el complejo proteína – almidón puede ser usado ampliamente en el área alimenticia dado la diversidad de aplicaciones de funcionalidad tanto del almidón como de la proteína.

Pradeep et al (1999) estudiaron la interacción de proteína - carbohidrato usando en sus estudios almidón de maíz con proteína (caseína o hidrolizados de caseína) encontrando que la incorporación de esta proteína modifica la viscosidad y el perfil reológico del almidón. Debido a que cuando se gelifican los biopolímeros, la amilopectina solo se hidrata, mientras que el medio continuo consiste de amilosa y proteína. Así probablemente la amilosa interactúa con la proteína e hidrolizados de proteína dominando el sistema, formando enlaces cruzados con el almidón a través de sus grupos hidrofílicos tales como -OH, -NH₂, -COOH, y -SH. Las interacciones formadas pueden ser almidón-proteína y almidón-hidrolizados de proteína siendo estas las responsables por las altas viscosidades de pasta en frío comparadas con las del almidón sin proteína.

En otros estudios recientes *Zaleska et al (2001)* haciendo uso de la propiedad de cargas en ambos biopolímeros describe una metodología de separación del complejo proteína - almidón por electro síntesis, encontrando que la composición de los complejos formados es dependiente de la proporción de los biopolímeros en la solución de la celda electrolítica. Por medio de un análisis termogravimétrico sugieren estos autores que la mejor formación del complejo caseína - almidón de papa se obtiene en la proporción 1:1, mientras que un pequeño exceso de la proteína puede dar como resultado la co-precipitación de la caseína por la formación de complejos entre los enlaces pépticos y las fracciones de aminoácidos así como las fracciones de fosfato o los grupos hidroxilos del almidón.

La mayoría de las interacciones entre biopolímeros formados son sistemas de fases separadas conteniendo el dominio de un polímero dispersado en la matriz del otro. Menos frecuente es una interacción atractiva entre polímeros diferentes químicamente resultando en polímeros de una sola fase. Comparados con mezclas de polímeros sintéticos se tiene menos información disponible en mezclas biopolimericas. La inmiscibilidad ha sido observada para mezclas de algunos polisacáridos, teniendo en su lugar una interacción atractiva entre proteínas y polisacáridos aniónicos (*Leloup et al., 1991*). *Zaleska et al., 1999, 2000, 2001* desarrollaron un método de síntesis electroquímica para la formación de complejos polisacáridos aniónicos y proteínas y de acuerdo con estos autores los biopolímeros formados poseen un rango amplio de propiedades y la mayor interacción fue obtenida para una relación de 1:1 proteína-almidón.

Según *Marshall y Chrastil (1992)* En los primeros estudios sobre las fuerzas moleculares que conducen a una interacción proteína almidón consideran a ambos biopolímeros como coloides los cuales poseen carga superficial opuesta *Yoshimo .y Matsumoto (1966)*; *Takeuchi (1969)* La proteína deriva su carga superficial de la composición de aminoácidos de su estructura primaria. La relación de aminoácidos básicos (lisina, arginina e histidina) y aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspartico) establece el punto isoelectrico en la proteína y determina la carga de la superficie a un pH específico.

Para el almidón la situación es más compleja, Tanto la amilosa como la amilopectina puras no poseen grupos de carga y son macromoléculas neutras. Suspensiones de amilosa o amilopectina pura a muy alto o bajo pH provocan deshidratación y enolización de los grupos hidroxilo de la glucosa por lo tanto

imparten una carga negativa a estas macromoléculas. *Marshall y Chrastil (1992)* Sin embargo el pH en sistemas alimenticios es raramente extremo. En cereales, los gránulos de almidón contienen lípidos en el interior y la superficie de los gránulos (*Morrison 1988*). Muchos de estos lípidos son fosfolípidos los cuales poseen una carga neta negativa. *Marsh y Waight (1982)* determinaron que la suspensión de almidón de trigo posee un punto isoelectrico de 3.7 aunque el punto isoelectrico de la suspensión del almidón de papa no fue determinado en un rango de pH de 2 - 10. Debido a la influencia de los fosfolípidos y a algún residuo de proteína, la superficie del granulo de almidón estaría cargada negativamente y se comportaría como un coloide cargado negativamente bajo condiciones de pH encontradas en la mayoría de los sistemas alimenticios.

Dahle (1975) determino la interacción de almidón proteína midiendo el almidón remaneciente en solución, después de la precipitación del complejo almidón-proteína. Siendo investigado el efecto del pH y calor en la habilidad de la proteína de interactuar con el almidón, la máxima interacción fue observada a un pH de 6.5. La Interacción fue ligeramente menor que el máximo alcanzado en el lado ácido a pH menor que 6.5, sin embargo, fue mucho menor que en el lado básico.

La interacción de caseína con carragenina fue estudiada por (*Heertje. 1993*), indicando que la carragenina es particularmente utilizada en productos lácteos en el pH neutro (6-7) debido a la reacción de los grupos sulfato de la k-caseína con la carga positiva de la carragenina. Este efecto se intensifica con el aumento de la temperatura es decir que a 60°C no se aprecia desintegración de micelas de caseína sin embargo a 90°C ocurre una completa desintegración de micelas de caseína acompañada por la aparente perdida de partículas de caseína y la agregación de estas, a la carragenina a través de enlaces electrostáticos.

Otros estudios han identificado la influencia de varios parámetros, es decir que la interacción electrostática es determinada por las características fisicoquímicas de cada polímero (densidad de carga y masa molar) su concentración y relación en la mezcla, así como las condiciones de la solución (pH, fuerza iónica, tipo de iones) (*Schmitt et al., 1998*). Además la temperatura, cizallamiento, y presión pueden afectar la formación y estabilidad de complejos (*Schmitt et al., 1998*). Previos estudios de la interacción entre carboximetilcelulosa (CMC) y proteínas (proteínas del suero de la leche, gelatina) mostraron que la formación de los complejos puede ser controlada midiendo la viscosidad, la turbidez y el volumen coacervado (*Koh 1988a y 1988b*).) También fueron estudiados en detalle polímeros sintéticos en combinación con albúmina de suero bovina (BSA para la purificación de proteína usando medidas de turbidimetria y titulación de pH. El pH induce transiciones estructurales (pH transición) en la proteína, medida en función de su fuerza iónica. Dos valores de pH específico, pH_c y pH₀ fueron identificados. La formación de proteína soluble complejo poli electrólitos fue iniciada a pH_c, el cual precede al pH de la fase de separación visual llamada pH₀ (*Kaibara et al., 2000; Mattison et al., 1999*). Los anteriores estudios fueron realizados con polielectrolitos sintéticos y sistemas con biopolímeros frecuentemente usados en productos alimenticios. La novedad de estos estudios es el uso de una mezcla compleja de proteínas del suero (Aislado de proteínas del suero de leche, SP) con un complejo de polisacáridos, goma arábica. La titulación ácida de la mezcla de los

biopolímeros fue realizada para observar el pH de transición en polielectrolitos débiles, semejantes a la goma arábica. La mezcla de biopolímeros fue lentamente acidificada con glucona δ lactona (GDL), y su turbidez, intensidad de dispersión y tamaño de partícula fueron monitoreados en paralelo y revelaron la formación de complejos solubles e insolubles. La determinación del diagrama de estado difiere con los encontrados con los polielectrolitos fuertes, así como la fuerza iónica y pH (Weinbreck *et al.*, 2003).

Investigaciones realizadas con proteínas del suero de la leche y goma arábica, que posee una ramificación con un número de polisacáridos enlazados a una cadena de polipéptidos (Islam *et al.*, 1997). Este polisacárido presenta buenas propiedades de emulsificantes y una marcada viscosidad baja. La goma arábica es un poli electrolito débil que posee grupos carboxilo y sus medidas electroforéticas indican que está cargada negativamente aproximadamente a pH 2.2, desde que a menor pH (<2.2) la disociación de los grupos carboxilo es suprimida (Burgess & Carless, 1984). De la estructura molecular de la goma arábica se puede estimar la densidad de carga de los poli electrolitos como un grupo carboxilo por 5 nm (Islam *et al.*, 1997). El aislado proteico de suero de leche contiene 75% de β -Lactoglobulina (β -1g) y 15% de α -lactoalbumina (α -lac). Nativa β -1g tiene un punto isoeléctrico (pI) a pH 5.2 y nativa α -lac a pH 4.1, y tienen carga positiva debajo de su punto isoeléctrico. Una vez que el pI de β -1g es mayor que el pI de α -lac y porque β -1g está presente en mayor cantidad que α -lac, se puede indicar que la interacción entre la proteína del suero y la goma arábica esta dominada por la β -1g. La formación de complejos entre las proteínas del suero y la goma arábica resultan en un rango de pH donde las macromoléculas tienen cargas opuestas (Weinbreck *et al.*, 2003).

2.3.1 Usos de mezclas en base a las interacciones de caseína - almidón

El "pudín" es sin duda el ejemplo clásico de un almidón con un producto lácteo otros productos en donde la conjunción de almidón y caseína pueden estar presentes son los postres fríos, el yogur, las cremas ácidas y el queso fresco. Los almidones modificados usados en productos lácteos están en el orden de 1 a 7% en peso del total de la formula y funcionan como texturizantes, estabilizantes y/o agentes de viscosidad (Thomas y Atwell 1999). En la selección para la aplicación de un almidón en productos lácteos se requiere que este tenga tolerancia al calor y a la acción mecánica, también estable al almacenamiento a bajas temperaturas (0 a 4° C). Esto debido a las condiciones de procesado de los productos lácteos en donde se requieren altas temperaturas para la pasterización, una alta tolerancia a la acción mecánica en la homogeneización y una distribución y almacenaje a bajas temperaturas. De acuerdo con Kalab *et al* (1975) la adición de hidrocoloides estabiliza el yogurt evitando la separación del agua (sinéresis) aumentando su viscosidad concluyendo estos mismos autores que los hidrocoloides actúan como espesantes o estabilizantes en el yogurt. Los almidones de maíz o trigo, son hidrocoloides que podrían ser utilizados como estabilizantes o espesantes en el yogurt. Recientemente el empleo de mezclas de proteína con el almidón han sido usados para la formulación de alimentos hipoalergénicos para infantes y fórmulas nutricionales para adultos (Goel *et al* 1999).

El estudio de las interacciones proteínas – carbohidratos tiene relevancia para aplicaciones en la industria de los alimentos uno de ellos como películas comestibles, o materiales de empaque (*Bystricky et al., 1990, 1991; Aggour, 1993; Dalev & Simeonova, 1995; Korolezuk et al., 1996; Arvanitoyannis et al., 1997; Ghorpade et al., 1997, Zbikowska et al., 1998*), microencapsulación de ingredientes o cosméticos, sustancias grasas, análogos de carne, películas, adhesivos (*Dickinson, 1998; Doublier, 2000; De Kruif & Tuinier, 2001; Sanchez & Paquin 1997; Tolstogusov 1996*) y en varias otras áreas (*Shogren et al., 1993; Chandra & Rustigi, 1997; Tomasik & Schilling, 1998*). Otro uso no alimenticio de la interacción proteína carbohidratos como recubrimientos o coberturas de productos farmacéuticos (*Lee et al., 1991; Imam et al., 1992; Jane et al., 1994; Arevalonino et al., 1996*).

Existe una continua necesidad de modificar las propiedades de estos materiales para mejorar sus aplicaciones y conferirles nuevos usos. Por lo que se están proponiendo varios métodos de preparación de materiales biodegradables, los cuales tienen diferencias en cuanto a su biodegradabilidad. Algunas investigaciones basadas en la producción de mezclas homogéneas de polímeros sintéticos con biopolímeros naturales indican que son de fácil biodegradación (*Shogren et al., 1993; Van Soest et al., 1996; Chandra & Rustigi, 1997; Golachowski & Leszczynski, 1997; Fishman & Coffin, 1998*). Las propiedades de estos complejos o mezclas dependen fuertemente de los componentes y métodos de preparación, basados en las características de los materiales investigaciones realizadas por *Jane et al., (1994), Dejewski et al., (1995); Ghorpade et al., (1997); Otaigbe & Jane, (1997); Zaleska et al, (1999)*, indican que los biopolímeros formados son totalmente biodegradables.

Estudios de *Ganz, (1966)* indican que la CMC, también presenta propiedades estabilizantes las cuales pueden ser incrementadas cuando se combina con almidón debido a que se promueve la reducción de la temperatura de gelatinización aumenta la viscosidad y reduce el tiempo de cocimiento del almidón. Otros tipos de interacciones entre polioxidos y proteínas son útiles en la preparación de geles alimenticios, los enlaces covalentes (por ejemplo), se usan para formar geles muy elásticos por reticulación de la gelatina con esteres de la pectina o alginatos.

2.4 Generalidades de la extrusión

El extrusor de rosca única fue aplicado a la industria alimentaria en 1935 en la producción de pastas alimenticias (*Rossen y Miller. 1973*). Desde aquella época, una intensa utilización de este equipo ha ocurrido en el procesamiento de alimentos intensificando por la introducción del extrusor de cocimiento. Cuando se emplea el extrusor de cocimiento se dota de energía térmica y mecánica al material en proceso. Para que esto ocurra el alimento es forzado por un tornillo sin fin a pasar por una matriz con diámetro inferior al del cilindro calentado y por lo tanto se restringe el flujo del material. El proceso de cocción de alimentos por extrusión presenta algunas características únicas comparadas con otros procesos térmicos, especialmente por el alto grado de corte mecánico al que es expuesto el alimento. Este es capaz de romper enlaces covalentes en los biopolímeros y la

intensa disrupción de la estructura por la acción mecánica, facilita las reacciones que en otros procesos están limitadas por la difusión del reactante y el producto (*Björck, et al 1984*).

Actualmente, los extrusores de alimentos son considerados como bioreactores de alta temperatura y corto tiempo (HTST) que transforman una gran variedad de materias primas en productos intermediarios o productos finales, tales como harinas precocidas instantáneas, cereales para desayuno, alimentos tipo botana dulces o salados, alimentos para animales, proteínas texturizadas y alimentos de uso infantil precocidos de alto valor nutritivo, además de bases para sopas y bebidas instantáneas y almidones pregelatinizados

2.4.1 Efecto de las variables de extrusión en almidón y proteína

Durante el proceso de extrusión el almidón está sujeto a la acción de energía térmica y mecánica por lo que puede sufrir desde una parcial hasta una completa fragmentación de los gránulos durante su gelatinización (*Meucier, 1984*). Además de la gelatinización, la formación de oligosacáridos con bajo peso molecular fue encontrado por *Chiang y Johnson (1977)* en almidón de trigo, *Mercier, (1977)* con almidón de papa y *Owuso y Anseh, Voort y Staley (1983)* en almidón de maíz. Sin embargo (*Mercier y Feillet 1975*) no observaron la presencia de oligosacáridos en diferentes almidones procesados por extrusión lo cual puede ser debido a la diferencia en las condiciones de procesamiento.

El efecto de la extrusión en el almidón ha sido extensivamente estudiado por *Tang y Ding (1994)* destacando los estudios de *Colonna et al (1984)* y *Linko et al (1981 y 1992)*. Reportando estos autores que el principal efecto de la extrusión en el almidón es la fragmentación de la estructura granular, así como la parcial o total destrucción de la estructura cristalina. Teniendo por lo tanto un efecto en las propiedades funcionales como son los índices de absorción y solubilidad en agua, la expansión y cambios en la viscosidad tanto en el ciclo de calentamiento como en el de enfriamiento. Diversos otros autores han estudiado los cambios en la estructura macromolecular del almidón provocada por la extrusión como es el caso de *Colonna et al (1984)*, *Davidson et al (1984a y 1984b)*, *Diosady et al (1985)*, *Ding y Tang (1990)*, encontrando que la relación entre los cambios estructurales en el almidón y las propiedades reológicas son de suma importancia.

Por su parte *Gómez – Aguilera en (1984)* Describe en sus estudios que debido a que la humedad es usualmente limitada durante el proceso de extrusión, el almidón puede existir tanto gelatinizado como fundido y la relación de amilosa - amilopectina puede ser reducida por la hidrólisis causada por el efecto de la alta temperatura, el alto efecto de cizalla y la baja humedad. Concluyendo que la textura final del almidón extrudido puede ser debido a la combinación de varios factores como son la temperatura, la acción mecánica (cizalla) y la presión durante el proceso de extrusión Este mismo autor proponen un modelo para predecir la textura final de productos de un sistema proteína – almidón extrudido bajo un conjunto de condiciones experimentales. Adicionalmente tanto *Hauck (1981)* como *Meuser et al (1987)* en sus respectivos trabajos concluyen que al adicionar

proteína al almidón se mejora la textura y el volumen de expansión de productos extrudidos

Para un determinado almidón la influencia del proceso de extrusión en las características del producto es determinada por el tipo de extrusor utilizado y variables del proceso las cuales modifican la cantidad y tipo de energía mecánica o térmica. De acuerdo con *Mercier (1986)* las variables más importantes del proceso de extrusión son la temperatura, velocidad y diámetro del tornillo sin fin, diámetro de la matriz, configuración del tornillo, flujo de alimentación y humedad del material. El efecto por extrusión en el alimento ha sido estudiado por *Colonia y Mercier (1983)* El principal efecto de este tratamiento termomecánico es la ruptura de la estructura granular cristalina del almidón, mostrado por difracción de rayos X (*Mercier et al 1980*) y microscopia electrónica de barrido (*Chinnnaswamy et al 1989*). Las propiedades funcionales específicas, solubilidad en agua y capacidad de absorción; así como la relación de expansión y viscosidad de la pasta sobre un ciclo de calentamiento – enfriamiento de los almidones extrudidos han sido investigados por *Mecier y Feillet (1992)*. Otros autores han estudiado los cambios de estructura molecular del almidón debido a la extrusión (*Colonna y Mecier 1983*); (*Colonna et al 1984*; *Davidson et al 1984*; *Diosady et al 1985*; *Ding y Tang 1990*; *Tang 1991*; *Davidson 1992 Mitchell y Aeras 1992*.

Temperaturas de extrusión en el rango de 65 a 250° C han sido utilizadas por diversos autores en la extrusión de almidones y harinas (*Mercier et al 1975, 1977 y 1980*); *Chang et al 1977*; *Hoseney 1982*); (*Owusu-Ansar 1983 y 1984*), y (*Gómez – Aguilera 1984*) Ellos observaron que el índice de absorción de agua y el grado de gelatinización llegaban a un máximo a determinada temperatura de extrusión, adicional a esto el índice de solubilidad en agua aumentó con respecto al aumento de temperatura

Owusu-Ansah et al., (1983) estudiaron el efecto de las principales variables de extrusión sobre los cambios fisicoquímicos de almidón, utilizando un extrusor de doble tornillo. Evaluaron el efecto de la temperatura en el rango de 100 a 240 °C, humedad del 11 al 23% y la velocidad del tornillo entre 50 y 90 rpm. Estos autores encontraron que todas las características fisicoquímicas medidas, excepto la ISA, (índice de solubilidad en agua) fueron significantes en sus términos de primero y segundo orden. De acuerdo con los autores, la viscosidad disminuyó en todo el rango experimental de temperatura y el grado de gelatinización presentó un máximo a los 170°C y posteriormente disminuyeron, con el aumento de la temperatura. El ISA incrementó con el aumento de la temperatura y de la humedad.

Chinnaswamy et al., (1989) estudiaron el efecto de la temperatura (140 °C) humedad 14% y velocidad del tornillo (150 rpm) en el almidón usando un extrusor de laboratorio marca Brabender (modelo 2802) Los autores encontraron que el doble procesamiento de extrusión disminuyó el grado de expansión (GE) desde 12.9 a 7.6 %, del tamaño de las células de gas y del volumen del producto expandido, en relación al primer procesamiento. Contrario a esto, los autores reportan que la solubilidad en agua aumentó considerablemente de 28.8 a 35.4 % con el doble procesamiento, mientras que el esfuerzo de corte se mantuvo

prácticamente constante de 0.64 a 0.68 Mpa. Además reportan que por calorimetría diferencial de barrido (DSC) la temperatura de fusión fue de 54°C para el almidón retrogradado y los difractogramas de rayos X mostraron una forma cristalina de tipo "B". En términos generales, los autores reportan interesantes cambios químicos, físicos y estructurales que se realizan durante el procesamiento por extrusión de almidón, los cuales afectan, de manera importante, la calidad de los productos.

Otros trabajos realizados por *Chinnaswamy y Hanna (1990)*, reportan un estudio sobre las propiedades funcionales y macromoleculares de almidón procesado por extrusión, como el efecto de la humedad y temperatura de proceso, con y sin la adición de aditivos químicos. Los autores reportan que el máximo grado de expansión fue a 14% de humedad y que decrecía con el aumento de la humedad; la viscosidad aparente y el esfuerzo de corte se incrementó con el aumento del contenido de humedad y la solubilidad en agua disminuyó con el aumento del contenido de humedad inicial de la muestra. También, el almidón fue progresivamente degradado a medida que disminuía el contenido de humedad durante la extrusión.

Chiang and Johnson (1977) estudiaron algunos de los factores más importantes que afectan la gelatinización del almidón de trigo durante el proceso de extrusión, como la humedad (18, 21, 24 y 27%), temperatura (65, 80, 95 y 110°C), velocidad del tornillo (60, 100 y 140 rpm) y el tamaño del dado de salida (2/16, 3/16, 4/16 y 6/16 pulgadas). En este trabajo, los autores utilizaron un extrusor de laboratorio de tornillo simple de $\frac{3}{4}$ de pulgada, longitud / diámetro 25 a 1, con una relación de compresión de 3:1, marca Brabender, modelo 2503. Los autores reportan que tanto la temperatura, el contenido de humedad y la velocidad del tornillo, así como la interacción entre la temperatura y la humedad, afectaron significativamente la gelatinización del almidón. Así mismo, esta última se incrementó bruscamente con el incremento de la temperatura, se observó que con humedad de (24 a 27%); se incrementó más suavemente en contenidos bajos (18 a 21%) de humedad. Por otro lado, el grado de gelatinización presentó una muy ligera disminución al incrementar la humedad, a temperaturas de operación del orden de (65 a 80°C). No obstante, a temperaturas altas (95 a 110°C) la gelatinización aumentó significativamente con el aumento de la humedad. También, el incremento en la velocidad del tornillo y en el diámetro del dado de salida disminuyó la gelatinización, lo cual pudiera deberse a la disminución de los tiempos de retención. Finalmente, los autores reportan que el procesamiento de extrusión degrada los polisacáridos del almidón ya que encontraron que los niveles de mono y disacáridos fueron incrementados significativamente.

Gómez y Aguilera (1983) caracterizaron productos de maíz extrudidos bajo diferentes condiciones de humedad (23.7, 18.5, 15.4, 13.9 y 7.6%) y cuantificaron el grado de degradación del almidón, utilizando un extrusor Wenger X-5 de laboratorio con una velocidad del tornillo de 750 rpm, dado de salida de 4.0 mm de diámetro interno. Estos investigadores encontraron que a menor contenido de humedad (CH) fue mayor la temperatura en el dado de salida, mayor la susceptibilidad enzimática (gramos de maltosa/100 g de muestra), mayor el grado

de gelatinización (GG, %), mayor el índice de yodo (BV), menor los carbohidratos insolubles en agua (CIA, %), mayor el índice de solubilidad en agua (ISA, %) y menor el índice de absorción de agua (IAA, gramos de agua / gramos de materia seca). Finalmente, los autores reportan una alta correlación negativa entre CIA y ISA ($r = -0.979$), lo que sugiere que la fragmentación de los carbohidratos es la principal fuente del material soluble en agua; una correlación de $r = 0.963$ entre GG e ISA, indicó que en el caso de productos extrudidos el GG podría ser considerado como un indicador del grado de degradación del almidón. También, reportaron que el IAA depende de la disponibilidad de grupos hidrofílicos, los cuales ligan las moléculas de agua y de la capacidad de formación de gel de las macromoléculas. Los autores concluyen que la dextrinización parece ser el mecanismo predominante de la degradación del almidón durante el proceso de extrusión a baja humedad y alto corte, lo cual quedó evidenciado mediante estudios viscoamilográficos y de microscopía electrónica de barrido.

Case et al. (1992) estudiaron los efectos de la gelatinización sobre propiedades mecánico - texturales en productos de trigo y de maíz, con contenidos de humedad de 28% para harina de trigo y de 35% para mezclas de harina y almidón de maíz y para almidón de trigo. El trabajo fue efectuado en un extrusor de doble tornillo, marca Werner & Pfleiderer, modelo ZSK30, con un dado de salida rectangular (50.8 X 0.7614 mm) para obtener un producto no expandido de tercera generación, el cual posteriormente fue sometido a freído. Las temperaturas evaluadas fueron entre de 60 a 120° C, una velocidad del tornillo de 50 a 175 rpm y una alimentación de 5, 10 y 15 Kilogramos / hora. Reportan que a mayor grado de gelatinización de los almidones, la expansión del producto freído era mayor. Estos resultados fueron similares a los reportados para productos que fueron directamente expandidos en la salida del extrusor. La densidad aparente (DA) de los productos expandidos tendió a disminuir con el aumento en el grado de gelatinización (GG), siendo mínima (160 Kg. /m³ con un 75% de gelatinización, para los cuatro materiales estudiados. La textura de los productos freídos presentó un comportamiento parabólico, con un aumento en la fuerza máxima necesaria para quebrar (FM) los productos a medida que aumentó el grado de gelatinización y después de alcanzar el máximo la fuerza tendió a disminuir con el aumento de la gelatinización. *Case et al. (1992)* concluyen que el uso de GG, DA y FM pueden ser buenos estándares de medición para comparar almidones de diferentes especies y para comparar resultados de diferentes extrusores *Orford et al. (1993)* señalan que la extrusión de los materiales conteniendo almidón causa grandes cambios micro estructurales y modificaciones de las propiedades funcionales, por lo que estudiaron el efecto de las diferentes condiciones de extrusión sobre el tamaño molecular y propiedades funcionales de almidón de maíz ceroso con 98% de amilopectina. En sus estudios reportan que la viscosidad intrínseca del material extrudido fue la mitad de la del material original, debido a una disminución en el tamaño molecular medio. Además, el índice de solubilidad en agua aumentó con la degradación del almidón y que la viscosidad de la dispersión estaba relacionada con la viscosidad intrínseca y con el peso molecular. Los autores concluyen que de acuerdo a los análisis de calorimetría y un adecuado control de la temperatura a la que es sometida la muestra, combinado con la degradación, puede ser usado

para manipular las propiedades de cristalización de productos basándose en almidón.

2.4.2 Interacción proteínas - almidón por proceso de extrusión

Muchos productos alimenticios con bajo contenido de humedad aunque a alto porcentaje de proteína y almidón son fabricados, tales como las pastas, botanas y cereales para desayuno (*Matz 1991*). Los alimentos fabricados son típicamente expuestos a altos tratamientos térmicos durante el procesamiento, el más popular en la industria de los alimentos es la extrusión. Los extrusores combinan altas temperaturas con baja humedad, alta cizalla y presión generando una variedad de texturas. El contenido de humedad de los materiales extrudidos es usualmente entre 15 y 40% a estos niveles de humedad, desnaturaliza la proteína y el almidón gelatiniza a altas temperaturas más que en sistemas de alta humedad. Las modificaciones de la proteína durante el proceso de extrusión son pobremente entendidas. Se tiene evidencias que sugieren que las proteínas tienen la carga, tamaño, y forma alineada correctamente durante el tiempo de residencia en el extrusor, después que la masa es extrudida y enfriada las moléculas de proteína se encuentran correctamente alineadas, interacciones pueden ser formadas estabilizando el producto final. *Lai y Kokini 1991* indican que la alta fuerza de cizallamiento en el extrusor juega un papel importante en la determinación de las propiedades de los productos extrudidos. En cuanto al almidón debido a que la humedad es limitada durante la extrusión este puede existir en sus dos estados plastificado y gelatinizado, los polímeros de amilosa y amilopectina pueden estar reducidos a fragmentos. Como resultado de la fuerza de cizalla aplicado a moléculas de amilopectina, estas son fragmentadas principalmente en los enlaces α 1-6, este fenómeno es atribuido a la disminución en la viscosidad, con el incremento en el contenido de agua disminuye la fuerza de cizalla aplicado a la molécula (*Davidson 1994*). Los productos de la fragmentación macromolecular son del orden de 50,000 – 200,000 de peso molecular (PM), límites de 10^5 a 10^7 PM para los fragmentos fueron reportados por *Van Lengerich (1990)* y *Politz et al (1994)*, estos estudios también indican que a mayores contenidos de agua de 20 – 30%, disminuye la fragmentación de los polímeros. En contraste a estas observaciones *Wen et al (1990)* encontraron que las proteínas del maíz fueron más resistentes al cizallamiento y no fragmentan durante la extrusión. El efecto del SME (Specific Mechanical Energy) en la gelatinización del almidón fue debido probablemente a la ruptura de los enlaces de puentes de hidrogeno por fuerzas mecánicas, catalizando el proceso de gelatinización (*Wang et al 1992*). De acuerdo con *Linko et al (1992)* y *Tang et al (1994)* el efecto de la extrusión en el almidón provoca la ruptura de la estructura granular, así como la parcial o total destrucción de la estructura cristalina. Teniendo por lo tanto un efecto en las propiedades funcionales como son los índices de absorción y solubilidad en agua, la relación de la expansión y cambios en la viscosidad tanto en el ciclo de calentamiento como en el de enfriamiento del almidón extrudido.

El efecto de la extrusión en la estructura de la proteína ha sido menos estudiada, en harina de maíz extrudida las proteínas resultan ser menos solubles en alcohol y soluciones alcalinas que inicialmente, debido a que los grupos sulfhídrico libres y enlaces de disulfuro de las proteínas sufren modificaciones cuando expuestos a

alta temperatura y presión, resultando en la insolubilización (*Abe et al, 1985*). Otras investigaciones indican que los enlaces de disulfuro juegan un papel menor en la texturización por extrusión y proponen que los enlaces de amida son los responsables por la formación de la textura. *Neuman et al (1984)* mostraron que los enlaces de disulfuro en harina de soya son importantes y no encontraron evidencia apreciable de enlaces peptídicos intermoleculares. *Wen et al (1990)* observo que la máxima fragmentación del almidón generalmente ocurre a menor contenido de humedad (20%) y baja temperatura (100°C) y alta velocidad del tornillo (300 rpm) y que la proteína disminuye su solubilidad debido a la desnaturalización térmica, oxidándose los grupos sulfhídrico y la destrucción de los aminoácidos tirosina serina y treonina. *Alonso et al (2002.)* Observaron la perdida de solubilidad de harinas de frijol kidney y arveja cuando fueron extrudidas. Sin embargo cuando la proteína de soya fue extrudida con el objeto de inactivar los factores antinutricionales mejoró su solubilidad y digestibilidad, cuando esta fue procesada a menor velocidad de extrusión y alta temperatura, (*Ainsworth et al 1999*). *Pommet et al (2003)* observaron que al extrudir la proteína de soya esta sufre agregación a través de enlaces cruzados y la energía de activación fue dependiente de las condiciones de extrusión. El incremento en la densidad reticular parece ser inducido por la severidad del tratamiento, la temperatura y fuerza de cizalla afectan las características estructurales del bioplastico proteína.

Chang et al 2001 extrudieron proteína de soya con almidón de yuca y observaron un incremento en la expansión de los productos. Reportando que una mayor concentración de proteína de soya resultó en un mayor volumen específico con alta temperatura y concentración de proteína se obtuvieron mayor absorción de agua y menor solubilidad. *Wang et al 2003* realizaron la extrusión de zeína con ácido oleico como plastificante para la formación de películas y observaron que la formación de la resina fue consecuencia de la interacción de los componentes promoviendo su plastificación.

2.4.2. Caracterización de extrudidos

Una gran variedad de métodos se emplean para caracterizar los extrudidos y para analizar los efectos de las variables del proceso por extrusión. Consecuentemente es difícil comparar los resultados obtenidos por los diversos centros de investigación por lo que es deseable emplear metodología estandarizada. En general los métodos preferidos son aquellos que incluyen los cambios en las propiedades físicas por la fragmentación del almidón, el grado de gelatinización, la desnaturalización de proteína, la inactivación enzimática y modificación de lípidos. Los análisis físicos más recurrentes para la caracterización de los extrudidos son la expansión que es expresada como la relación de áreas (*Mercier y Feillet 1975*) o diámetros (*Van Zuilichem et al 1975*), de la forma cilíndrica del extrudido entre el área o diámetro de la superficie de la matriz del extrusor, así como la relación de la expansión volumétrica que relaciona a ambas expansiones radiales y longitudinales propuestas estas ultimas por los modelos de Álvarez- Martínez et al (1988).

2.4.2.1 Expansión de productos extrudidos

Muchos estudios del comportamiento de la proteína de soya durante la extrusión se han llevado a cabo. *Faubion et al (1982)* reportaron que la adición de proteína de soya (8%) al almidón de trigo provocó un incremento en la expansión, sin embargo, la adición de proteína de gluten causó una reducción en la expansión. Por su parte *Martínez-Serna y Villota (1992)* observaron una reducción del 30 % en la expansión al adicionar 10% de proteína de suero de leche a almidón de maíz. En otros estudios *Wen et al (1990)* encontraron que la fragmentación de la amilopectina del almidón, debido al proceso de extrusión, fue del orden de 17 a 60% dependiendo de la humedad y velocidad de tornillo en el extrusor. El contenido de la amilosa así como la amilopectina en el almidón tienen influencia en la expansión siendo el alto contenido de amilopectina el que puede provocar una pobre expansión y viceversa alto contenido de amilosa provoca alta expansión (*Bhattacharya y Hanna 1987*). Adicional a lo anterior *Zhang y Hosney (1998)* reportaron que la presencia de partículas cristalinas da como resultado una pobre expansión. La densidad volumétrica es también una medida de la expansión y es expresada como Kg / m³.

De acuerdo con *Chinnaswamy y Hanna (1990)*, a menor humedad se incrementa la resistencia al flujo, lo cual incrementa el cizallamiento dentro del extrusor y a su vez, degrada las moléculas de almidón. Con relación al efecto de la temperatura, los autores reportan que el grado de expansión fue máximo a 150°C,

2.4.2.2 Índices de solubilidad y absorción de agua

La solubilidad en agua y la viscosidad aparente aumentaron con la temperatura y el esfuerzo de cizalla presentó un pico mínimo a 150°C. El aumento de la temperatura de extrusión incremento la degradación del almidón. Según; estos autores *Chinnaswamy y Hanna (1990)*, otros de los factores que afectan de forma importante las características funcionales y de expansión, son la calidad de la materia prima, contenido y composición de almidón, proteínas, lípidos y fibra. De éstos, uno de los que más afectan las características de expansión, es la relación amilosa - amilopectina. En dicho estudio encontraron que la solubilidad en agua de los productos extrudidos disminuían con el aumento en la concentración de amilosa (0-75% almidón nativo), en la muestra; el fraccionamiento de las moléculas mostró un comportamiento de disminución de la fracción I (amilopectina) y aumento de la fracción II (amilosa), proporcionalmente, a medida que aumentaba la concentración de amilosa y el mejor grado de expansión se presentó con un contenido de amilosa del 50%. Asimismo, los autores reportan que aparentemente el peso molecular promedio y la fragmentación de las moléculas de almidón son las que controlan el grado de expansión, más aún que la naturaleza cristalina o el grado de gelatinización de estos. *Tang and Ding (1994)* establecieron una relación cuantitativa entre las propiedades funcionales y modificaciones macromoleculares de almidón extrudido, desde el punto de vista estructura - molecular. Se cree que la expansión en los materiales extrudidos a la salida del dado ocurre como un resultado de una desorientación de macromoléculas que son orientadas dentro del dado por alto esfuerzo de corte. Por otro lado, desde el punto de vista tecnológico, se cree que la expansión ocurre como un resultado de la recuperación de la deformación elástica de fusión impuesta en el dado. Lo que es claro, es que la expansión de los extrudidos depende de las propiedades reológicas de los polímeros del almidón las cuales, a

su vez, dependen de los parámetros moleculares, es decir peso molecular, distribución del peso molecular, grado de rompimiento de las moléculas. De acuerdo con sus investigaciones, *Tang and Ding (1994)*, dedujeron que la extensión de la degradación molecular en el almidón extrudido puede predecirse usando el grado de expansión y concluyen que los efectos mecánico y químico sobre la extrusión de almidón o materiales amiláceos puede ser controlado fácilmente "in situ" por mediciones de la expansión y por ajuste de las condiciones operacionales.

Cuando un almidón extrudido es dispersado en agua sus propiedades funcionales centrales son la absorción y solubilidad en agua. Un almidón nativo no absorbe agua y su viscosidad es cercana a cero. sin embargo, un almidón extrudido absorbe agua formando una pasta Esta pasta es formada tanto por las moléculas solubles como por los gránulos hinchados por el agua que forman un gel Estas dos propiedades son afectadas por el tamaño de las partículas, observando que al disminuir el tamaño de las partículas se incrementan la velocidad y el nivel de solubilidad.

El índice de absorción en agua se correlaciona con viscosidad de la pasta en frío debido a que únicamente el almidón modificado absorbe agua y se hincha modificando así su viscosidad. En cambio la absorción de agua decrece con el aumento en la dextrinización del almidón (*Kim y Rottier 1980*). El IAA (índice de absorción en agua) es el peso del gel obtenido por gramo de muestra seca. Siguiendo el método propuesto por *Anderson et al, (1969, 1982)*, Desarrollado como una medida del poder de hinchamiento del almidón.. El IAA se correlaciona con la viscosidad de la pasta en frío esto debido a que únicamente los gránulos de almidón gelatinizado absorben agua a temperatura ambiente y el hinchamiento del almidón da como resultado un incremento en la viscosidad (*Van Zuilichem 1978*). El IAA decrece con el comienzo de la dextrinización. La capacidad de absorción de agua de harinas ha sido medida usando la viscosidad de una suspensión de harina agua a 30°C (*Kim y Rottier 1980*).

El índice de solubilidad en agua ISA expresa como el porcentaje de sólidos en base seca recuperados después de la evaporación del sobrenadante de la determinación de IAA (*Anderson 1969*) Este índice relaciona la cantidad de sólidos solubles de una muestra seca y mide la dextrinización. De acuerdo con *Tang and Ding (1994)* el índice de solubilidad en agua (ISA) se incrementa conforme aumentan la velocidad del tornillo y la temperatura de extrusión y disminuye con el aumento del contenido de humedad, contrario a esto, el índice de absorción de agua disminuye conforme aumentan la velocidad del tornillo, la temperatura de extrusión y el contenido de humedad, Estos investigadores concluyen que los cambios en ISA y en viscosidad aparente pueden ser explicados en términos de la degradación macromolecular ocurrida.

2.4.2.3 Fuerza de compresión para la desintegración de los extrudidos

Estudios realizados por *Mercier y Feiller (1975)*, determinaron la energía requerida para el quebrado de los extrudidos colocando las muestras en una celda cubierta y midieron la resistencia al corte con un cortador especial accionado a una velocidad de 4.7 cm/min. La muestra fue colocada en un canal que diseñado especialmente

para prever un contacto directo del cuchillo y la muestra. Según *Abecassis et al (1974)* reportaron la energía de corte fue calculada como el valor máximo en kilogramos por gramo y fue seleccionada como un índice de energía requerida para la subdivisión del extrudido. *Antila (1979)* usando un analizador marca Zwich diseñado especialmente para este fin, determinó la energía requerida para la fragmentación de piezas expandidas de extrudidos de 20 cm de longitud y de forma cilíndrica, La textura es una medida empleada para conocer la dureza o fragilidad de los extrudidos a través del siguiente modelo matemático $I = E/\pi r^2$ siendo I = la firmeza del extrudido en KJ / m² , E = energía requerida para el quebrado del extrudido en KJ y r = radio del extrudido.en m².

2.4.2.4 Propiedades Reológicas de viscosidad

La viscosidad inicial de una suspensión de almidón nativo es cercana a cero. Por el contrario la viscosidad inicial de un almidón pregelatinizado como es el caso de un almidón extrudido es muy superior a cero y este valor depende ampliamente entre otros factores del grado de gelatinización y la cantidad de gránulos de almidón fragmentados. Este almidón pregelatinizado presenta la propiedad de absorber rápidamente agua y formar una pasta a temperatura ambiente *El Dash et al (1983)*.

También de forma contraria al comportamiento de un almidón nativo el almidón extrudido disminuye su viscosidad inicial al incrementarse el tratamiento térmico debido a que ocurre un rompimiento de los polímeros del gránulo de almidón con una consecuente reducción en la viscosidad inicial.

Mercier (1977) observó que la viscosidad inicial de un extrudido fue proporcional al incremento de la temperatura de extrusión, este incremento de la viscosidad inicial se logró hasta una temperatura límite de aproximadamente 150°C. Sin embargo cuando un almidón nativo es procesado a temperaturas superiores a esta temperatura límite el efecto es negativo dada una posible fragmentación estructural del almidón por efecto de las altas temperaturas del procesamiento.

2.4.2.5 Diferencial de color de extrudidos

Paralelamente al desarrollo de los colorímetros tristímulo y tomando como base la teoría de colores opuestos de Hering se desarrolló el sistema **L, a, b** de Hunter con estas nuevas coordenadas se define un espacio cartesiano en la que **L** corresponde a la claridad y **a** y **b** a la cromaticidad *Calvo y Durán (1997)* Concretamente **a** define el componente rojo-verde, rojo para valores positivos y verde para valores negativos. El parámetro **b** define el componente amarillo-azul, amarillo para los valores positivos y azul para los valores negativos en donde la diferencia de color de dos muestras en este sistema Hunter viene dada por la expresión:

$$\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$$

La formación de color durante el procesado por extrusión puede proveer importante información referente al grado de tratamiento térmico. *Lorenz et al (1974)* mostraron que el oscurecimiento de una muestra fue mayor al incrementarse la temperatura de procesamiento de forma contraria un color mas ligero se observó al incrementarse el contenido de humedad de la misma muestra

También el oscurecimiento es relacionado a la pérdida del contenido de lisina *Conway et al en (1968)* usando en sus estudios mezclas de maíz y soya. El oscurecimiento de una muestra extrudida puede ser debido a la caramelización de los carbohidratos, la reacción de Maillard entre los azúcares reductores y el grupo amino libre de los aminoácidos de la proteína y el efecto de productos de descomposición oxidativa de lípidos y proteínas (*Dworschak, 1980*). La reacción de Maillard puede causar un indeseable oscurecimiento durante el procesamiento térmico y almacenamiento y esto es importante en cuanto a la formación de color y sabor en el tratamiento térmico de alimentos como lo es en productos de panificación (*Linko 1962 Johnson y Linko, 1964,*).

2.4.2.6 Difracción de rayos X en productos extrudidos

El almidón es considerado un material semicristalino ya que contiene ambas regiones amorfas y cristalinas. Las regiones amorfas son debidas principalmente a la presencia de amilosa la cual es completamente amorfa y la amilopectina la cual es tiene ambas regiones amorfas y regiones cristalinas altamente ordenadas. El gránulo de almidón es aproximadamente 30% cristalino, porque los sitios cristalinos exhiben un alto grado de orden, por lo que presentan birrefringencia bajo la luz polarizada (*Davis., 1994*). La fusión de cristales durante la gelatinización es analizado por estudios de difracción de rayos X, los cuales indican la pérdida de birrefringencia por pérdida del orden cristalino y por medidas de calorimetría que muestran la pérdida del orden estructural. Cuando un cristal es irradiado por rayos X se forma un modelo distintivo de la estructura del cristal. Esta técnica ha sido usada para estudiar los almidones de naturaleza cristalina. Hasta hoy en día se han identificado tres tipos al caracterizar los almidones. El tipo A para almidones procedentes de los cereales,. el tipo B para almidones de tubérculos y el tipo C para almidón de leguminosas adicionalmente a estos modelos se ha encontrado un tipo V para los almidones recristalizados con la presencia de un ácido graso o un alcohol de cadena larga formando complejos interrelacionados. Esto es atribuido a la formación de complejo de almidón, en el cual las cadenas glucosídicas forman una hélice con una fracción hidrofílica y otra hidrofóbica con una molécula no polar como la de un lípido. Esto es similar al complejo yodo - almidón

Para la mayoría de los almidones, la cristalinidad es atribuida a los grados de polimerización cortos de la cadena de amilopectina (14-20 unidades de glucosa); periodicidad cristalina de 50-70 Å originado por la presencia de enlaces α -(1-6) (*Robin et al., 1974*). Trabajos en estructuras del tipo A y B en almidón (*Imberty and Pérez, 1988; Imberty et al., 1988*) establecieron que la estructura tridimensional corresponde a un empaquetado hexagonal paralelo, formación de dobles hélices paralelas en sentido izquierdo y el resultado estructural deriva de difractogramas de rayos X en fibras artificiales validas para polimorfismos nativos. Aunque la geometría de doble hélices es idéntica en las formas A y B, las dos estructuras difieren en el contenido de agua y arreglo cristalino (*Wu y Sarko, 1978 a,b*). La fase amorfa del almidón granular es también heterogénea consistiendo de amilosa amorfa y regiones de amilopectina densamente ramificada. La implicación de tal complejo morfológico es que la propiedad térmica y el comportamiento de plastificación del almidón por el agua variará en la fase amorfa

La extrusión destruye el orden de la estructura cristalina en una forma parcial o completamente, dependiendo de la relación de amilosa – amilopectina y de las variables de extrusión, así como el contenido de humedad y cizalla. Los almidones de los cereales se comportan completamente diferentes (*Mercier et al 1979*). El almidón comercial de maíz con 22% de humedad extrudido a 135° C formó un nuevo tipo de estructura caracterizado por tres picos centrales en el modelo de difracción de rayos X. El mayor pico fue localizado a 9°54' similar al espectro correspondiente al complejo butanol-amilosa conocido como la estructura V. amilosa. Cuando el almidón fue extrudido a temperaturas mayores de 185°C y el contenido de humedad fue del 13% se estableció una nueva estructura llamada tipo-E. Esta estructura fue caracterizada por tres picos significativamente desplazados de los del tipo-V siendo el pico central a 9°03'; a 170°C ambos tipos E y V aparecen. Acondicionando los productos a 30% de humedad algunas veces se transforma la estructura del tipo-E a la forma estable tipo-V. Similarmente todos los almidones de cereal con 30% de humedad inicial extrudidos a temperaturas superiores a 170°C exhiben un modelo de tipo-V este fenómeno ha sido observado en almidones de trigo arroz y maíz de alto porcentaje de amilosa (52 y 61%)

La similitud entre los tres picos centrales de los modelos tipo E y V, y las transformaciones del tipo E al tipo V fueron conducidos por *Mercier et al (1979)*. Estos autores sugieren que estructura del tipo E es helicoidal, semejante a la estructura tipo B en la cual hay seis residuos de glucosa por ciclo en una red hexagonal. Las diferencias entre las dos estructuras pueden ser atribuidas a las diferentes distancias interaxiales en las dos hélices. De acuerdo a los datos de rayos X la distancia interaxial de la hélice del tipo V puede ser 1.38 nm y para el tipo E de 1.50 nm. En niveles de humedad menores que 19% el espectro fue inmodificable únicamente se observó un ligero cambio en la distancia interaxial de 1.38 a 1.31 nm del tipo V-amilosa y de 1.50 a 1.47 para el tipo E. Así mismo se observó que con humedades del orden del 30% el tipo E fue irreversiblemente transformado dentro del tipo V.

Los resultados del análisis de difracción de rayos X por extrusión sugieren que la estructura del almidón de los cereales es reorganizado dentro de un complejo helicoidal de tipo V-amilosa y que la estructura del tipo E es causada por la variación en la distancia entre dos hélices teniendo el mismo número de residuos de glucosa preferentemente que por la presencia de dos diferentes hélices.

El grado de cristalinidad puede ser determinado separando las dispersiones de las regiones cristalinas y amorfas en la difracción de rayos X.

El grado de cristalinidad (X_c) puede ser calculado de:

$$X_c = \frac{\int_0^{\infty} s^2 I_c(s) ds}{\int_0^{\infty} s^2 I(s) ds}$$

Donde:

I es la intensidad de dispersión de una muestra desconocida

I_a es la intensidad de dispersión muestra de referencia amorfa

I_c es la intensidad de dispersión muestra de referencia cristalina
 K es una constante la cual puede ser calculada de la inclinación de la curva
obtenida por el trazo de la grafica de $I - I_a$ contra $I_c - I_a$

2.4.2.7 Propiedades de térmicas de productos extrudidos (DCS)

La calorimetría diferencial de barrido es la técnica mas adecuada para el estudio de la energía de las transiciones de fase de biopolímeros (proteínas y carbohidratos) esta técnica permite la caracterización termodinámica de los cambios conformacionales inducidos por los cambios de temperatura en los biopolímeros (*Freire et al., 1990, Cooper et al., 1994 y Sánchez Ruiz., 1995*).

En un experimento de calorimetría diferencial de barrido se registra de forma continua la capacidad calorífica aparente de cualquier macromolécula en función de la temperatura obteniéndose un termograma. Este generalmente está caracterizado por un pico de absorción de calor correspondiente a un proceso endotérmico (transición térmicamente inducida). Los datos cualitativos obtenidos por DSC incluyen temperaturas de transiciones sólido – sólido, cristalización, fusión, rehidratación y desnaturalización. Así como datos cuantitativos de DSC incluyen la entalpía de las transiciones o reacciones, la capacidad calorífica y el grado de cristalinidad. *Lund (1983)* revisó las aplicaciones de DSC en alimentos destacando tres transiciones de fase importantes hielo – agua, desnaturalización de proteínas y la gelatinización del almidón. Otras medidas que proporciona el método son parámetros termodinámicos globales como el cambio de entalpía [ΔH], de entropía [ΔS], de energía libre de Gibbs [ΔG] y de la capacidad calorífica [ΔC_p] asociados a la transición inducida por la temperatura.

2.4.2.7.1 Transición de fase para Proteínas

La transición de fase de las proteínas afectan el estado físico y características de textura de varios alimentos. La transición más importante que ocurre en las proteínas es la desnaturalización. Las proteínas nativas desnaturalizan cuando ellas son calentadas en la presencia de agua. La desnaturalización puede ser considerada a ser una fase de transición irreversible que incluye un calor endotérmico de desnaturalización. Otro importante estado de transición de proteínas es la transición vítrea, las proteínas son biopolímeros que son plastificados por agua (*Yannas 1972, Slade y Levine 1995*).

Foegeding (1988) definió la temperatura de gelatinización como la temperatura en la cual la concentración de la proteína nativa adquiere igual concentración que la proteína desnaturalizada. Muchas proteínas desnaturalizan en el rango de temperaturas de 50 a 80° C. La temperatura y el calor de desnaturalización ΔH_d son obtenidos por DSC. La desnaturalización de las proteínas ocurre en un rango de temperatura que es específico para cada proteína también depende de la presencia de otros componentes y del pH. *Went et al (1990)* encontraron que las proteínas del maíz fueron mas resistentes a las fuerzas de cizallamiento y no fragmentan durante la extrusión.

2,4,2.7.2 Transición de fase para almidón

Las transiciones de fases del almidón son extremadamente importantes en el procesado de alimentos. De acuerdo a *Whittam et al (1991)* la temperatura de fusión y transición vítrea son los parámetros más importantes para caracterizar las propiedades físicas de los polímeros de almidón en un amplio rango de temperaturas. Varias técnicas de determinación de la temperatura de gelatinización de almidones ha incluido el microscopio con luz polarizada para el análisis de birrefringencia, la detección de cambios en la viscosidad con un viscoamilografo detección de cambios en la cristalinidad por medio de difracción de rayos X y la determinación de propiedades térmicas por DSC.

La manifestación de dos eventos térmicos destacables durante la gelatinización, cuya localización e importancia depende del contenido de agua, ha sido sujeto a varias investigaciones que han producido diferentes explicaciones. Por analogía con polímeros sintéticos algunos autores (*Evans and Haisman, 1982* y *Donovan, 1979*) han propuesto que la gelatinización del almidón es un proceso de fusión de cristales-solvente (esto es una fusión /disolución), el cual cumple con la ecuación de *Flory-Huggins (Flory, 1953)*. De acuerdo a *Evans y Haisman (1982)*, los sucesivos picos endotérmicos corresponden a transiciones de fusión de materiales cristalinos con diferente estabilidad a diferentes niveles de humedad (primera etapa), los gránulos tienen una cristalinidad media estable cooperativamente (esto es el menor pico de temperatura), y consecuentemente, la concentración de agua efectiva para los gránulos de almidón sin gelatinizar remanescientes es reducida, debido a la absorción de agua por la cadena de polisacáridos desordenada. Finalmente los gránulos remanescientes funden a altas temperaturas (el segundo pico), definido por la ecuación de *Flory-Huggins. Donovan (1979)* propuso una explicación a escala molecular, indicando que a menor temperatura endotérmica refleja "remoción" y desorganización de cadenas de polímeros de la región cristalina, procesos que son facilitados por la acción de hinchamiento del gránulo de almidón por el agua en las regiones amorfas. Una tercera interpretación asume (*Russell, 1987*) que las dos endotermas están relacionadas con la separación de las dobles hélices, asociadas con segmentos de intervalos cortos ordenados de amilosa y amilopectina, seguido por la fusión de cristales (intervalo largo ordenado).

Algunos autores (*Slade y Levine, 1988; Biliaderis et al, 1986*) han considerado al almidón semejante a otras entidades parcialmente cristalinas, presentando un carácter de inestabilidad. Sin embargo sugieren que la gelatinización del almidón es un proceso de fusión sin equilibrio controlado por la transición vítrea localizado en el borde principal de la primera endoterma (*Slade y Levine, 1988*). Un proceso más complejo que envuelve la parcial fusión seguido por la recristalización y fusión final durante la medición del DSC, también fue indicado por (*Biliaderis et al, 1986*). Mas recientemente *Show and Teo (1993)* propusieron que la primera endoterma puede ser resultado de un estado de transición vítrea o gomosa asociado con la entalpía de la relajación, sobrepuesta a la endoterma de fusión cristalina. Todas estas explicaciones son basadas esencialmente en experimentos en el DSC, los cuales han mostrado un incremento en la capacidad calorífica asociado con el inicio de la primera transición (*Slade y Levine, 1988*), la fusión de complejos amilosa-lípidos formados durante el barrido del DSC (*Biliaderis et al, 1986*) y finalmente, como para muchos polímeros sintéticos (*Wunderlich, 1990*), la tasa de

calentamiento depende del perfil de DSC muestra el desaparecimiento de la segunda endoterma a altas tasas de calentamiento.

En las curvas de DSC dos diferentes etapas fueron evidentes como mayores eventos endotérmicos, abajo y arriba de 75°C (para un calentamiento de 3°C/min). A través de difracción de rayos X dinámico, los cambios de cristalinidad fueron observados en la primera etapa del DSC.

Kaletunc y Breslauer (1993, 1996) y Barrett y Kaletunc (1998) usaron el modelo de almidón fragmentado para explicar sus resultados, que mostraron una disminución en la temperatura de transición vítrea o gomosa (T_g) con el incremento de la fuerza de cizalla. Estudios de *Gropper et al 2002* indicaron que el efecto de la energía mecánica específica (SME) en un rango de 344 a 2108 kJ/kg, en una mezcla de proteínas – almidón, no cambia significativamente el T_g de los productos aun a pesar que previos estudios reportaron una disminución de T_g debido a la fragmentación del almidón, estos estudios fueron realizados con mezclas de almidón proteínas extrudidas, las pruebas de DSC fueron realizadas con a_w de 0.546 y 0.326. *Van Lengerich (1990) y Politz et al (1994)* mostraron que el almidón durante la extrusión genera fragmentos mayores a 5x10⁴ a 10⁵ PM. *Gropper et al (2002)* encontraron que el límite de PM que afecta el T_g fue 1x10⁴ a 6.7x10⁴ a mayores PM no se podría esperar ningún efecto de la extrusión en el T_g de almidón. *Bindzus et al (2002)* observaron que la extrusión en diferentes fuentes botánicas de almidón, trigo maíz y arroz, provoca la fragmentación con diferente distribución de pesos moleculares, teniendo estructuras cristalinas del tipo V y E. La temperatura de transición vítrea (T_g) en el calorímetro diferencial de barrido de los almidones extrudidos fue independiente de la fuente botánica.

2.4.2.8. Propiedades Reológicas visco - elasticidad de productos extrudidos

El término reología fue inventado por el profesor Bingham Lafayette y significa el estudio de la relación de esfuerzo y deformación. Este estudio implica los cambios de forma y el flujo de la materia abarcando la elasticidad, viscosidad y plasticidad. La reología hoy en día contribuye al conocimiento de la estructura (tamaño y forma molecular) de las sustancias en disolución y su viscosidad. Así como al grado de entrecruzamiento de los polímeros y su elasticidad (*Méndez-Núñez y Solorza. (2001)*). La mayoría de los materiales manifiestan simultáneamente flujo viscoso y elástico denominado viscoelasticidad, mientras mas completa y resistente a la ruptura es la estructura de un material mas pronunciada es su elasticidad y mientras mas fácil se rompa su estructura mayor es su comportamiento viscoso (*Borwankar y Shoemaker, 1992., Steffe et al 1992*). Los métodos de medición para determinar las funciones viscoelásticas lineales de materiales se pueden dividir en dos categorías Método estático y dinámico.

Las pruebas dinámicas se han convertido en un método común para el estudio del comportamiento viscoelástico de un gran número de materiales. Según *Méndez-Núñez y Solorza. (2001)*, como los alimentos debido a que aportan resultados rápidos con un mínimo de cambios físicos y químicos. Cuando la amplitud de la deformación es pequeña de tal forma que el material se comporta de manera viscoelástica lineal el esfuerzo de corte producido al deformar la muestra (τ) esta dado por $\tau(t) = \tau_0 \sin(\omega t - \delta)$ en donde τ_0 es la amplitud del esfuerzo de corte y

δ es el ángulo de desfase respecto a la deformación cuyo intervalo de valores es $0 < \delta < 90^\circ$. La ecuación anterior se puede escribir como $\tau(t) = G' \gamma + (G'' / \omega) \dot{\gamma}$ en donde G' es el módulo de almacenamiento, que se define como el esfuerzo en fase con la deformación y es una medida de la energía almacenada y recuperada por el material en un ciclo y es un indicador del componente elástico del material. G'' es el módulo de pérdida y se define como el esfuerzo desfasado 90° respecto a la deformación, dividida por la deformación en una prueba de deformación sinusoidal. Es una medida de la energía disipada como calor por el material en un ciclo y es un indicador del componente viscoso del material. Ambos módulos G' y G'' están en función de la frecuencia y se pueden expresar en términos de la relación de amplitudes (τ_o / γ_o) y el ángulo de desfase

$G' = (\tau_o / \gamma_o) \cos(\delta)$
$G'' = (\tau_o / \gamma_o) \sin(\delta)$

Otra función usada para describir el comportamiento viscoelástico de materiales es la tangente del ángulo de desfase que es también una función de la frecuencia.

$\tan(\delta) = G'' / G'$

La $\tan(\delta)$ indica la relación entre la cantidad de energía disipada y la energía almacenada o sea entre la porción viscosa y la porción elástica.

Lindahl y Eliasson (1986) estudiaron la interacción de las proteínas de trigo con geles de almidón de maíz, cebada, trigo, triticale, centeno y patata analizando los cambios en las propiedades viscoelásticas provocados por la interacción de la proteína –almidón. Estos autores encontraron que a medida que se incrementó la proteína (gluten) el módulo de almacenamiento G' se incrementó. El gran valor observado de G' en almidón de maíz puede ser relacionado a la mayor rigidez de los gránulos de almidón de este cereal, sin embargo, el bajo valor de G' observados para almidón de papa y centeno puede ser debido a la baja rigidez de esos gránulos. Los valores del ángulo de fase muestra que el gel más elástico es formado por el almidón de maíz y triticale mientras que el gel más viscoso es el del almidón de papa y centeno, el bajo valor de δ de los geles de maíz y triticale puede ser atribuido al mejor contacto gránulo- gránulo en esos geles el cual puede ser debido a la formación de una red de carácter transitoria en el gel.

En la caracterización viscoelástica de pastas y geles de almidón es frecuente el uso de cizalla oscilatoria de baja amplitud. El comportamiento de los módulos dinámicos (G' , G'' y G^*) así como el ángulo de pérdida ($\tan \delta$) han proporcionado información del carácter elástico de estos sistemas (*Evans y Haisman 1979; Alloncle y Dublier 1991; Evans y Lips 1992; Eidam y Kulicke 1995; Abdulmola et al 1996; Tecante y Dublier 1999*) lo cual ha sido asociado a la presencia de partículas deformables en suspensión como gránulos intactos hinchados, gránulos fragmentados hinchados y gránulos no hinchados.

2.4.2.9 Espectroscopia infrarrojo

Espectroscopia infrarroja ha llegado a ser una de las técnicas más importantes para la determinación de las estructuras moleculares. La región del infrarrojo es una determinada zona de la radiación electromagnética situada más allá de la parte roja de la región visible, aunque no existen límites precisos de la separación de las diferentes regiones de la radiación electromagnética la región de infrarrojo suele considerarse como una zona comprendida entre las longitudes de onda de 0.75 a 1000 μm que corresponden a números de onda de 13,333 a 10 cm^{-1} . La región del infrarrojo se subdivide a su vez en tres regiones la del infrarrojo cercano (13,333 a 4000 cm^{-1}), infrarrojo medio o fundamental (4000 a 400 cm^{-1}) y la del infrarrojo lejano (400 a 10 cm^{-1})

La aplicación de la espectroscopia infrarroja al análisis cualitativo se basa en el hecho de que el espectro infrarrojo de cada sustancia es característico y único, ya que no hay dos especies químicas cuyos espectros infrarrojos sean exactamente iguales por lo que los espectros han sido considerados como las huellas digitales de las moléculas. Como es lógico los compuestos de estructura análoga en particular si son relativamente complejos, presentan espectros infrarrojos muy parecidos, pero siempre difieren en algunos detalles.

El espectro de infrarrojo confirma algunos grupos funcionales de biopolímeros en la formación de complejos (Zeleska et al 2001) diferenciando los espectros de almidón y caseína uno del otro así como de los complejos formados de almidón de papa y caseína.

Por los antecedentes revisados se puede indicar que aun es escaso el conocimiento referente al estudio de la interacción del complejo proteína – almidón por lo que los trabajos futuros tenderán a elucidar las interacciones de este complejo que establece la interacción entre los biopolímeros y su funcionalidad en los alimentos y desarrollar técnicas analíticas que describan los eventos moleculares que ocurren durante los procesos de elaboración de los diversos productos alimenticios, películas comestibles, microencapsulación películas para coberturas y materiales de empaque. Es así que en esta investigación se estudió la interacción del almidón con la caseína sometido a un proceso de extrusión, para poder conocer las modificaciones físicas y químicas en estos biopolímeros.

III. OBJETIVOS.

3.1 Objetivo general:

Estudiar los efectos de la interacción de los biopolímeros de almidón y caseína por el proceso de extrusión en sus propiedades estructurales, térmicas y viscoelásticas

3.2 Objetivos específicos:

3.2.1 Estudiar el efecto de la temperatura, humedad y concentración de los biopolímeros durante el proceso de extrusión en sus propiedades estructurales, térmicas y viscoelásticas

3.2.2 Análisis mediante técnicas estructurales, térmicas y viscoelásticas de las diferentes mezclas de biopolímeros.

4.1 Materiales

4.1.1 Materia prima:

Para el estudio de interacción de los biopolímeros se utilizaron almidón de trigo de la empresa Gluten de México S.A. de C.V. y caseína ácida, producida por "Lactoland Trockenmilchwerk GMBH"

4.1.2 Reactivo analítico: hidróxido de calcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$ Merck México

4.2 Equipos

Balanza Analítica Marca OHAUS Precisión Advanced. ± 0.1 g. USA.

Balanza Analítica Marca OHAUS Explorer Precisión ± 0.0001 g. USA.

Estufa eléctrica Marca J. M. Ortiz D6F774 150 °C 110 Volts 15 Ampers.

Parrilla con agitación Barnstead - Thermolyne Nuova II Modelo No. SP18425 120 Volts, 7.3 A 60 Hz. USA

Medidor de pH Corning / ion meter

Mini Scan™ X^E modelo N° 45/ D – L (Hunter CE 96 Associates Laboratory Reston, VA)

Viscosímetro RVA "Rapid Visco-Analyzer" modelo 4C (Newport Scientific PTY Ltd, Sydney, Australia)

Centrifuga "International Centrifuge" size 2 model k de International Equipment Co. Motor 0.75 HP 50/60 Hz. USA"

Texturometro "Texture Analyser" TA-XT2i. (Texture Technologies Corp). N.Y. U.S.A."

Mezcladora Kitchen Aid Classic MK4588WH, 250 W. USA

Calorímetro Diferencial de Barrido Perkin Elmer DSC Pyris 1

Espectrofotometro IR "Perkin Elmer" Spectrum one FT-IR Spectrometer

Agitador de frascos Motor LENDAD Tipo HS de 0.33 HP 5.7 A México.

Extrusor piloto de tornillo simple marca CICATA - IPN. México de capacidad hasta 12 Kg. h. Tornillo sin fin de diámetro 60 mm y longitud de 950 mm Provisto de tres zonas de calentamiento y de una tolva de alimentación. matriz de 12.5 mm.

Secador de charolas F. J. Stockes Corp. PA USA.

Molino de laboratorio Raymond de 16 in con alimentador de acción manual y una capacidad de 1 Kg/h. Motor de 2 HP USA.

Microscopio electrónico láser "Confocal Laser Microscopy" modelo MRC 1024 (Bio-Rad) equipado con un láser de criptón – Argón acoplado a un microscopio invertido Diaphot 200 marca Nikon

Colorímetro espectral 20 marca model

Reometro ARES-RFS III, TA Instruments, USA

4.3 Métodos.

4.3.1 Métodos Analíticos

4.3.1.1 Humedad

El contenido de humedad de las materias primas y de los extrudidos en polvo fue determinada usando el método oficial de la AACC, n° 44 – 19 (Novena edición 1995)

4.3.1.2 pH.

El pH de las materias primas igual que de los extrudidos en polvo fue determinado de acuerdo al método oficial de la AACC N° 02-52 (Novena edición 1995) disolviendo 10 g de muestra en 100 mL de agua destilada, se calibró previamente el equipo con soluciones buffer estándar de pH 4.0, 7.0 y 10.0 cada muestra se agitó durante 5 minutos y se registró el pH.

4.3.2 Métodos Estadísticos

Diseño experimental y análisis estadístico

La metodología de superficie de respuesta (RSM) en nuestro estudio fue seleccionada para analizar la influencia de las variables independientes en las características funcionales de los biopolímeros almidón – caseína Esta metodología de superficie de respuesta también fue usada para construir los modelos matemáticos para interpretar la relación entre las variables dependientes e independientes. Todos los tratamientos fueron desarrollados al azar y los datos fueron analizados usando el software TS020 SAS (Statistical Analysis System) versión 6.12 de SAS Inc., Cary..NC.,USA. La significancia de los modelos fue analizada usando el análisis de varianza (F y coeficiente R²). El diseño experimental, los valores de las variables independientes y los niveles de los parámetros de extrusión son presentados a continuación en las tabla 3 .

Tabla 3 Variables independientes y niveles de los parámetros de extrusión

Variable	Niveles				
	-1.662	-1.000	0.000	+1.000	+1.662
X ₁ en °C Temperatura	28.36	140.0	160.0	180.0	193.84
X ₂ en % Humedad	18.25	21.00	25.00	29.00	31.72
X ₃ en % Proporción de almidón	5.00	23.25	50.00	76.75	95.00

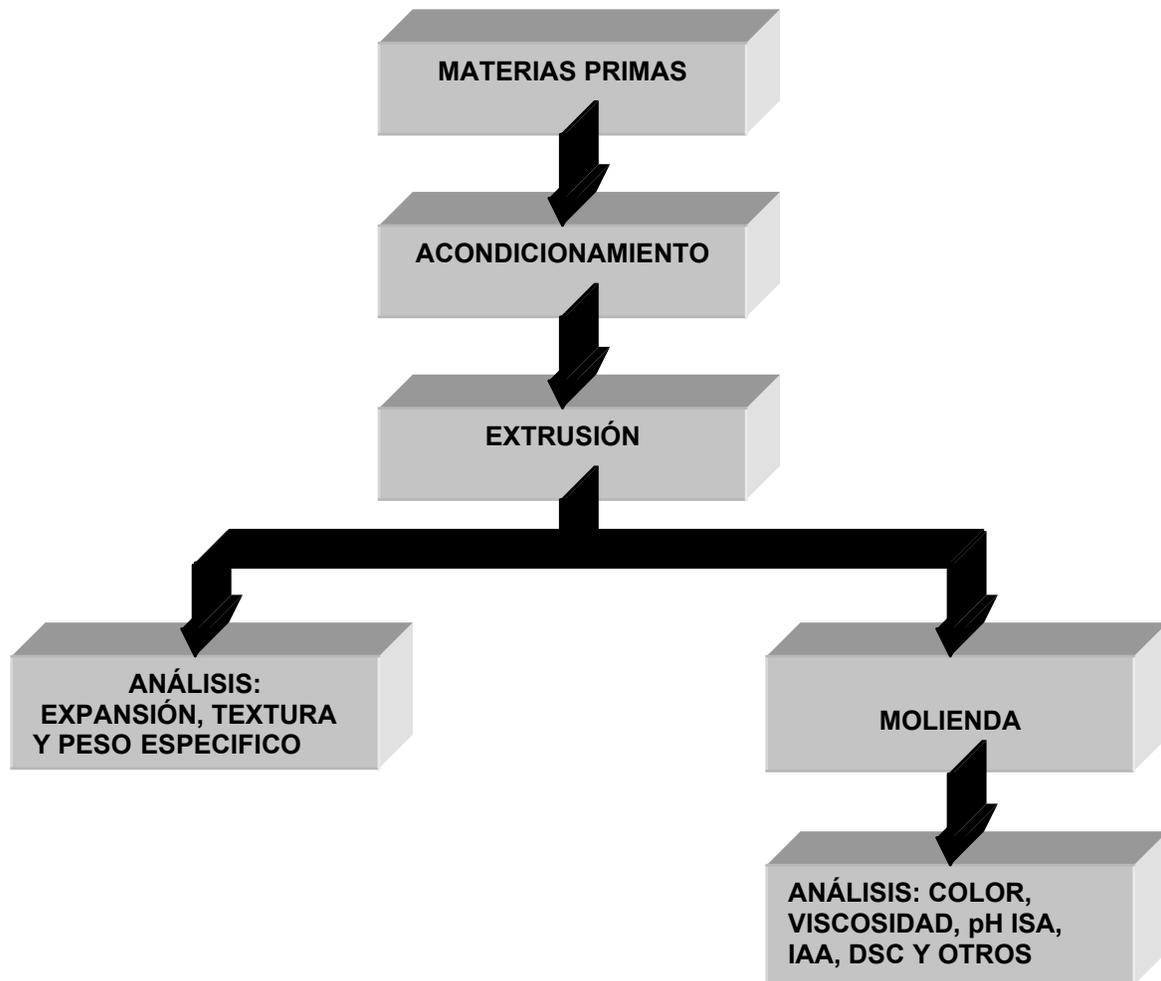
De igual Forma los valores reales de las variables independientes son presentados a continuación en la tabla 4

Tabla 4 Valores reales de las Variables Independientes

Corrida	Variables valor real		
	Temperatura °C	% Humedad	% Almidón
01	140.00	21.00	23.25
02	140.00	21.00	76.75
03	140.00	29.00	23.25
04	140.00	29.00	76.75
05	180.00	21.00	23.25
06	180.00	21.00	76.75
07	180.00	29.00	23.25
08	180.00	29.00	76.75
09	193.64	25.00	50.00
10	160.00	31.72	50.00
11	160.00	25.00	95.00
12	126.00	25.00	50.00
13	160.00	18.27	50.00
14	160.00	25.00	05.00
15	193.64	25.00	50.00
16	160.00	31.72	50.00
17	160.00	25.00	95.00
18	126.36	25.00	50.00
19	160.00	18.27	50.00
20	160.00	25.00	05.00
21	160.00	25.00	50.00
22	160.00	25.00	50.00
23	160.00	25.00	50.00
24	160.00	25.00	50.00
25	160.00	25.00	50.00

4.3.3 Métodos experimentales

Las etapas de la metodología experimental están representadas por medio del siguiente diagrama de flujo



4.2.3.1 Preparación de las muestras

Las muestras fueron preparadas mezclando caseína, almidón, el hidróxido de calcio necesario para ajustar el pH a 6.5 en la mezcla. El mezclado de los componentes fue llevado a cabo mediante un mezclador, "Kitchen Aid Classic modelo MK4588WH" y finalmente adicionando agua de acuerdo al diseño experimental presentado en la tabla 4, finalmente las muestras fueron almacenadas a 4°C en bolsas de polietileno para la subsiguiente etapa del proceso.

4.2.3.2 Proceso de extrusión

El proceso de extrusión de las muestras fue desarrollado usando un extrusor de tornillo simple fabricado en CICATA. – I.P.N..México. El cual consta de un tornillo sin fin de 950 mm de longitud (L) y 60 mm de diámetro (D) con una relación L/D de 15.8:1.0 El barril del extrusor tiene tres zonas independientes de calentamiento y/o enfriamiento. El calentamiento es llevado a cabo por medio de resistencias eléctricas y el enfriamiento es llevado a cabo a través de canales por medio de circulación de aire frío comprimido. La relación de compresión del tornillo fue de 1:1 y el diámetro del orificio de la matriz empleado fue de 12.5 mm. El equipo está dotado de tres termopares para el monitoreo de la temperatura del barril y un termopar extra colocado en el plato de la matriz para medir la temperatura y presión del producto Los materiales fueron alimentados al interior del extrusor a razón de 70 gr. / min. Controlando este flujo con un motor eléctrico fabricado por "Baldor Electrical Co" (FT Smith Ark Cat. GPP7454 MDF U.S.A.) El total de la potencia eléctrica instalada en el extrusor es de 10.46 kW incluyendo las resistencias eléctricas que calientan el barril. El procesamiento de las muestras fue desarrollado a diferentes temperaturas, humedades y proporciones de almidón-caseína de acuerdo al diseño experimental de la tabla 4. Finalmente las muestras fueron secadas en una estufa con circulación de aire a 55°C hasta alcanzar una humedad de 8+/- 0.5% y así proceder a almacenamiento en bolsas de polietileno para posteriormente someter los extrudidos a los diferentes análisis de estudio y caracterización.

4.2,3.3 Molienda de muestras extrudidas

Las muestras de extrudidos fueron subdivididas en dos fracciones la primera fue utilizada para los análisis de expansión, densidad volumétrica y fuerza de compresión. en cuanto la segunda fracción fue sometida a quebrado y reducción de tamaño a través de un molino de martillos marca Raymond con alimentador manual y una capacidad de 1 Kg/h. Accionado por un motor de 2 HP USA y con un juego de mallas intercambiables hasta constituirse en polvo de tamaño de partícula similar al de una harina de 150 µm.

4.3 Métodos de análisis de productos extrudidos.

4.3.1 Índice de Expansión

El índice de expansión (EXP) de los productos extrudidos fue determinado de acuerdo al método descrito por *Jin et al (1994)*. Esto fue obtenido dividiendo el promedio del diámetro de 10 muestras de cada extrudido entre el diámetro de la matriz del extrusor.

$$\text{Exp} = D_m / D_{me}$$

4.3.2 Fuerza de compresión

La fuerza de compresión (CF) requerida en para fragmentar los extrudidos fue determinada usando un analizador de textura TA-XT2i. New .York. U.S.A." Cinco extrudidos tomados al azar de cada muestra con una longitud de 2.5 cm fueron colocados transversalmente en relación al pistón de la celda de compresión de Ottawa obteniendo el promedio del esfuerzo específico de energía en Newtons-fuerza necesario para quebrar la estructura del extrudido. Esta fuerza fue dividida entre el área de la sección cruzada reportándose finalmente como la fuerza en Newtons / m² necesario para quebrar los extrudidos

4.3.3 Densidad volumétrica

La densidad volumétrica (BD) fue determinada por el método propuesto por *Hsieh et al 1990*. de deslocación de semilla de mijo. El porcentaje de tres medidas de cada extrudido fue expresada en gramos por litro.

4.3 4 Métodos de análisis extrudidos en polvo

4.3.4.1 Índices de absorción y solubilidad en agua

Los índices de absorción (IAA) y solubilidad (ISA).en agua fueron determinados de acuerdo al método descrito por *Anderson et al (1982)*. Las muestras fueron centrifugadas a 3000 x g durante 10 minutos usando una centrifuga "International Centrifuge size 2 model k de International Equipment Co. USA"

4.3.4.2 Determinación de color

Los parámetros L, a y b de cada muestra fueron determinados en un colorímetro Mini Scan™ X^E modelo N° 45/ D – L (Hunter CE 96 Associates Laboratory., Reston, VA) siguiendo el método descrito por *Jin et al (1994)* tomando como base los valores de L= 98.735, a = 0.225 y b = 2.945 correspondientes a una muestra de almidón-caseína sin procesar. La diferencia de color ΔE. para cada muestra fue calculada usando la ecuación

$$\text{COLOR} = \Delta E. = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2}$$

4.3.4.3 Viscosidad

Un "Rapid Visco-Analyzer" modelo 4C (Newport Scientific PTY Ltd, Sydney, Australia), fue usado para obtener los parámetros de viscosidad de las muestras extrudidas directamente del trazo del viscoamilograma. La preparación de las muestras fue fijada a un peso total de 28 gr. base 14% de humedad equivalentes a 25 mL de agua y 3 gr. de muestra (2.58 gr de materia seca) Para llevar a cabo el análisis de las muestras fue ajustado el pH de la suspensión a un valor de 7.0 con NaOH y mantenida durante 8 segundos a rotación del porta muestras para estabilizar la temperatura y procurar una suspensión uniforme. La programación del equipo en la etapa de calentamiento (50 a 90°C) fue de 4.5 minutos. La etapa de reposo a la temperatura de 90°C fue de 6 minutos y finalmente la etapa de enfriamiento hasta 50°C fue de 4.5 minutos siendo el tiempo total del análisis de 15 minutos a 160 rpm. La viscosidad inicial (VI) fue tomada del inicio del trazo del viscoamilograma (tiempo = 0). La viscosidad (V90) fue tomada cuando la temperatura de la muestra alcanzó la temperatura de 90 °C (tiempo = 4.5 minutos) y la viscosidad (V50) es el valor de la viscosidad cuando la muestra alcanzó los 50°C en un tiempo total de 15 minutos.

4.3.4.4 Reología de pastas y geles de muestras extrudidas

Para la determinación del comportamiento reológico (viscoelástico) de las muestras de extrudidos fueron previamente preparadas pastas y/o geles de las muestras extrudidas, Fue adicionado 1 gramo de muestra base del 10% de humedad a 5 ml de agua destilada y dejar en reposo la pasta o gel formadó por espacio de 24 horas a una temperatura constante de 4°C

El comportamiento reológico (visco-elástico dinámico) de las pastas o geles producidos con las muestras extrudidas de almidón-caseína fue medido por medio del reómetro ARES-RFS III, TA Instruments, USA Empleando el sistema de platos paralelos y una distancia de 1 mm entre plato y plato. La frecuencia desarrollada fue desde 10^{-1} .a 10^2 ..rad / s a una temperatura constante de 25°C.

El análisis del comportamiento reológico fue desarrollado en dos etapas; la primera etapa fue desarrollada para encontrar la zona de comportamiento lineal de los módulos de almacenamiento G' y perdida G'' con respecto a la variación de frecuencias; y la segunda etapa fue desarrollada para conocer el comportamiento viscoelástico a través de los parámetros que fueron determinados como son G' modulo de almacenamiento G'' modulo de pérdida. η viscosidad dinámica; δ ángulo de fase y frecuencia en rad / s

En la caracterización viscoelástica de geles de almidón es frecuente el uso de cizalla oscilatoria de baja amplitud. El comportamiento de los módulos dinámicos G' , G'' y G^* así como el ángulo de pérdida ($\tan \delta$) han proporcionado información del carácter visco-elástico de estos sistemas.

4.3.4.5 Difracción de rayos X

Se utilizaron muestras en polvo de los materiales almidón-caseína extrudidos. Los difractogramas de rayos X se obtuvieron usando un equipo Siemens D5000 con una línea de radiación de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) con una diferencia de potencial de 30 kV y una densidad de corriente de 20 mA Las muestras se registraron entre 5 y 40 grados (2θ) con un paso angular de 0.05° y un tiempo de conteo, por paso

angular, de 15 segundos. El material fue colocado en un porta muestras de aluminio de área 900 mm² (dimensiones 30x30 mm).

Se realizaron medidas de difracción de rayos X con el fin de evaluar los cambios en la estructura cristalina y el grado de cristalinidad de las muestras extrudidas.

El grado de cristalinidad puede ser determinado separando las dispersiones de las regiones cristalinas y amorfas en la difracción de rayos X. El grado de cristalinidad (X_c) puede ser calculado de:

$$X_c = \frac{\int_0^{\infty} s^2 I_c(s) ds}{\int_0^{\infty} s^2 I(s) ds}$$

Donde:

I es la intensidad de dispersión de una muestra desconocida

I_a es la intensidad de dispersión muestra de referencia amorfa

I_c es la intensidad de dispersión muestra de referencia cristalina

K es una constante la cual puede ser calculada de la inclinación de la curva obtenida por el trazo de la grafica de $I - I_a$ contra $I_c - I_a$

4.3.4.6 Espectroscopia infrarrojo

Fue seguida la metodología descrita por Zeleska et al (2001). Las muestras fueron examinadas en capsulas fabricadas de KBr conteniendo 3 mg. de cada muestra extrudida con 300 mg de KBr. Los espectros fueron obtenidos con un Perkin Elmer Spectrum One FT-IR Spectrometer. Los espectros fueron realizados en el rango de 400 a 4000 cm⁻¹

4.3.4.7 Calorimetría diferencial de barrido

Para las mediciones en el DSC, se utilizaron las muestras extrudidas molidas a una granulometría menor a 100 mesh, estas muestras fueron acondicionadas a dos diferentes humedades: a) Muestras que fueron mantenidas en un desecador a humedad relativa controlada de 40% con sales de K₂CO₃, de forma que las muestras durante una semana alcanzaran el equilibrio con una actividad de agua de $A_w = 0.44$. b) Las muestras fueron mezcladas con agua en una relación en peso de 2 de agua para uno de muestra (2:1 p/p). Las muestras así acondicionadas fueron evaluadas en propiedades térmicas en un DSC Perkin-Elmer Pyris 1 para ello fueron colocadas en cápsulas de aluminio selladas herméticamente, las cápsulas fueron para muestras volátiles N° 0219-0062 que soportan una presión de 2 atm. La medición fue realizada a una razón de calentamiento de 5°C/min. y los termogramas se corrieron en un rango de 40 a 190°C. Obteniendo de los termogramas el valor de la transición vítrea (T_g) y temperatura de fusión (T_m).

4.3.4.8 Azúcares totales reductores y no reductores

Determinación de azúcares totales

Se usaron los métodos oficiales n° 80-60 y 70-75 de AACC edición 1982 y Método oficial 14.023 de AOAC 1984)..

4.3.4.9 Microscopia confocal

La preparación de la muestras para la observación microscópica de extrudidos consistió pesar 1 gramo de cada muestra seleccionada y adicionar 10 mL de agua destilada mas 2 gotas de colorante dejar en reposo por 24 horas refrigeración cubriendo el recipiente con aluminio laminado (hoja de aluminio). Posterior al reposo, se tomó una gota de la muestra preparada y se colocó en un porta objetos por ultimo se sometió a la observación bajo el microscopio confocal analizando con luz polarizada y cromaticidad para cada muestra

Las muestras seleccionadas para observación al microscopio confocal así como el listado de los colorantes que se adicionaron a las muestras están registrados en la tabla 12 del anexo 1

La determinación microscópica de muestras de caseína, almidón, y caseína-almidón extrudidas fueron llevadas a cabo utilizando un “Confocal láser microscopy” modelo MRC 1024 (Bio Rad) equipado con un Láser de Criptón – Argón y acoplado a un microscopio invertido Diaphot 200 Nikon.

V RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Análisis de humedad de las materias primas y de extrudidos

El Análisis del contenido humedad de las materias primas; almidón de trigo y caseína ácida fueron de 9.8% y 10.1% de humedad en base húmeda respectivamente. La humedad promedio de los extrudidos fue de 11.375% de y la actividad de agua (a_w) fue en promedio de 0.378 (tabla 11 en anexo).

5.2 Análisis del pH de las materia primas y de productos extrudidos

El análisis del pH de las materias primas en suspensión nos reveló que el almidón de trigo presentó, en promedio, un pH de 7.95 y la suspensión de caseína presentó en promedio un pH de 4.85. Sin embargo el análisis del pH de la mezcla de estos dos biopolímeros en suspensión reveló en promedio un pH de 5.05.

5.3 Expansión (EXP)

Los resultados experimentales de la expansión de la interacción almidón-caseína extrudidos fueron procesados estadísticamente obteniéndose un $R^2 = 0.725$ y una probabilidad de F de $p < 0.006$, para el siguiente modelo matemático ajustado.

$$\text{EXP} = 6.588863251 - 0.076519004 T + 0.185383675 H - 0.004702355 C + 0.0003368856 T^2 - 0.000272781 H^2 + 0.000048996 C^2 - 0.001496250 T \cdot H - 0.000101495 T \cdot C + 0.000688084 H \cdot C$$

A través de este modelo se obtuvieron las gráficas de superficies de respuesta mostradas en las figuras.5.1a, 5.1b y 5.1c.

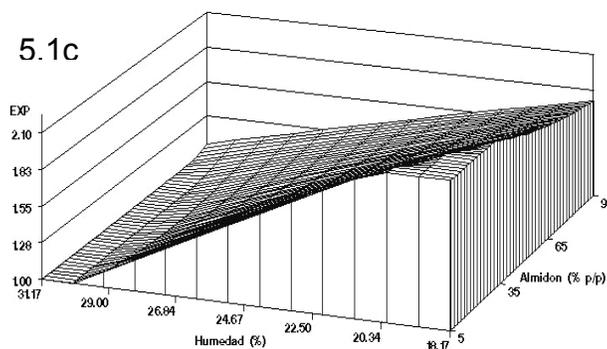
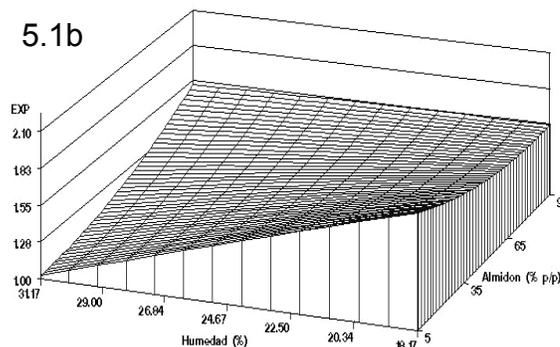
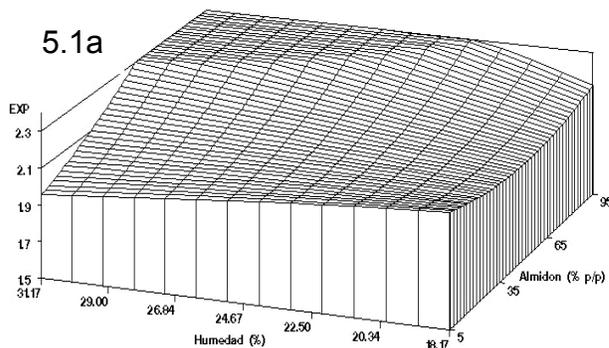


Figura.5.1 Gráficas de superficies de respuesta de la expansión de los biopolímeros extrudidos a las temperaturas de procesamiento de 126°C (5.1a), 160°C (5.1b) y 194°C (5.1c)

Las superficies de respuesta de la expansión de los biopolímeros extrudidos muestran que la máxima expansión de los extrudidos (2.3) se logró cuando estuvo presente el mayor porcentaje de almidón (95%) en la mezcla y humedades superiores al 25% esto a la temperatura mas baja de procesamiento de 126°C.

Horn (1977a) encontró en sus estudios que la máxima expansión para muestras procesadas por extrusión se obtuvo con muestras de almidón al 100% decreciendo los valores de expansión al incorporarse otros componentes como proteínas o lípidos.

De forma contraria a los valores de máxima expansión encontrados para las muestras procesadas a la menor temperatura de 126°C. Se encontró que al incrementarse la temperatura de procesamiento de 126 a 194° C con altos contenidos de humedad se observa que disminuye la expansión de los extrudidos llegando incluso a su punto mínimo de expansión de 1.0. Siendo esto atribuido a que al incrementar la temperatura de procesamiento se provoca una fragmentación del almidón por el efecto de la combinación de alta temperatura y alto contenido de humedad lo que ocasiona una fragilidad estructural del granulo de almidón con la consecuente disminución de expansión de los extrudidos (Seiler et al 1980a, 1980b). El efecto de disminución en la expansión por el incremento tanto en la humedad como en la temperatura es atribuido al colapso del granulo de almidón por la alta presión generada en el interior del extrusor (Marshall y Chrastil 1992).

Otros autores Faubion y Hosenev (1982) también observaron este comportamiento de valores mínimos de expansión en muestras de almidón procesadas a altas temperaturas, atribuido a la fragilidad estructural del gránulo de almidón y perder su integridad, debido a la gran cantidad de vapor generado durante la extrusión en estas condiciones de procesamiento.

De esta manera tanto la temperatura de extrusión como el contenido de humedad durante el proceso de extrusión son parámetros muy importantes en la expansión de los extrudidos (Gujska y Khan 1991). Así mismo bajo estas condiciones de alta temperatura de procesamiento (194°C) aunque con bajos contenidos de humedad de alrededor de 18% es notable observar que la mezcla de almidón-caseína mantiene altos niveles de expansión en prácticamente todas las proporciones de la mezcla, sobresaliendo los niveles de alta proporción de caseína del 80 al 95% en la mezcla. Por lo que probablemente el vapor generado por la alta temperatura de procesamiento es retenido por la red de fuerte estructura, que se forma del complejo almidón-caseína produciendo extrudidos de alta expansión.

5.4 Índice de Solubilidad en agua (ISA)

Los resultados experimentales de los índices de solubilidad en agua de los extrudidos almidón-caseína fueron procesados estadísticamente obteniéndose un valor de $R^2 = 0.649$, una probabilidad de F de $p < 0.026$ F para el siguiente modelo matemático.

$$\text{ISA} = -163.1308432 + 1.2442195 \text{ T} + 6.1856285 \text{ H} + 0.0699876 \text{ C} - 0.0033938 \text{ T}^2 - 0.0954039 \text{ H}^2 - 0.0021778 \text{ C}^2 - 0.0082760 \text{ T} \cdot \text{H} + 0.0018736 \text{ T} \cdot \text{C} - 0.0025998 \text{ H} \cdot \text{C}$$

A través de este modelo se obtuvieron las gráficas de superficies de respuesta mostradas en las figuras.5.2a, 5.2b, 5.2c.

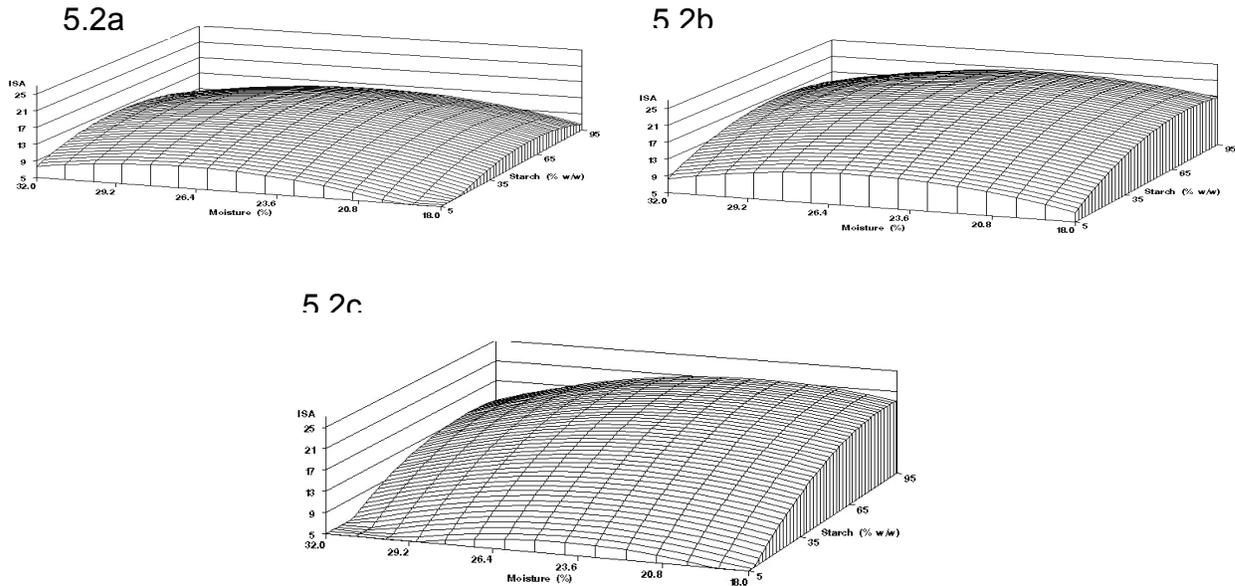


Figura 5.2 Gráficas de superficies de respuesta de los índices de solubilidad en agua de los biopolímeros extrudidos a las temperaturas de procesamiento de 126°C.(5.2a), 160°C (5.2b) y 194°C.(5.2c)

El análisis de las superficies de respuesta de los índices de solubilidad en agua obtenidas a través de su modelo matemático revela que al incrementar la temperatura de procesamiento de las mezclas almidón-caseína de 126 a 194° C el ISA se va incrementando, localizándose los máximos valores de ISA en la zona del mas alto porcentaje de almidón del 65 a 95% con contenidos de humedad de que van de 19 al 25%. Este incremento de ISA es atribuido tanto al efecto de fragmentación del almidón provocado por la cizalla del extrusor, como por la alta temperatura de procesamiento y niveles de 20 a 25% de contenido de humedad (Gujaska y Khan 1991). De forma contraria los valores mínimos de ISA encontrados en las superficies de respuesta se localizan en la zona de alto contenido de humedad, en conjunción con la mayor proporción de proteína en la mezcla tanto a bajas como a altas temperaturas de procesamiento atribuyéndose este hecho a la pérdida de la solubilidad por desnaturalización de la proteína.

Kim y Rottier (1980) observaron que al incrementarse la temperatura de procesamiento aumentó la cantidad de almidón fragmentado lo que provocó un mayor porcentaje de almidón soluble. Al mismo tiempo el incremento de la temperatura provoca un efecto negativo en la solubilidad por la desnaturalización de la proteína, teniendo como consecuencia de ello una caída en los valores de

ISA por la presencia de la proteína. Siendo mayor esta pérdida de solubilidad conforme se aumenta la proporción de proteína en la mezcla

Los cambios de solubilidad de mezclas de almidón - proteína por extrusión. fueron reportados por Kim y Rottier (1980) Estos autores estudiaron el efecto de la temperatura de procesamiento por extrusión en la cantidad de almidón dañado y sus cambios en la solubilidad en agua reportando que al incrementar la temperatura se incrementa la cantidad de almidón hidrolizado y por lo tanto se incrementa la solubilidad en agua. Al mismo tiempo que la proteína se desnatura por la alta temperatura decreciendo su solubilidad en agua. El efecto de la temperatura en las proteínas procesadas por extrusión también fue estudiado por Cheftel et al (1986) así como por Goel y Rekha (1999), observando estos autores algunos cambios estructurales debido a la presencia de grupos hidrofílicos como $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$ y $-SH$ de las proteínas, la modificación de grupos amino de las cadenas laterales y la formación de nuevos enlaces covalentes isopeptídicos dan como resultado una proteína más resistente al calor en bajas concentraciones de agua y las posibles interacciones por uniones cruzadas de almidón con la proteína, provocando disminución en la solubilidad de las macromoléculas de almidón-caseína.

5.5 Índice de absorción en agua (IAA)

Del procesamiento estadístico de los resultados experimentales de los índices de absorción en agua fueron encontrados un valor de $R^2 = 0.793964$, con una probabilidad de F de $p < 0.0009$, para el siguiente modelo matemático.

$$IAA = 12.78244292 + 0.02142855 T - 0.75750072 H - 0.09323512 C - 0.00011227 T^*T + 0.01143881 H^*H + 0.00050951 C^*C + 0.00062766 T^*H + 0.00023357 T^*C + 0.00154427 H^*C$$

A través de este modelo se construyeron las siguientes gráficas de superficies de respuesta de la Fig. 5.3a, 5.3b y 5.3c

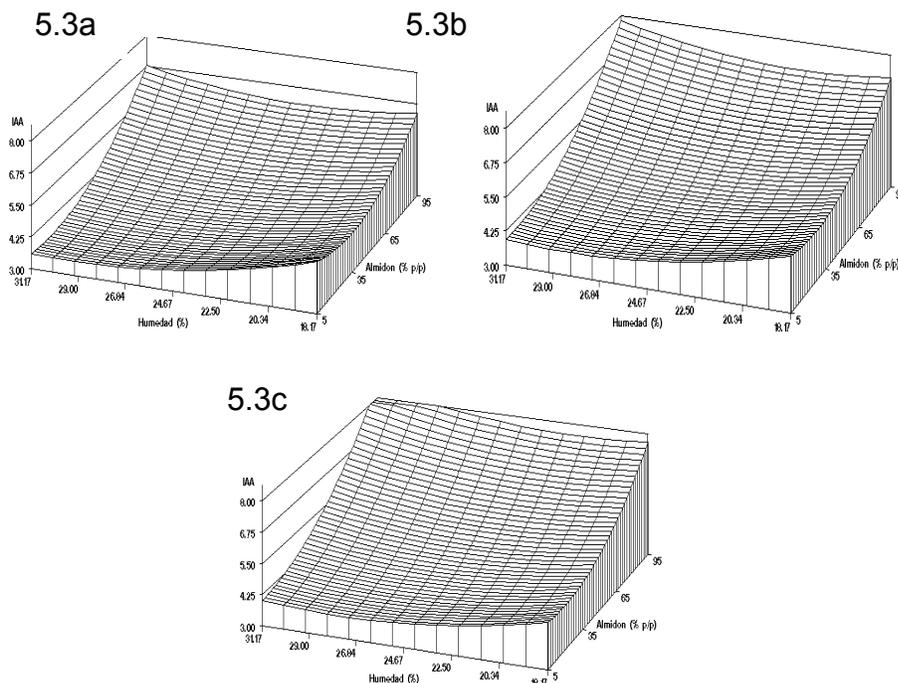


Figura 5.3 Gráficas de superficies de respuesta de los índices de absorción en agua (**IAA**) de los biopolímeros extrudidos a las temperaturas de procesamiento de 126°C.(5.3a), 160°C (5.3b) y 194°C.(5.3c)

El análisis de las superficies de respuesta reveló que los máximos valores del los índices de absorción en agua (IAA) están alrededor de 8.0 a las condiciones de procesamiento de alta temperatura de 194°C y con la mayor proporción de almidón en la mezcla en el rango de 90 a 95% y alto contenido de humedad, que variaron del 27 al 32%.

De igual forma en relación a la región de los valores de menor índice de absorción en agua de 3.6 a 4.2 esta zona está localizada entre contenidos de humedad entre 26 y 29% y el mayor porcentaje de proteína en la mezcla del 90 al 95%. Sin embargo a esta misma proporción de proteína del 90 al 95% también se obtuvieron valores altos de IAA al decrecer considerablemente el contenido de humedad a niveles del orden del 18%.

Este comportamiento del índice de absorción en agua de los extrudidos de almidón-caseína es significativamente afectado por el contenido de humedad de procesamiento ya que cuando la mezcla almidón-caseína es procesada con alta proporción de almidón y con altos contenidos de humedad esta acción provoca una menor fragmentación del almidón y sobre todo se minimiza la desnaturalización de la proteína lo cual consecuentemente incrementa el índice de absorción en agua de los extrudidos.

La alta concentración de proteína en la mezcla (90 al 95%) da como resultado pequeños valores de IAA atribuidos a la desnaturalización de la caseína causada por las variables del proceso de extrusión (Gujaska y Khan 1991). La capacidad de hidratación de la proteína fue menor debido a la formación de enlaces inter e intramoleculares de la caseína con la amilosa y amilopectina del almidón (Goel y Rekha 1999). El efecto es atenuado por la alta concentración de almidón (95%) donde los valores de IAA medianamente dependen de los cambios que el almidón pueda sufrir durante la extrusión.

Con el incremento en la temperatura de 126 a 194°C y la proporción de almidón de 5 a 95% los valores de IAA se incrementan esto posiblemente se deba a la cantidad de almidón fragmentado debido al efecto de cizalla y al bajo contenido de humedad (Gujaska y Khan 1991). También debido a la pérdida de solubilidad de la proteína por la desnaturalización pueden ocurrir cambios estructurales los cuales corresponden a la presencia de grupos hidrofílicos como -OH, -NH₂, -COOH y -SH para formar enlaces cruzados con el almidón (Goel y Rekha 1999). En bajos niveles de almidón y consecuentemente alta proporción de proteína en la mezcla es donde se producen los más bajos valores de IAA debido a la pérdida de solubilidad de la proteína por desnaturalización siempre que el procesamiento este sujeto a altas temperaturas de extrusión.

En bajas temperaturas de procesamiento de 126°C y con alto contenido de humedad (mayor a 26%) el decrecimiento de IAA es debido a la reducida cantidad

de almidón fragmentado (Gujska y Khan 1991). Los altos valores de IAA a 126°C fueron establecidos para muestras con contenidos de humedad mayores que 26% y proporciones de almidón mayores que 65%, estos valores de IAA son debidos a la interacción del almidón con la proteína lo que evitaría la desnaturalización de la proteína y por consecuencia se produce mayor capacidad de absorción de agua. Similares resultados se obtuvieron para la temperatura de procesamiento de 160°C.

5.6 Diferencial de color

El diferencial del color (ΔE) fue determinado para los productos extrudidos en relación a una muestra estándar de mezcla de biopolímeros sin procesar fue encontrada una correlación en los datos con $R^2 = 0.877$ y F de $p < 0.0001$. Resultando del análisis estadístico el siguiente modelo matemático.

$$\text{COLOR } (\Delta E) = 85.34424024 + 0.33579240 T - 6.46583645 H - 0.26178036 C - 0.00163665 T * T + 0.10111304 H * H + 0.00314043 C * C + 0.00943723 T * H + 0.00065888 T * C - 0.00667223 H * C$$

A través de este modelo se obtuvieron las gráficas de superficies de respuesta mostradas en la Figuras 5.4a, 5.4b y 5.4c

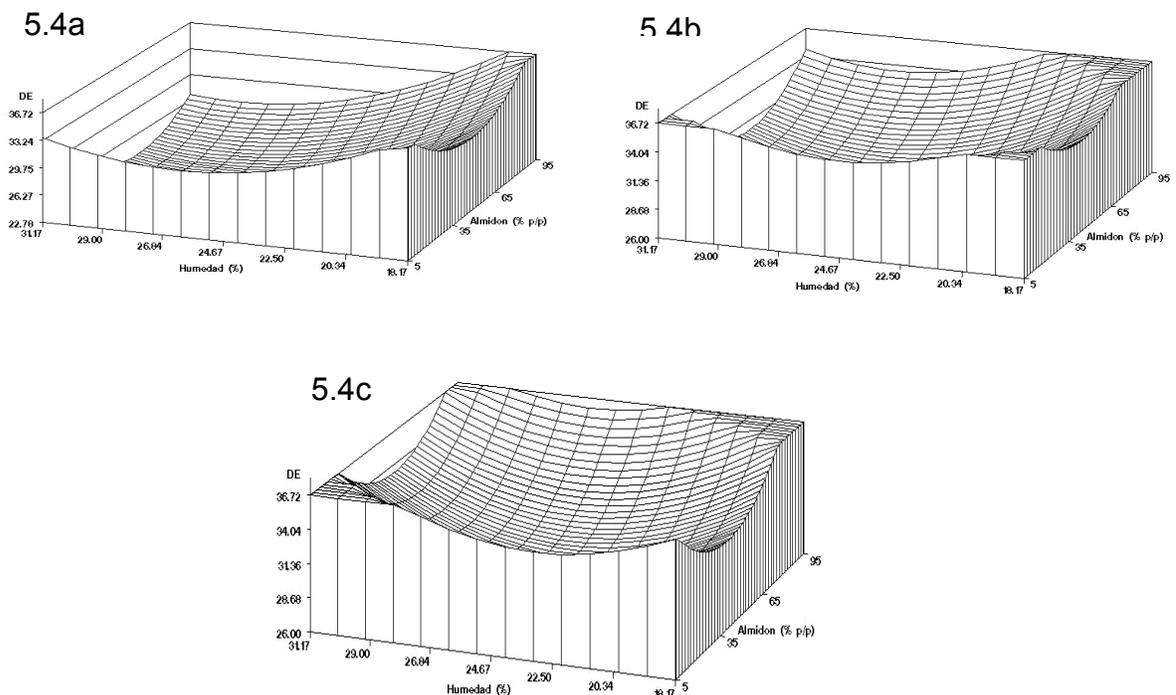


Figura 5.4. Gráficas de superficie de respuesta del diferencial de color (ΔE) de los biopolímeros extrudidos a las temperaturas de procesamiento de 126°C (5.4a), 160°C (5.4b) y 194°C (5.4c)

Los datos nos revelan que el diferencial de color es ampliamente dependiente tanto de la temperatura de procesamiento de extrusión así como de la proporción de caseína en la mezcla de los biopolímeros y presentó un efecto negativo tanto por la humedad como por la proporción de almidón en la mezcla, esto se puede observar con detalle en la representación de su comportamiento en las superficies de respuesta. En esta gráfica se observa que al incrementar la temperatura de 126 a 194° C el diferencial de color) aumenta logrando sus máximos valores en las cuatro esquinas de las superficies, dos de ellas se establecidas a bajos contenidos de humedad (18 - 19%) y las otras dos regiones de valores máximos de diferencial de color son observados a altos contenidos de humedad (30 - 32%). Esto implica que los valores de (ΔE) son mínimos en contenidos intermedios de almidón y humedad. Estos cambios en la intensidad de color posiblemente son causados por reacción de Maillard entre los azúcares reductores (almidón dextrinizado) y grupos amino libres de la caseína e interacciones entre ambas macromoléculas. Sin embargo una alta proporción de caseína en la mezcla con altos o bajos niveles de contenido de humedad intensificaron el cambio en color cuando la temperatura fue incrementada a 194°C. Los mínimos valores de diferencial de color fueron observados en las siguientes condiciones de procesamiento cuando la temperatura fue incrementada de 126 a 194°C y la humedad fue cercana al 25% con una proporción de almidón alrededor del 45% en la mezcla de los biopolímeros caseína y almidón.

5.7 Fuerza de compresión (FC)

Los modelos matemáticos se ajustan a los datos experimentales de FC una vez que presenta un $R^2 = 0.64679$ con una probabilidad de F de $p < 0.0130$

$$FC = -489.64014 + 5.62809 * T + 3.23302 * H + 0.44101 * C - 0.04421 * T^2 - 1.08471 * H^2 - 0.02614 * C^2 + 0.34526 * T * H + 0.01876 * T * C$$

A través de este modelo se obtuvieron las gráficas de superficies de respuesta Fig.5.5a, 5.5b y 5.5c

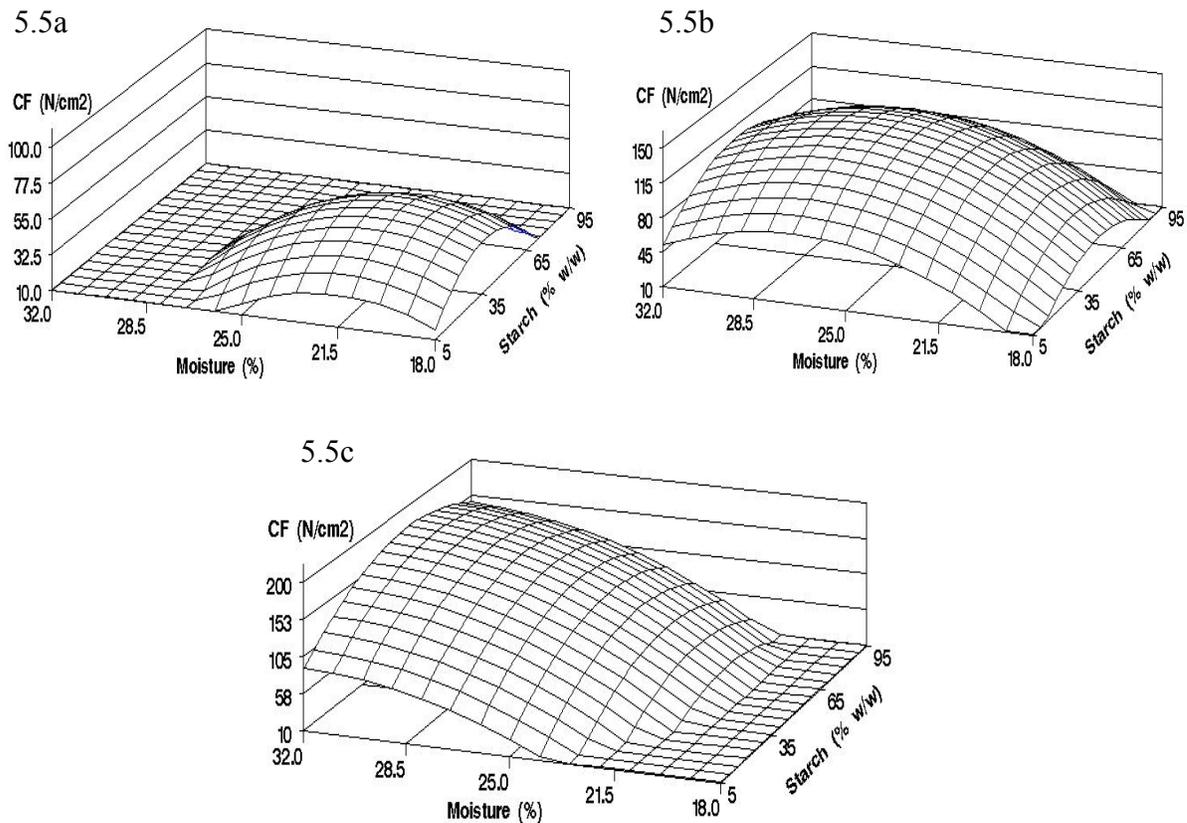


Figura. 5.5 Gráficas de superficie de respuesta de la fuerza de compresión (**FCOM**) de los biopolímeros extrudidos a las temperaturas de procesamiento de 126°C (5.5a), 160°C (5.5b) y 194°C (5.5c).

Fuerza de compresión es la fuerza requerida para quebrar los extrudidos es altamente dependiente del contenido de humedad. A una temperatura de 160°C (figura 6b) se establecieron los valores máximos a condiciones de humedad de entre 25 a 28% y una proporción de almidón de 50% en la mezcla. Contenidos altos de humedad mayores a 29% y contenidos bajos, menores que 25% de humedad así como proporciones de almidón mayores o menores al 50% resultaron en una reducida fuerza de compresión. A temperatura de 194°C el máximo valor de FC correspondió a altos contenidos de humedad, mayores que 28%, a la misma proporción de almidón del 50%. Sin embargo a bajas temperaturas de proceso de 126°C los valores máximos de FC ocurrieron con contenidos intermedios de humedad del orden del 25% y en proporciones de almidón en la mezcla mayores que 75%. La FC es inversamente proporcional a la expansión principalmente porque la densidad volumétrica es baja en alta expansión. En proporciones de almidón entre 35 al 65% y contenidos de humedad de alrededor del 28.5% los biopolímeros extrudidos adquieren una densa y rígida estructura la cual requiere mayor energía para realizar el quebrado. Esto es probablemente debido a las interacciones entre almidón y caseína, dando lugar a la modificación estructural acontecida en ambos biopolímeros durante el proceso

de extrusión. Dependiendo de la temperatura y contenido de humedad la modificación estructural posiblemente puede promover la formación de puentes de Hidrógeno y fuerzas de atracción de van der Waals e interacciones hidrofobicas y/o hidrofílicas.

5.8 Viscosidad

En las figuras 5.6.1, 5.6.2, 5.6.3, 5.6.4 y 5.6.5 se muestran algunos viscoamilogramas representativos del conjunto de muestras obtenidas en el viscosímetro "RVA".

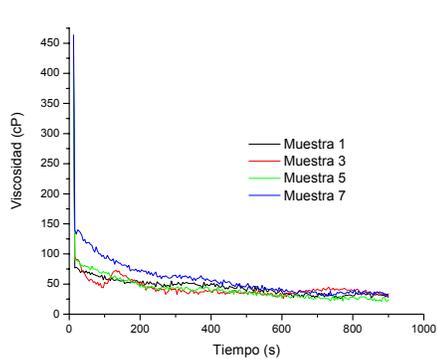


Figura 5.6.1 Viscoamilogramas muestras 1, 3, 5 y 7

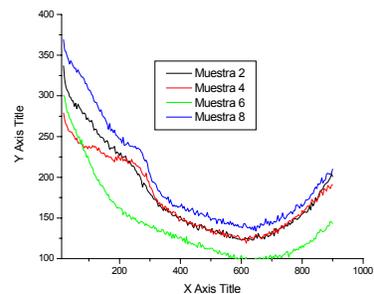


Figura 5.6.2 Viscoamilogramas muestras 2, 4, 6 y 8

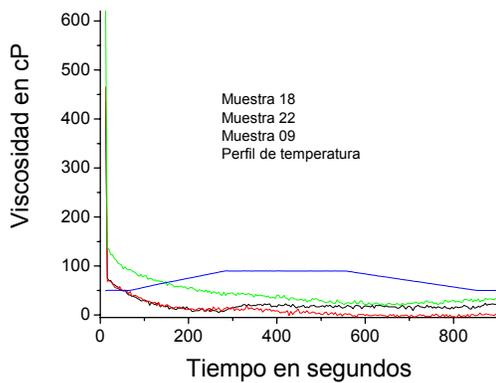


Figura 5.6.3 Viscoamilogramas muestras 9, 18 y 22

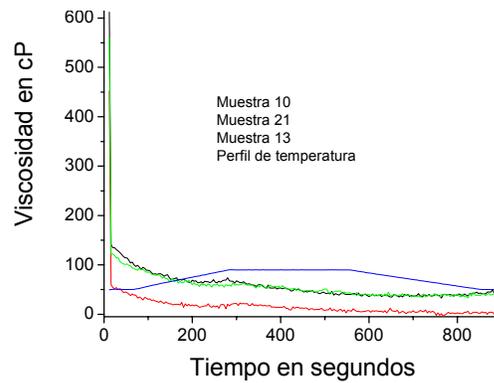


Figura 5.6.4 Viscoamilogramas muestras 10, 13 y 21

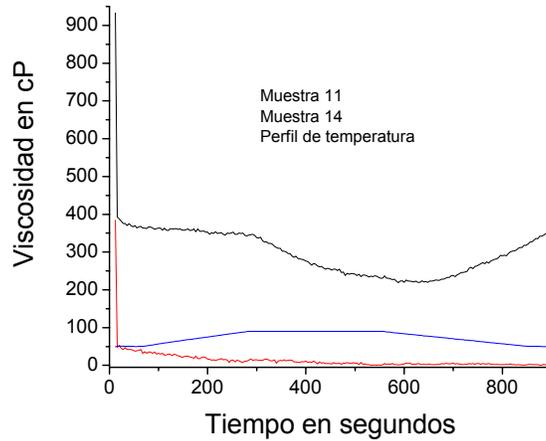


Figura 5.6.5 Viscoamilogramas muestras 11 y 14

Los modelos matemáticos para la viscosidad inicial (IV), viscosidad a 90°C (V90) y viscosidad final a 50°C (V50) obtenidas de los datos experimentales mostraron las siguientes correlaciones $R^2 = 0.9469$, $R^2 = 0.9682$, $R^2 = 0.9693$ respectivamente y una probabilidad F de $p < 0.0001$ fue encontrada para todos los modelos.

A través de estos modelos se obtuvieron las gráficas de superficies de respuesta Figuras 5.6a, 5.6b y 5.6c para **IV**. Figuras 5.7a, 5.7b y 5.7c para **V90** y figuras 5.8a, 5.8b y 5.8c para **V50**

$$\mathbf{IV} = 3221.475087 - 19.783277 \mathbf{T} - 134.095096 \mathbf{H} - 4.450108 \mathbf{C} + 0.044890 \mathbf{T}^2 + 2.041410 \mathbf{H}^2 + 0.105948 \mathbf{C}^2 + 0.245313 \mathbf{T}^* \mathbf{H} - 0.000701 \mathbf{T}^* \mathbf{C} - 0.068925 \mathbf{H}^* \mathbf{C}$$

$$\mathbf{V90} = 1836.411427 - 9.353786 \mathbf{T} - 83.556057 \mathbf{H} - 5.746472 \mathbf{C} + 0.020830 \mathbf{T}^2 + 1.212765 \mathbf{H}^2 + 0.083738 \mathbf{C}^2 + 0.132813 \mathbf{T}^* \mathbf{H} - 0.010981 \mathbf{T}^* \mathbf{C} + 0.087617 \mathbf{H}^* \mathbf{C}$$

$$\mathbf{V50} = 2064.978070 - 14.128240 \mathbf{T} - 72.221139 \mathbf{H} - 5.161454 \mathbf{C} + 0.034258 \mathbf{T}^2 + 1.001242 \mathbf{H}^2 + 0.085563 \mathbf{C}^2 + 0.139063 \mathbf{T}^* \mathbf{H} - 0.008178 \mathbf{T}^* \mathbf{C} + 0.045561 \mathbf{H}^* \mathbf{C}$$

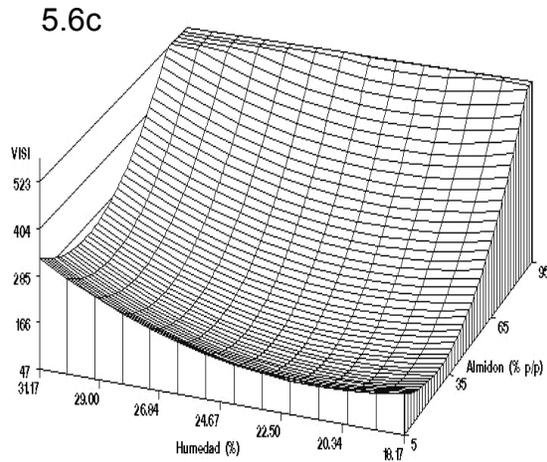
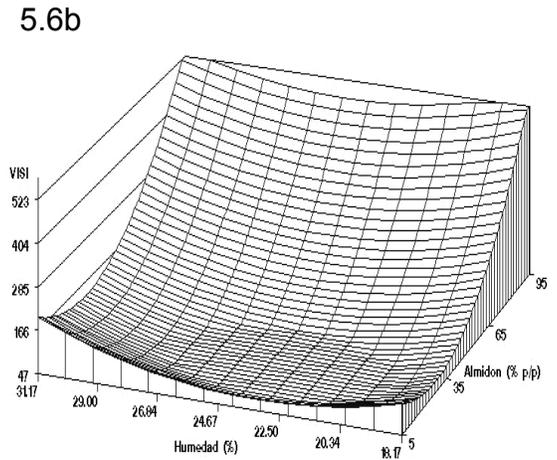
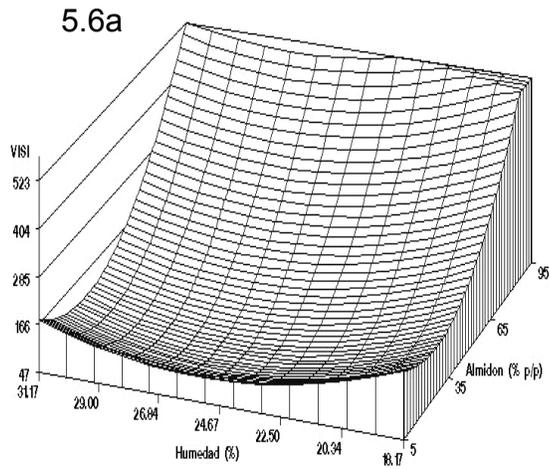
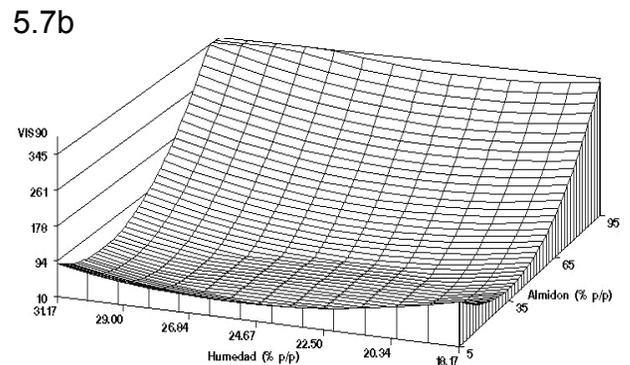
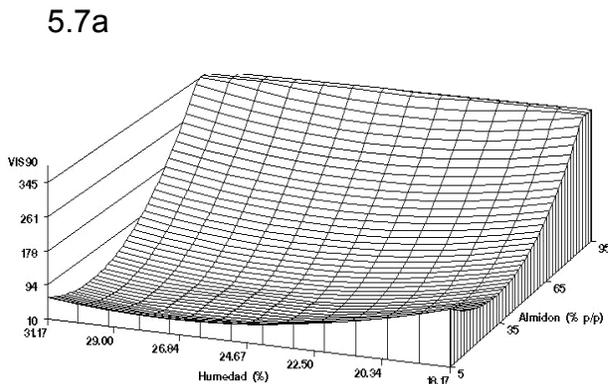


Figura 5.6 Graficas de superficie de respuesta de la viscosidad inicial (**IV**) de los biopolímeros extrudidos a las temperaturas de procesamiento de 126°C (5.6a), 160°C (5.6b) y 194°C (5.6c)



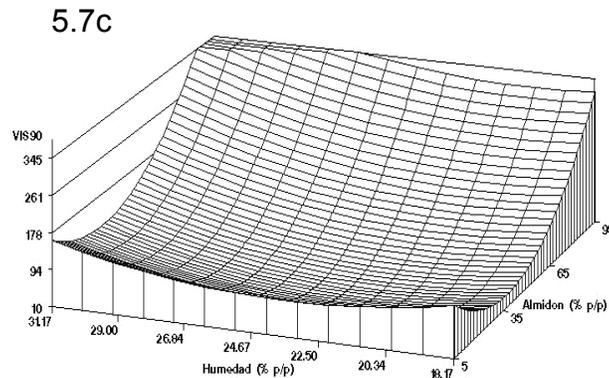


Figura 5.7 Gráficas de superficie de respuesta de la viscosidad a 90°C (**VIS90**) de los biopolímeros extrudidos a las temperaturas de procesamiento de 126°C (5.7a), 160°C (5.7b) y 194°C (5.7c)

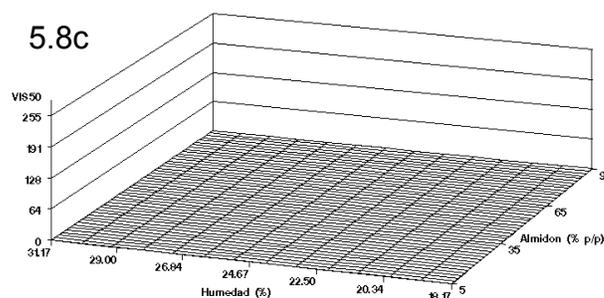
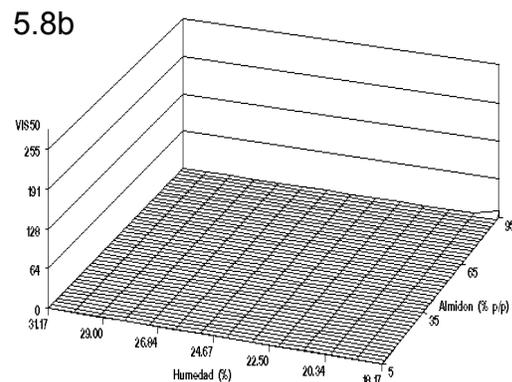
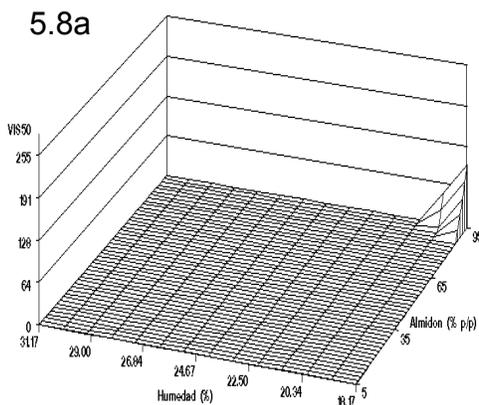


Figura. 5.8 Gráficas de superficie de respuesta de la viscosidad a 50°C (**VIS50**) de los biopolímeros extrudidos a las temperaturas de procesamiento de 126°C (5.8a), 160°C (5.8b) y 194°C (5.8c)

Las figuras.5.6a, 5.6b y 5.6c muestran que la viscosidad inicial **IV** es altamente dependiente de la proporción de almidón en la mezcla así como del grado de fragmentación que sufre el almidón y del grado de interacción con la proteína durante el procesamiento por extrusión. Cabe mencionar que los viscoamilogramas se realizaron ajustando el pH de las muestras a un valor de 7.0

esto debido a que la energía requerida para su homogenización y mezclado previa a su análisis sobrepasaba la capacidad del equipo

Los cambios estructurales sufridos principalmente en el almidón durante el proceso de extrusión son los causantes de la alta viscosidad inicial **IV**. El comportamiento de la viscosidad del almidón extrudido ha sido estudiado por Conway et al (1968), Anderson et al (1969a y 1969b), Doublier et al (1986) y Schweiser et al (1986) Estos autores reportaron la caracterización del almidón extrudido por análisis viscoamilografico encontrando que las diferencias que presenta este almidón extrudido con relación a un almidón nativo son básicamente la ausencia de pico de gelatinización, una alta viscosidad inicial de la pasta fría y una continua caída en la viscosidad entre los 50 a 95 °C. Así como en la etapa de enfriamiento (retrogradación) se ha observado un ligero o nulo incremento en la viscosidad logrando su máximo valor a 50°C.

La IV y V90 a 194°C de temperatura de extrusión fueron principalmente afectados por la relación de almidón-caseína, sin embargo esta relación no causa considerables diferencias en estas viscosidades, en el caso del uso de temperaturas de 126°C y 160°C. Cuando se incrementó la proporción de almidón en la mezcla (alrededor de 95%), fueron obtenidos mayores valores de viscosidad (IV y V90). Sin embargo, los valores menores de viscosidad no correspondieron solamente a la menor proporción de almidón en la mezcla (alrededor de 5%), sino también a la pérdida de solubilidad de la proteína por desnaturalización. Las IV y V90 decrecieron con altas proporciones de caseína en la mezcla, independiente de la temperatura de extrusión y el contenido de humedad (Madeka & Kokini, 1992). Los valores de V50 fueron menores que la IV y V90 para las diferentes concentraciones de almidón-caseína en la mezcla (Figura 5.8). La viscosidad inicial del almidón nativo es casi cero, aunque almidones pregelatinizados rápidamente absorben agua y forman una pasta a temperatura ambiente. La viscosidad inicial depende del nivel de gelatinización y la proporción de gránulos de almidón fragmentados (Chang et al, 1998). Finalmente, almidón con menor contenido de humedad, extrudido a alta temperatura, resulta en un extrudido con baja retrogradación debido principalmente a la alta degradación tanto del almidón como de la proteína por la alta temperatura de procesamiento. En este trabajo la retrogradación (V50) decreció cuando la temperatura del cañón fue incrementando (194°C), esto es debido probablemente al hecho que los complejos almidón-caseína forman un gel débil menos estable, los cuales no sufren retrogradación por lo que los valores de viscosidad son bajos. Los altos valores IV probablemente resultan de la gelatinización del almidón y la interacción entre la proteína y fragmentos del almidón, los cuales forman enlaces Inter e intramoleculares (Goel et al, 1999). El valor de la V90 fue menor que los obtenidos para la IV debido al alto daño del almidón durante la extrusión, disminuyendo su capacidad de retención de agua. Una máxima retrogradación ocurrió solo cuando se procesó una proporción de almidón de 90 – 95% en la mezcla, a 18% de contenido de humedad (Figura 5.8a). La uniformidad en bajos niveles de viscosidad presentados en las muestra es atribuible tanto al proceso de extrusión como a la presencia de caseína que le da estabilidad evitando la retrogradación del almidón.

5.9 Difracción de rayos X

Como resultado de exposición de la muestras a la difracción de Rayos X se obtuvo el porcentaje de cristalinidad registrados en la tabla 6 que presentaron las muestras extrudidas derivado de los difractogramas mostrados en las figuras 5.9.1, 5.9.2, 5.9.3, 5.9.4 y 5.9.5

Tabla 6 Porcentaje de cristalinidad de la muestras extrudidas

Muestra	%Cris								
01	0.26	06	2.13	11	1.78	16	1.49	21	1.66
02	5.05	07	0.61	12	0.97	17	1.44	22	1.88
03	0.29	08	1.77	13	2.65	18	1.52	23	1.74
04	2.26	09	1.87	14	0.41	19	2.77	24	1.98
05	0.59	10	2.27	15	2.33	20	0.13	25	1.78

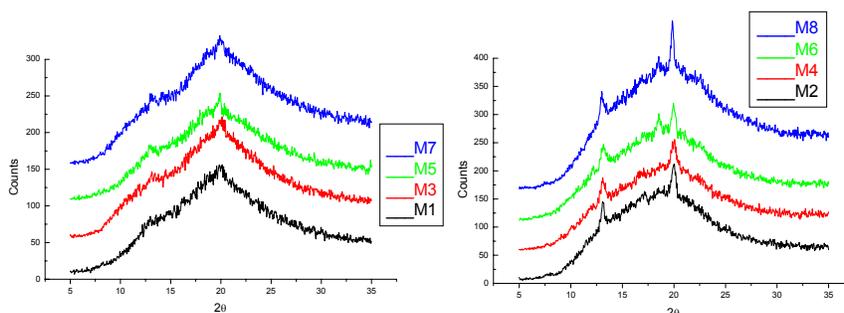


Figura 5.9.1 difractogramas de muestras 1, 3, 5 y 7

Figura 5.9.2 difractogramas de muestras 2, 4, 6 y 8

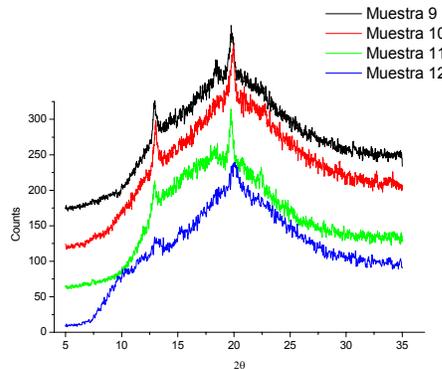
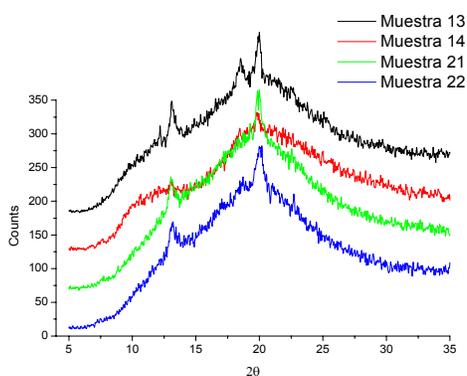


Figura 5.9.3 difractogramas de muestras 9,10, 11 y 12

Figura 5.9.4 difractogramas de muestras 13, 14, 15 y

El porcentaje de cristalinidad que presentaron las muestras extrudidas derivado de los difractogramas fue analizado estadísticamente observándose el efecto del proceso de extrusión en la modificación de la estructura cristalina de los biopolímeros. El análisis de varianza refleja el efecto de las variables de procesamiento por extrusión encontrando una correlación $R^2 = 0.76318$ y una probabilidad de F de $P < 0.0022$, para el siguiente modelo matemático.

$$\text{CRIS} = 7.489704 - 0.00728 * T - 1.018754 * H + 0.315279 * C - 0.000123 * T^2 + 0.010504 * H^2 - 0.000043 * C^2 + 0.003781 * TH - 0.000948 * TC - 0.0003738 * HC.$$

A través del modelo matemático se obtuvieron las gráficas de superficies de respuesta mostradas en la Figura 5.9a, 5.9b, 5.9c

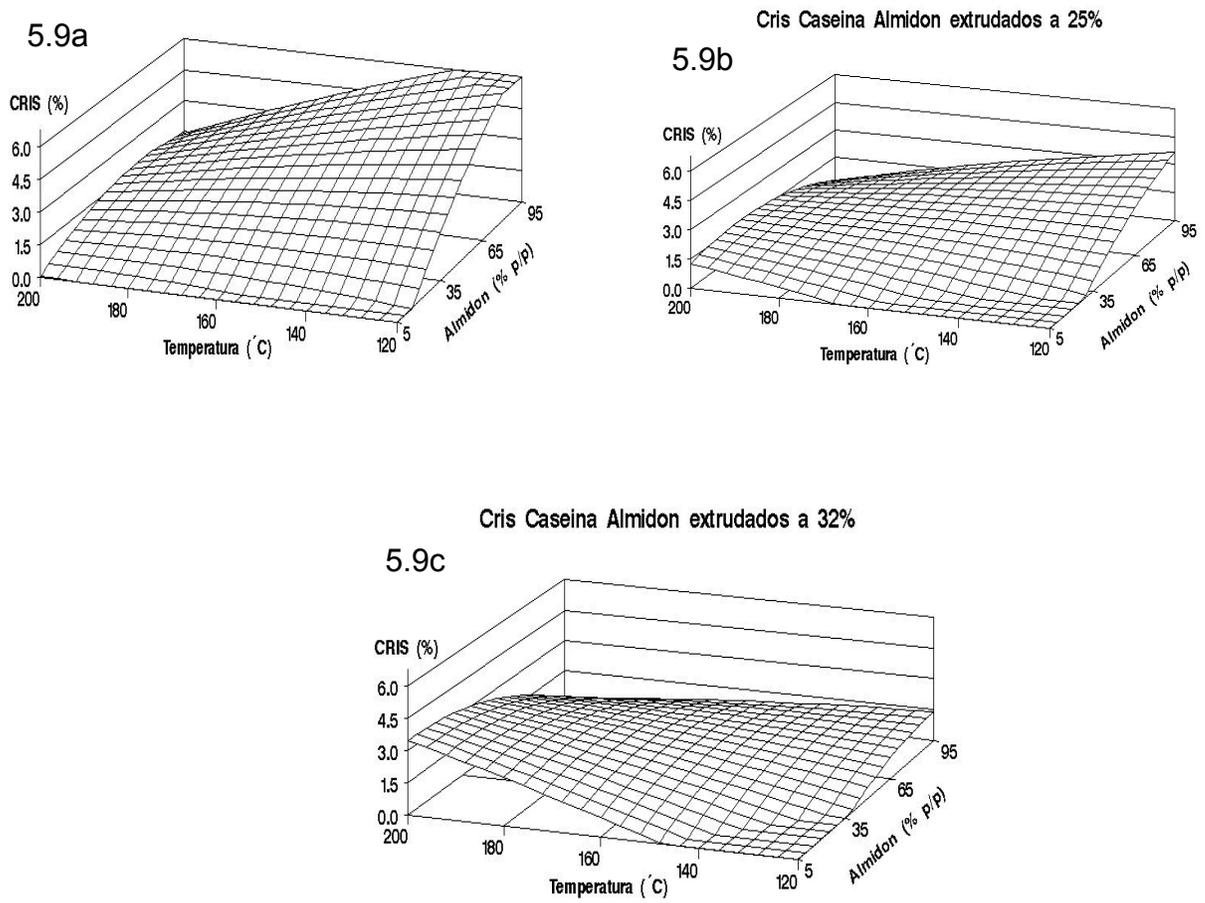


Figura 5.9 Gráficas de superficie de respuesta de la cristalinidad (**CRIS**) de los biopolímeros extrudidos con contenidos de humedad de procesamiento de 18% (5.9a), 25% (5.9b) y 32% (5.9c)

De acuerdo con Zobel (1988). El porcentaje de cristalinidad en el almidón nativo de trigo según es del orden del 36% existiendo por efecto de la extrusión una

pérdida parcial o total del orden estructural semicristalino del almidón lo que significa la pérdida de cristalinidad

El máximo porcentaje de cristalinidad encontrado en las muestras de los extrudidos de caseína-almidón fue del 6%, lo que significa una pérdida del 84% de la cristalinidad en relación al almidón nativo, en muestras procesadas a una temperatura de 126°C con un contenido de humedad de 18% y una proporción de almidón del 95% en la mezcla de los biopolímeros. Este porcentaje de cristalinidad del 6% disminuyó aún más, debido al incremento en la temperatura de procesamiento de 120 a 194°C así como debido a la disminución de la cantidad de almidón presente en la mezcla de biopolímeros lo que nos indica que el grado de cristalinidad en la interacción de caseína – almidón es altamente dependiente de la proporción de almidón.

La alta temperatura de procesamiento de extrusión mayor a la temperatura de gelatinización del almidón aunada al efecto de cizalla producido en el interior del extrusor provocan la pérdida de birrefringencia de los gránulos de almidón, modificando su estructura atribuyéndose a estas modificaciones la disminución o pérdida de cristalinidad, en relación al grado que presenta un almidón nativo.

Conforme se incrementó el contenido de humedad de las muestras de 18 a 32% se observa que disminuyó la intensidad en los difractogramas de rayos X, lo que nos indica la pérdida de la cristalinidad en las muestras extrudidas.. Los mínimos valores de cristalinidad pudieron observándose en muestras procesadas a 32% de humedad, temperaturas entre 126 a 135°C y porcentaje de caseína mayores que 80%. Esto debido a que el almidón es el componente directamente responsable de los cambios estructurales y del porcentaje de cristalinidad. Jenkins y Donald (1998) observaron que cuando el almidón fue tratado térmicamente a bajos contenidos de humedad conservó su cristalinidad, contrario a lo que ocurrió cuando un almidón fue procesado con altos contenidos de humedad y temperatura de 120°C, provocando la disminución de la cristalinidad.

5.10 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Del resultado de los análisis del barrido calorimétrico diferencial asociado a las transiciones de fase de las mezclas de biopolímeros extrudidos fueron obtenidos diferentes termogramas para cada una de las muestras a una $a_w = 0.46$ y una proporción agua-muestra de 2:1 Se seleccionó algunos termogramas representativos para muestras analizadas con proporción agua – muestra 2:1 mostradas en las figuras 5.10.1, 5.10.2, 5.10.3 y 5.10.4 La tabla 7 muestra el análisis del barrido calorimétrico diferencial asociado a las transiciones de fase

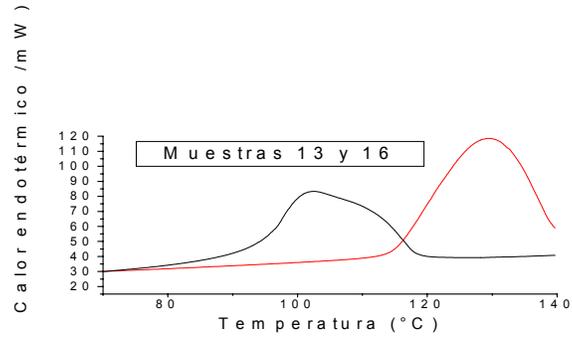


Figura 5.10.1 Termogramas de las muestras correspondientes a los tratamientos 13 y 16 obtenidas con una proporción de agua - muestra 2:1

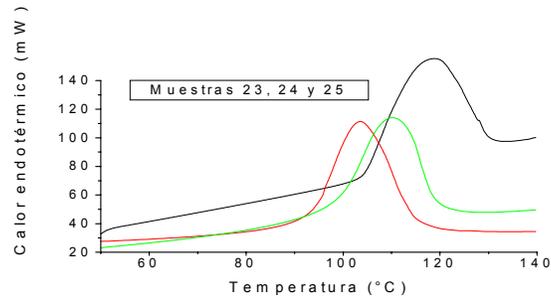


Figura 5.10.2 Termogramas de las muestras correspondientes a los tratamientos 23, 24 y 25 obtenidas en con una proporción de 2:1 agua - muestra

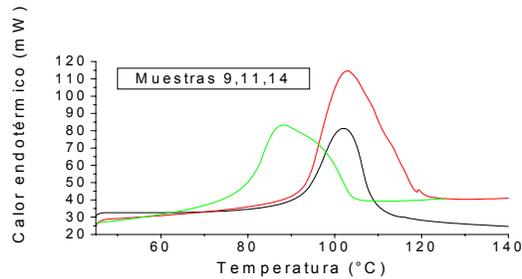


Figura 5.10.3 Termogramas de las muestras correspondientes a los tratamientos 9, 11 y 13 obtenidos con una proporción 2:1 agua - muestra

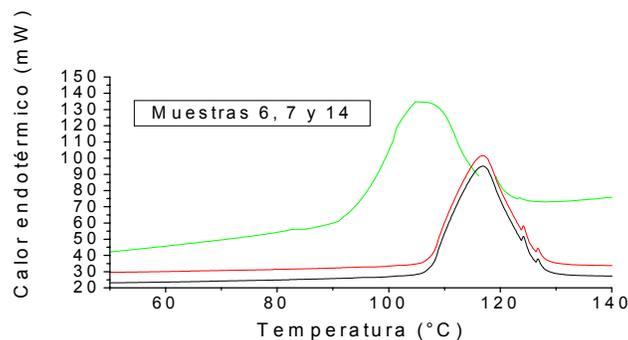


Figura 5.10.4 Termogramas de las muestras correspondientes a los tratamientos 6, 7 y 14 obtenidas con la proporción agua - muestra 2:1

Tabla 7 Análisis del barrido calorimétrico diferencial asociado a las transiciones de fase

Muestra	área total	área picos	Tm (°C)
1	337.73	0.88	110.6
2	403.86	20.39	99.4
3	358.17	1.04	104.2
4	374.31	8.45	108.2
5	318.16	1.88	102.4
6	405.57	8.61	101.0
7	396.00	2.43	114.0
8	543.21	9.61	111.5
9	509.98	9.55	102.5
10	574.58	13.07	106.4
11	470.36	8.35	103.0
12	524.53	5.12	105.0
13	512.58	13.56	102.7
14	453.63	1.84	119.0
15	535.63	12.5	102.0
16	462.12	6.88	109.9
17	556.65	7.98	109.4
18	574.51	8.73	110.0
19	513.49	14.24	104.2
20	468.06	0.61	107.8
21	606.18	10.09	106.0
22	508.63	9.58	103.8
23	416.03	8.08	105.0
24	519.33	10.24	101.5
25	432.68	7.72	108.0

Como se puede apreciar en los termogramas de las muestras extrudidas estas no presentaron transición vítrea T_g "glass transition" esto es atribuido tanto al efecto de extrusión causando la pérdida parcial o total de la cristalinidad provocada por los cambios estructurales en el almidón, como por la interacción de almidón-caseína que producen complejos de alto peso molecular. Sin embargo se puede

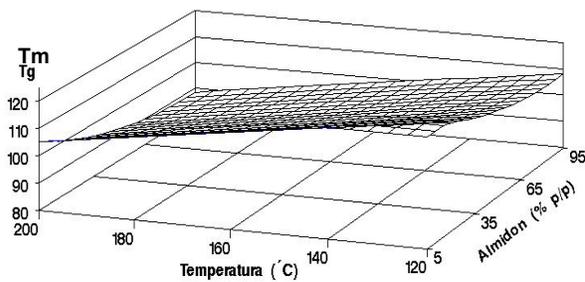
apreciar con claridad una transición de fase T_m temperatura de fusión “melting temperature” entre los 100 y 120°C para muestras analizadas dependiendo de las variables de procesamiento. Así mismo la temperatura de fusión T_m de las muestras analizadas a una $a_w = 0.46$ fue encontrado en un rango de temperaturas entre 140 a 180°C

Las temperaturas de fusión (T_m) de las muestras de proporción agua- muestra de 2:1 fueron analizadas estadísticamente observándose el efecto de las variables del proceso de extrusión en la modificación de las propiedades térmicas de los extrudidos. El análisis de varianza refleja el efecto de las variables de procesamiento por extrusión encontrando una correlación $R^2 = 0.600$ y una probabilidad de F de $p < 0.0337$ para el siguiente modelo matemático

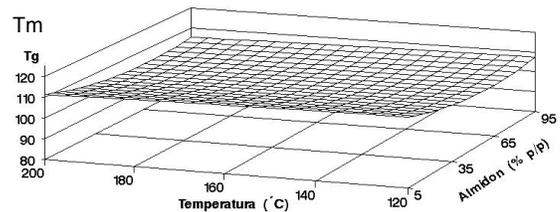
$$T_m = 254.927578 - 0.738263 T - 6.053785 H - 0.712670 C - 0.000188T^*T + 0.016528 H^*H + 0.002325 C^*C + 0.030781 T^*H + 0.16472 H^*C$$

A través de este modelo se obtuvieron las gráficas de superficies de respuesta mostradas en la Fig.5.10a, 5.10b, 5.10c

5.10a



5.10b



5.10.c

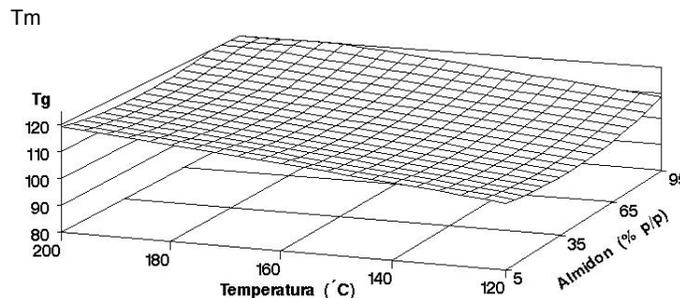


Figura 5.10 Gráficas de superficies de respuesta de las temperaturas de fusión T_m de los biopolímeros extrudidos a las humedades de procesamiento de 18%.(5.10a), 25% (5.10b) y 32%.(5.10c)

Las gráficas de superficie de respuesta de perfil de las temperaturas de fusión (T_m) de las muestras extrudidas y analizadas con una proporción agua- muestra de 2:1, son mostradas en la figura 5.10a para un de contenido de humedad del 18% se observa que la T_m disminuye a medida que aumenta la temperatura desde 120 a 200°C, y este efecto se ve intensificado cuando se aumenta la proporción de almidón en la mezcla. Es decir, que cuando se procesan mezclas con altas proporciones de almidón (95%) y altas temperaturas (200°C) a bajas humedades (18%) se produce una mayor fragmentación del almidón Esta mayor fragmentación del almidón es la responsable de la disminución de la temperatura de fusión (T_m). De forma contraria cuando se aumenta la proporción de caseína en la muestra y se disminuye la temperatura de procesamiento a (126°C) se observa un incremento en la temperatura de fusión a este mismo contenido de humedad del 18%. Esto probablemente se debe a que la caseína no sufre una fragmentación significativa Resultados semejantes fueron obtenidos por Went et al (1990) indicando que las proteínas del maíz fueron mas resistentes a las fuerzas de cizallamiento y no se fragmentan durante la extrusión.

La gráfica de superficie de respuesta (figura 5.10b) del perfil de temperatura de fusión (T_m) m a una humedad 25% no presentan cambios significativos por el aumento tanto de la temperatura como por el incremento de la proporción de almidón con relación a la caseína, esto posiblemente se deba a que en este contenido de humedad, el agua funciona como plastificante evitando cambios estructurales significativos por lo que no se alteran los valores de T_m .

Sin embargo a mayores contenidos de humedad (32%) (figura 5.10c) se observa que a altas temperaturas de procesamiento (194°C) y altas proporciones de almidón 95% se establecen los valores máximos de temperatura de fusión (T_m) alrededor de (115°C) disminuyendo paulatinamente estos máximos valores de T_m al decrecer la temperatura de procesamiento, posiblemente se deba a que en estas condiciones el agua contribuya a una mayor interacción de los biopolímeros almidón - caseína por lo que se obtienen los valores máximos de temperatura de fusión por la nueva estructura de alto peso molecular formada por los biopolímeros

La interacción de los biopolímeros caseína-almidón por el efecto de la extrusión sin duda conduce a la formación de moléculas amorfas de alto peso molecular estas dos afirmaciones son la explicación del comportamiento del perfil termográfico de los extrudidos y como se puede observar en las figuras de la 5.10.1 a la 5.10.4 no presentan transición vítrea (T_g) y la temperatura de fusión T_m es notablemente mayor a la temperatura de fusión reportada por otros autores para almidón de trigo

5.11 Espectroscopia infrarroja

Los espectros de infrarrojo confirman la interacción de algunos grupos funcionales de los biopolímeros en la formación de complejos. Los espectros fueron registrados en un rango de 400 - 4000 cm^{-1} . Los espectros de almidón y caseína difieren uno del otro como pueden observarse en las figuras 5.11.1 y 5.11.2 y tablas 7 y 8 de posición de bandas

Cuando se sustrae el espectro del almidón del espectro de interacción caseína almidón se obtiene un espectro de caseína y / o almidón que difiere del espectro obtenido individualmente. Este desplazamiento de bandas en particular como también la diferencia de los espectros, indican claramente que las muestras de almidón-caseína después de ser extrudidas llevan a la formación de complejos o modificaciones estructurales que favorecen la interacción entre ellas.

Tabla 8. Posición y asignación tentativa de banda de espectros de IR del almidon

Compuesto	Posición de banda en cm^{-1}	Asignación tentativa de banda
Almidón	3430 muy fuerte	νOH puente de H intramolecular
	2928 débil	νOH
	1655 débil	$\nu\text{C=O}$
	1373 débil	δOH
	1084 fuerte	δCOC
	980 muy fuerte	δCO

ν y δ denotan modos de vibración de tensión (elongación) y flexión respectivamente

La notación de intensidad de banda es: muy fuerte, fuerte, débil, muy débil y hombro.

Tabla 9. Posición y asignación tentativa de banda de espectros de caseina

Compuesto	Posición de banda en cm^{-1}	Asignación tentativa de banda
Caseína	3437 muy fuerte	νNH puente de H intramolecular
Puente de Hidrogeno	3280 hombro	νOH asociación polimérica
Intramolecular asociación	2961 débil	νOH
Polimerica	2854 débil	νOH
	1624 fuerte	$\nu\text{C=O}$ amida
	1535 fuerte	δNH
	1272 débil	δOH
	1197 débil	$\delta\text{C-N}$

Las bandas de los espectros de IR de las muestras extrudidas están indicadas en la tabla N° 9, donde se tiene una selección de las muestras en función de su relación almidón-caseína en la mezcla.

Tabla 10 Espectros de IR del complejo almidón caseína en cm^{-1}

Caseín a 100%	5% caseína 95% almidón	23.% caseína 76.%almidón	50%caseína 50%almidón	76.% caseína 23.%almidón	95%caseína 5% almidón	Almidón 100%
3403	3424	3424	3417	3424	3413	3402
2930	2930	2929	2929	2930	2930	2929
		2346	2347			1650
1650	1650	1650	1647	1650	1640	1650
1537	1537					
1454	1454	1456	1448	1454	1407	1407
1155		1155	1155	1156	1157	1154
1079	1079	1080		1080	1080	1079
1026	1026	1024	1020	1023	1022	1025
		933		932		933
				856		858
				763		762
689.6	689.6	697				
		578		578		577

Mezcla almidón 5% caseína 95% Muestra 14 y 20

Mezcla almidón 23.25% caseína 76.75% Muestras 01, 03, 05 y 07

Mezcla almidón 50% caseína 50% Muestras 09, 10, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 21, 22, 23, 24 y 25

Mezcla almidón 76.75% caseína 23.25% Muestras 02, 04, 06 Y 08

Mezcla almidón 95% caseína 05% Muestras 11 y 17

En esta tabla N° 9 se puede observar que las muestras extrudidas a 160°C con 5% de almidón en relación a la caseína presentan un pequeño desplazamiento en su banda de 3403 cm^{-1} en relación a la caseína de 3424 cm^{-1} (grupos amino y amida), como también una banda en 2930 cm^{-1} característico de los grupos OH poliméricos de los carbohidratos del almidón banda que no se observa en la caseína. Los demás picos presentan ligeras alteraciones en cuanto a su longitud de onda, observando también la presencia de otros picos adicionales (1079 y 1025 cm^{-1}) que solo están presentes en el espectro del almidón correspondiendo a grupos carboxilo y alcoholes.

Cuando la mezcla de almidón caseína fue extrudida a 140°C y aumentando la concentración de almidón para 23.25% no se observó el desplazamiento de la banda a 3424 cm^{-1} y los demás picos tampoco presentaron alteraciones con relación a las muestras procesadas con 5% de almidón, solo se obtuvo un pico adicional a 2346 cm^{-1} . Aunque cuando fue extrudida a 180°C nuevamente se tiene el desplazamiento de la banda 3403 cm^{-1} manteniéndose inalterado los demás picos y perdiéndose el pico a 2346 cm^{-1} como las muestras con 5% de almidón y 160°C , en cuanto al efecto del contenido de agua en la extrusión se puede observar que incrementos de humedad intensifican la resolución de ciertos picos como los grupos amino y amida (3404 cm^{-1} muy fuertes) y los alcoholes primarios (1024 cm^{-1} muy fuertes) que anteriormente se presentaban como solo fuertes o débiles respectivamente. Cuando los biopolímeros fueron extrudidos en una relación de 50:50 % a diferentes temperaturas y humedades, se observa que la banda de 3424 cm^{-1} es ligeramente desplazada en función de la temperatura

manteniendo su resolución de muy fuerte, también en la longitud de onda de 1023 cm^{-1} se intensifica la resolución del pico a muy fuerte dependiendo del incremento de la temperatura, es decir a 123°C esta banda es débil y a 193°C es muy fuerte, los demás picos no presentaron diferencias.

Muestras de almidón al 76.75% con caseína al 23.25% extrudidas a 140°C , presentaron diferencias en la banda de los aminos libres y amidas a cambios de humedad de extrusión, obteniendo 3450 cm^{-1} para 21% y 3404 cm^{-1} para 29%, también se intensificó el pico a 1650 cm^{-1} (amidas) para 29% comparado con 1640 cm^{-1} para 21%, los demás picos no tienen diferencias de intensidad ni de desplazamiento en la longitud de onda. Efecto semejante fue observado para 180°C de extrusión obteniendo mayores intensidades y resolución de los picos para altas humedades en las mismas longitudes de onda del espectro de IR, con la diferencia que a 1155 cm^{-1} es débil la intensidad para 21% y fuerte para 29%, además que a 1023 cm^{-1} se observa un pico muy fuerte, los otros picos no presentaron diferencias.

Como sería de esperar que muestras con alto contenido de almidón 95% presentaron espectros de IR semejantes al almidón 100%, es así que los picos donde se tenía menor intensidad, como los que representan a grupos con oxígeno, sean mas fuertes y de mayor resolución, es decir a 1650 cm^{-1} , 1154 cm^{-1} y a 1025 cm^{-1} debido a la mayor presencia de alcoholes, ácidos carboxílicos y amidas.

Por estos resultados se puede indicar que en el proceso de extrusión se forman nuevas estructuras con los compuestos de almidón caseína, que de acuerdo con Zaleska et al (2001) dan lugar a complejos y los grupos que mayor modificación sufren son los grupos amino, amida, carboxilo y hidroxilo de ambos compuestos, ya que el almidón de trigo contiene naturalmente proteínas en su superficie e internamente en su estructura (Baldwin, 2001) aun a pesar de realizar la extracción del almidón exhaustivamente. Esta proteína del almidón probablemente también interacciona con la caseína estableciéndose redes y modificaciones estructurales en función de la temperatura, concentración y humedad de extrusión las cuales son observadas por los espectros de IR

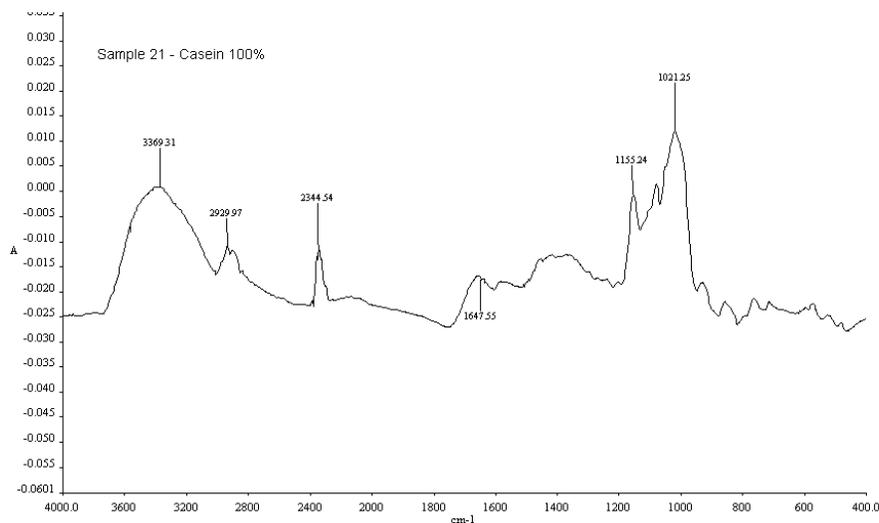


Figura N° 5.11.1 Espectro de IR de la muestra de caseína

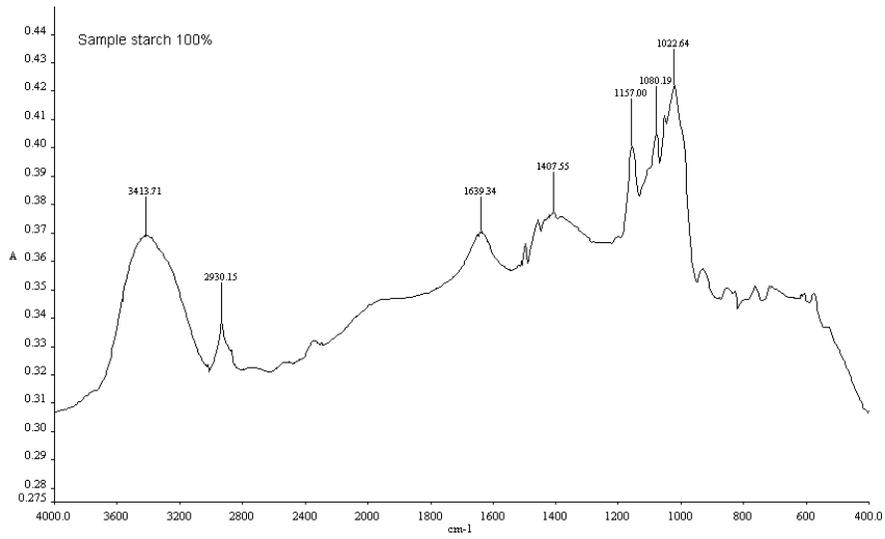


Figura N° 5.11.2 Espectro de IR de la muestra de almidón de trigo

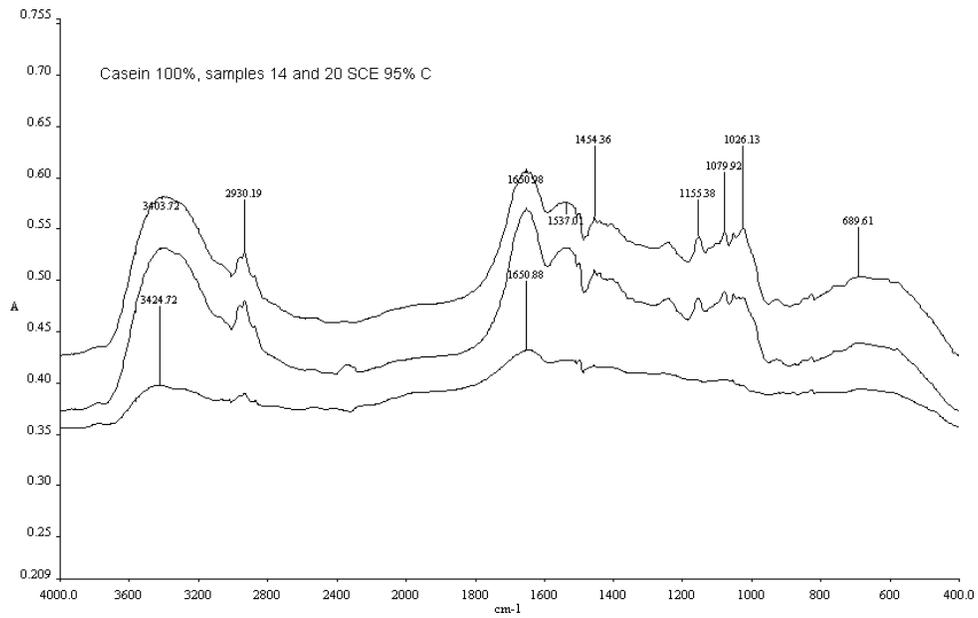


Figura N° 5.11.3 Espectros de IR de muestras de almidón-caseína que contienen 5% de almidón en la mezcla

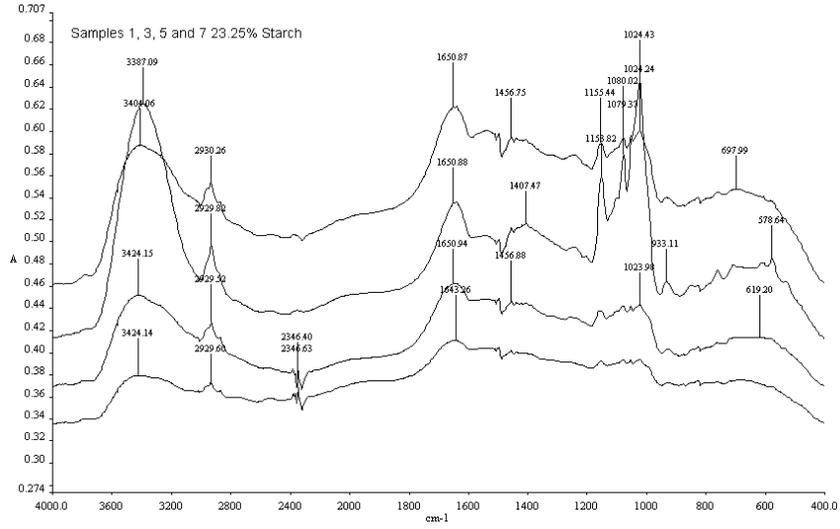


Figura N° 5.11.4. Espectros de IR de muestras de almidón-caseína que contienen 23.25% de almidón en la mezcla

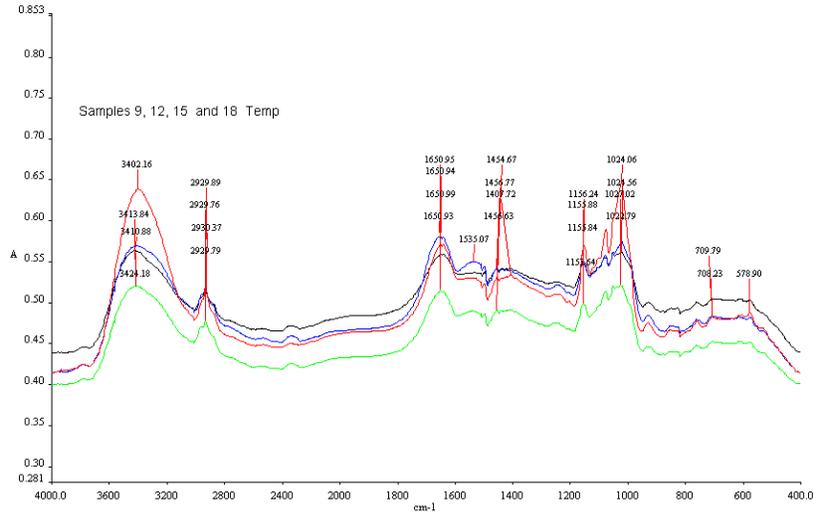


Figura N° 5.11.5 Espectros de IR de muestras de almidón-caseína que contienen 50% de almidón en la mezcla

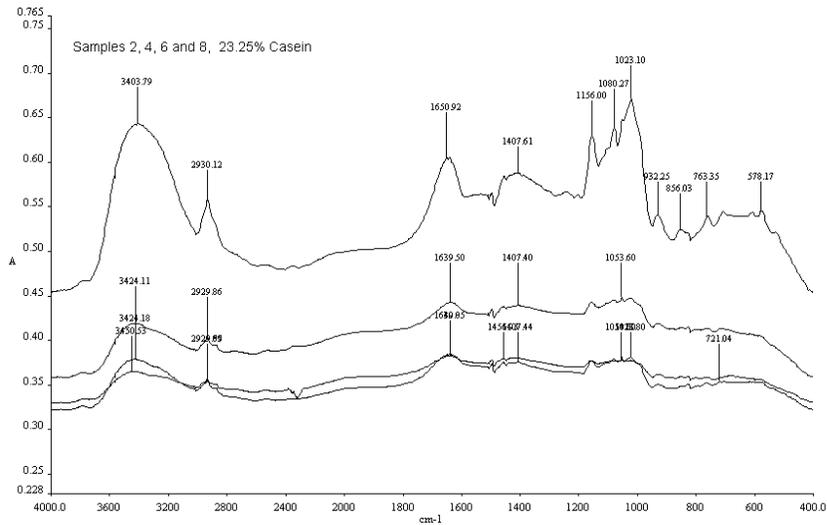


Figura N° 5.11.6. Espectros de IR de muestras de almidón-caseína que contienen 76.75% de almidón en la mezcla

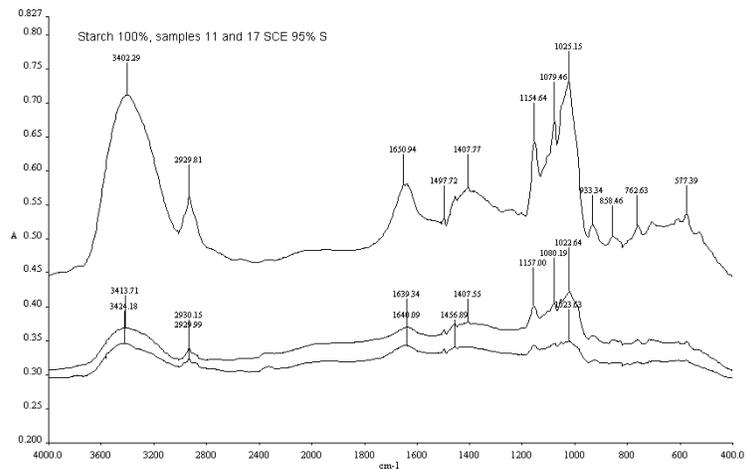


Figura N° 5.11.7. Espectros de IR de muestras de almidón-caseína que contienen 95% de almidón en la mezcla

5.12 Reometría (viscoelasticidad)

El análisis del comportamiento viscoelástico de las muestras extrudidas fue llevado a cabo en dos etapas en el Reómetro ARES-RFS III, TA Instruments, USA del perfil viscoelástico de cada muestra fue derivado el módulo de almacenamiento G' , módulo de pérdida G'' y ángulo G'/G'' a continuación se muestra los reogramas de algunas muestras para G' y G'' contra frecuencia en las Figuras 5.12

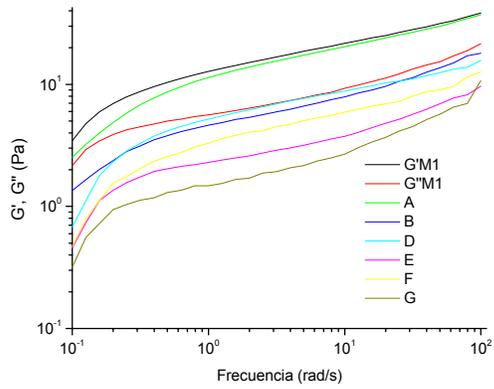


Figura 5.12a Reogramas de G' y G''

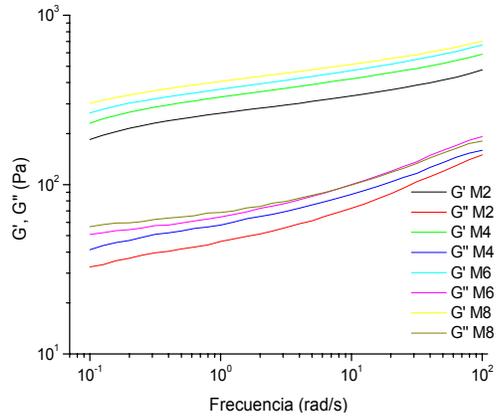


Figura 5.12b Reogramas de G' y G'' Versus frecuencia para las muestras 2.4.6.8

Versus frecuencia para las muestras 1,3,5,7

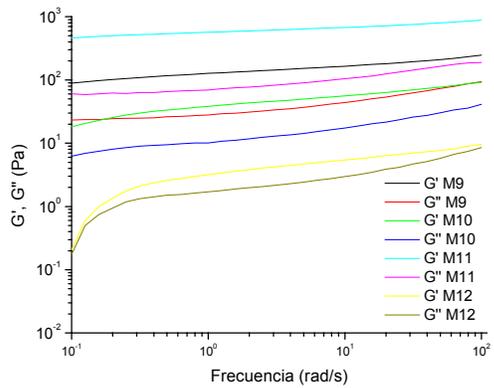


Figura 5.12c Reogramas de G' y G'' versus frecuencia para las muestras 9.10.11.12.

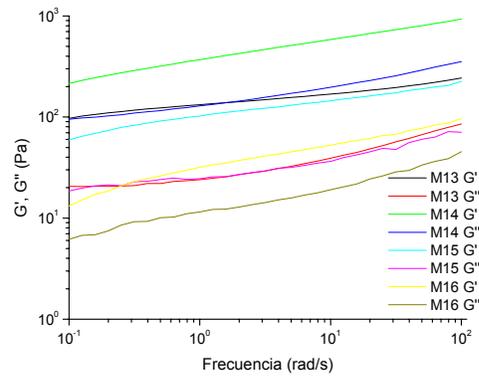


Figura 5.12d Reogramas de G' y G'' versus frecuencia para las muestras 13 14 15 16

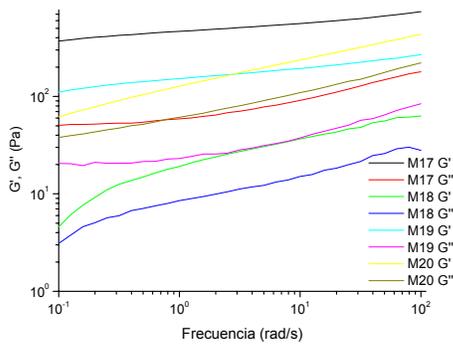


Figura 5.12e Reogramas de G' y G'' contra frecuencia para las muestras 17,18,19,20.

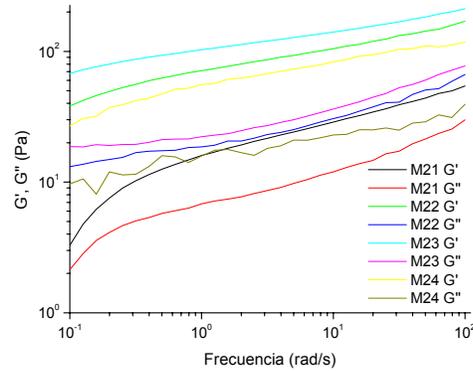


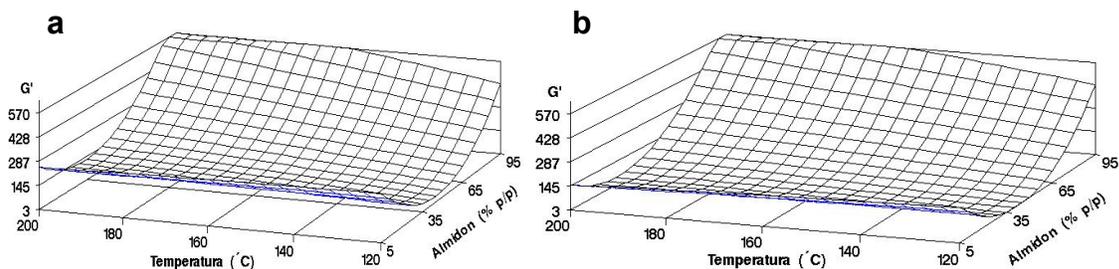
Figura 5.12f Reogramas de G' y G'' contra frecuencia para las muestras 21,22,23,24.

El análisis estadístico sobre los resultados de las propiedades reológicas de los productos extrudidos indica que el ANOVA es significativo para G' , G'' y $\tan \delta$ una vez que los valores de la probabilidad de F fueron: $P < 0.0001$; $P < 0.0171$ y $P < 0.0028$ respectivamente y el modelo ajustado a cada una de estas propiedades fue $R^2 = 0.8738$; $R^2 = 0.60$ y $R^2 = 0.754$, indicando que las variables de extrusión si tienen un efecto significativo en las propiedades reológicas de los productos extrudidos. Los modelos ajustados se presentan a seguir, a través de estos modelos se realizaron gráficas de superficies de respuesta como se muestran en las Figuras 5.12.1a 5.12.1b 5.12.1c ; 5.12.2a 5.12.2b 5.12.2c; 5.12.3a 5.12.3b y 5.12.3c

$$G' = 731.252954 + 0.8394313 \times T - 29.1703607 \times H - 21.7718286 \times C - 0.0026751 \times T^2 + 0.5096057 \times H^2 + 0.1562825 \times C^2 - 0.0375313 \times TH + 0.0455514 \times TC + 0.1271729 \times HC$$

$$G'' = 8.61773527 + 0.826435384 \times T + 1.84338728 \times H - 4.077783649 \times C - 0.003121813 \times T^2 - 0.04442072 \times H^2 + 0.029814441 \times C^2 + 0.00828972 \times TC$$

$$\tan \delta = 1.672837547 - 0.022411377 \times T + 0.052565049 \times H - 0.001768256 \times C + 0.000061073 \times T^2 - 0.001116744 \times H^2 - 0.000010075 \times C^2 + 0.00005 \times TH - 0.000010748 \times TC + 0.000023364 \times HC$$



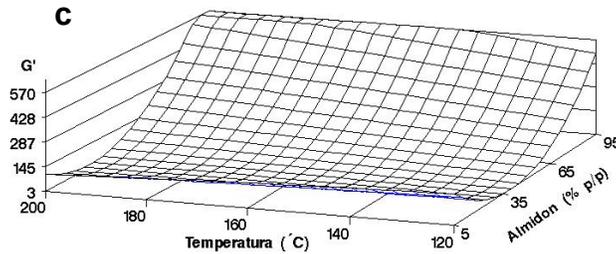


Figura 5.12.1 Gráficas de superficies de respuesta del módulo de almacenamiento G' de los biopolímeros extrudidos a las humedades de procesamiento de 18%.(5.12.1a), 25% (5.12.1b) y 32%.(5.12.1c).

Las gráficas de superficies de respuesta para 18% de humedad indican que incrementos en el contenido de almidón hasta 95% aumenta el valor de G' , la temperatura de extrusión no presenta un efecto preponderante, notándose un ligero incremento en la elasticidad (G') de las muestras para mayores temperaturas (200°C). Para humedad de extrusión de 25% y 32% se observó un comportamiento similar, con una ligera disminución de los valores de G' para aumentos de humedad. Esto indica que en los productos extrudidos de ambos polímeros el almidón es el responsable de las propiedades de elasticidad del producto, en la medida que se incrementa la proporción de proteína disminuye esta propiedad, debido a la desnaturalización que sufre la caseína en el proceso de extrusión la hace menos soluble, razón por la cual no contribuye en la elasticidad de los productos extrudidos.

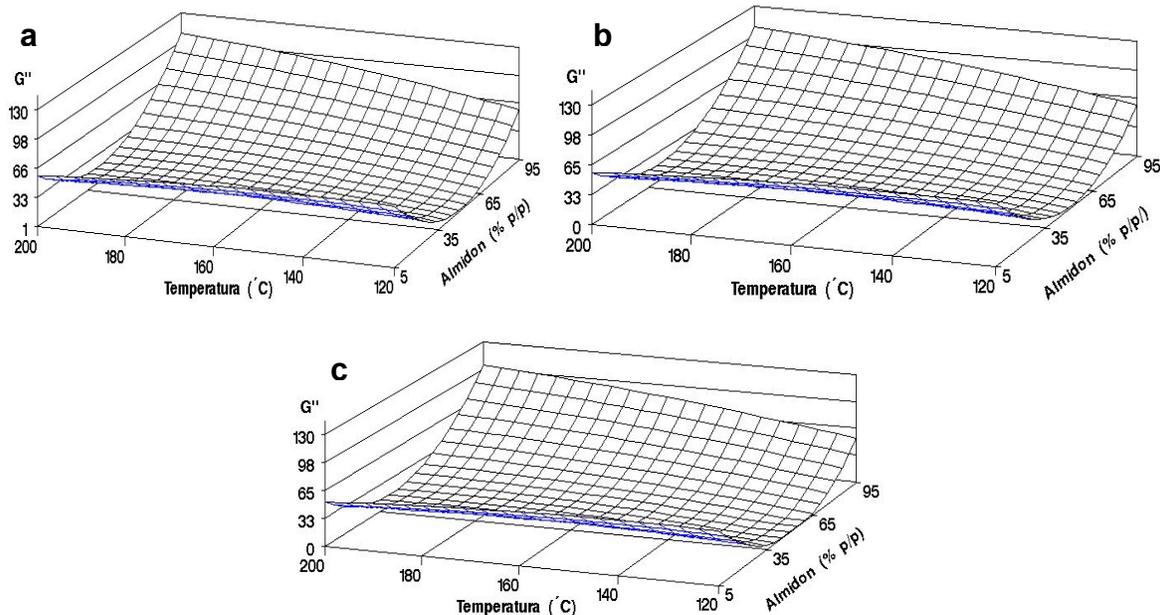


Figura 5.12.2 Gráficas de superficies de respuesta del modulo de pérdida G'' de los biopolímeros extrudidos a las humedades de procesamiento de 18%.(5.12.2a), 25% (5.12.2b) y 32%.(5.12.2c)

Los valores del modulo de perdida (G'') relacionados con la propiedad de viscosidad en las muestras indican que aumentos del contenido de humedad durante el proceso de extrusión no afectaron significativamente en esta propiedad reológica, una vez que las gráficas de superficies de respuesta en el intervalo de trabajo (18% a 32%) no presentaron cambios apreciables en su comportamiento, para la temperatura de extrusión aumentos de 120°C a 200°C se produjo un incremento del valor de G'' para todos los niveles de humedad. El mayor efecto lo tuvo la concentración de almidón con relación a la caseína, es decir, que aumentos de la concentración de almidón mayor y menor que 50% provocó un incremento de G'' en ambos sentidos, aunque se observa que G'' es mucho mayor para concentraciones superiores al 50% de almidón.

Analizando los gráficos de reología se observa que los valores de G' siempre fueron mayores que los de G'' lo que indica que los geles de productos extrudidos presenta mas propiedades elásticas que viscosas y este comportamiento se acentúa mas, para mayores contenidos de almidón en relación a la caseína. También se observa que los menores valores de G' y G'' se obtienen para una relación de almidón: caseína próximos a 50% (varia en función de la humedad), indicando que posiblemente en esta relación se tiene la máxima interacción de estos dos macromoléculas por lo que se presentaron los menores valores de G' y G'' o viscoelasticidad. Resultados semejantes fueron encontrados por Takeuchi (1969) donde la máxima interacción fue encontrada para una relación de 1:1 de almidón proteína. Tecante et al. (1999) indica que cuando la relación de almidones entumecidos enteros es mayor que los fragmentados estos aportan mayor propiedad de elasticidad que cuando están fragmentados.

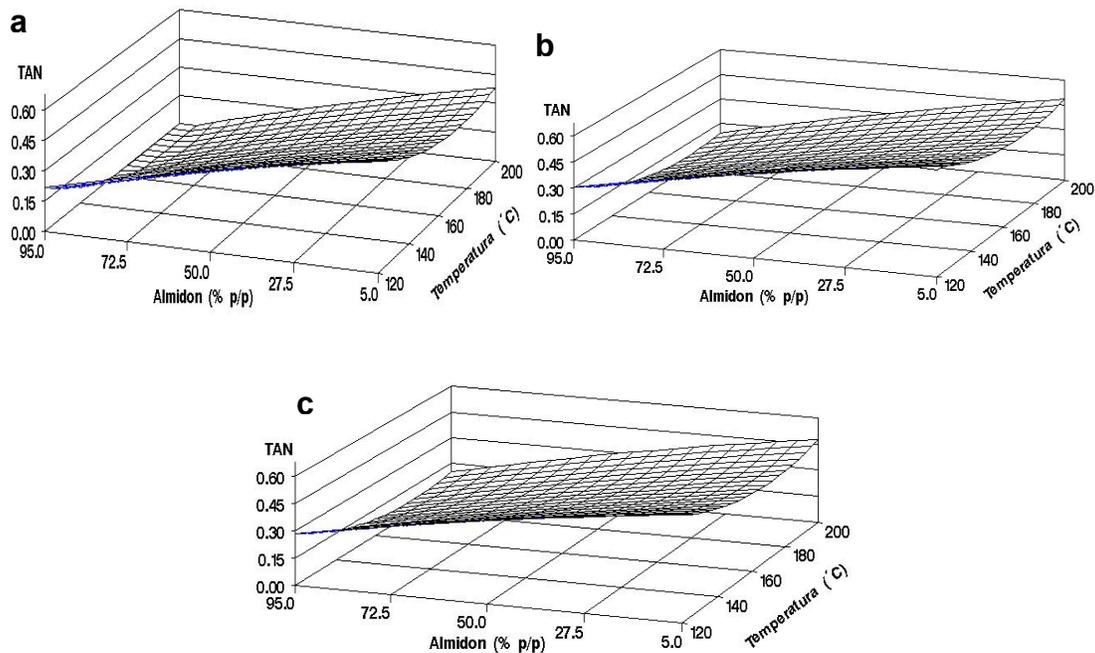


Figura 5.12.3 Gráficas de superficies de respuesta de la tangente del ángulo G' / G'' de los biopolímeros extrudidos a las humedades de procesamiento de 18%. (5.12.3a), 25% (5.12.3b) y 32%. (5.12.3c)

Las graficas de superficie de respuesta de la tangente δ que es la relación entre G''/G' muestra que incrementos de la concentración de almidón disminuye el valor de tangente δ para todas las humedades en que fue realizada la extrusión, la temperatura no presentó un efecto significativo. Correlacionando con las afirmaciones anteriores se puede indicar que a mayor contenido de almidón la propiedad reológica de los extrudidos tiende a ser mas elástica que viscosa y este efecto se incrementa levemente con el contenido de humedad, indicando que probablemente los gránulos de almidón conserven mas su integridad favoreciendo por lo tanto la propiedad de elasticidad (G') y cuando se tiene mayor contenido de caseína esta característica es disminuida debido a la desnaturalización de la misma y perdida de solubilidad durante el proceso de extrusión.

5.13 Azucares totales (reductores y no reductores)

Los modelos matemáticos se ajustan a los datos experimentales una vez que presenta un $R^2 = 0.8066$ con una probabilidad de F de $p < 0.0006$

$$\text{GLU} = 27.36934 + 0.08717 T - 2.81291 H + 0.16685 C - 0.000193 T*T + 0.058488 H*H + 0.001280 C*C + 0.000093 T*H - 0.000313 T*C - 0.005023 H*C$$

A través de este modelo se obtuvieron las gráficas de superficies de respuesta Figura 5.13a, 5.13b y 5.13c.

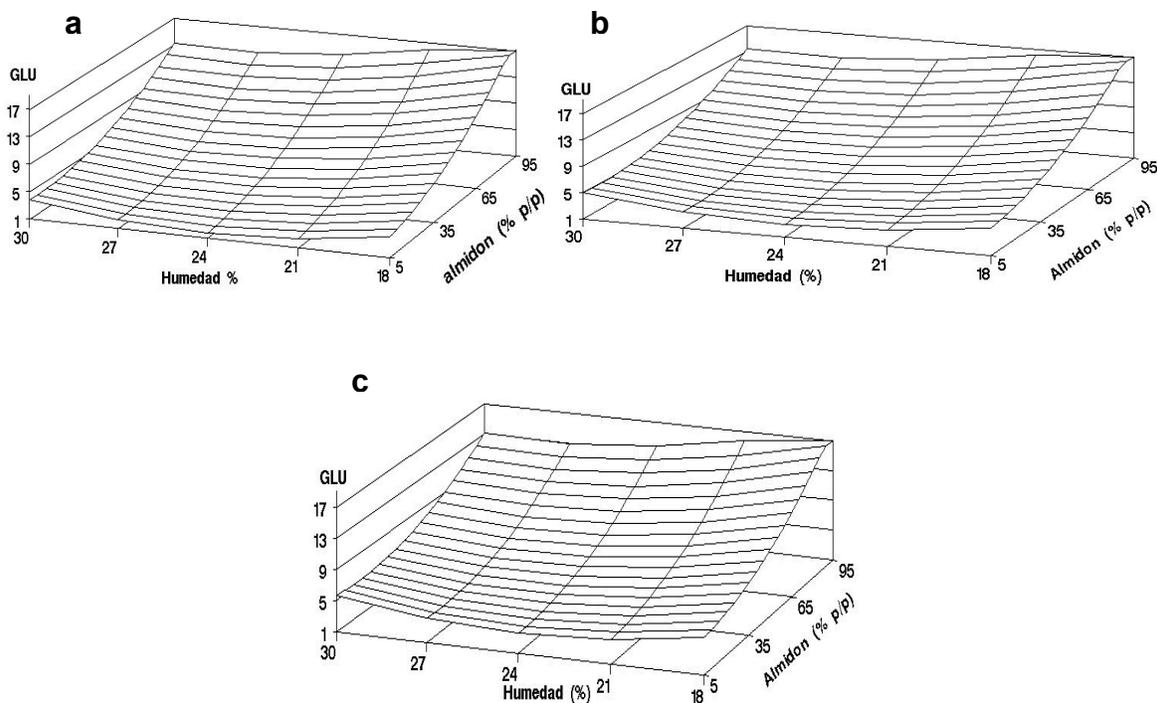


Figura 5.13. Gráficas de superficies de respuesta de los equivalentes en glucosa de azucares totales (reductores y no reductores) de los biopolímeros extrudidos a las humedades de procesamiento de 18%.(5.13a), 25% (5.13b) y 32%.(5.13c)

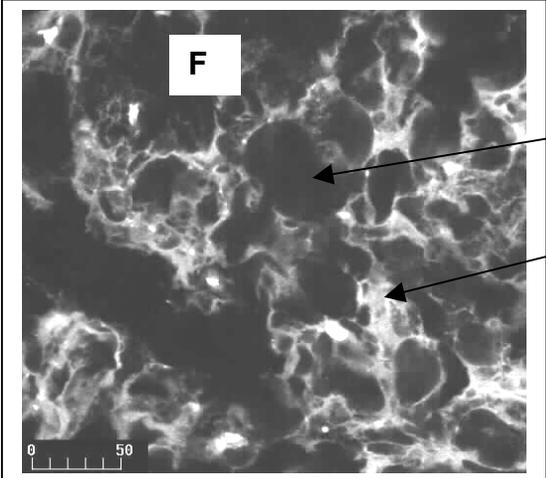
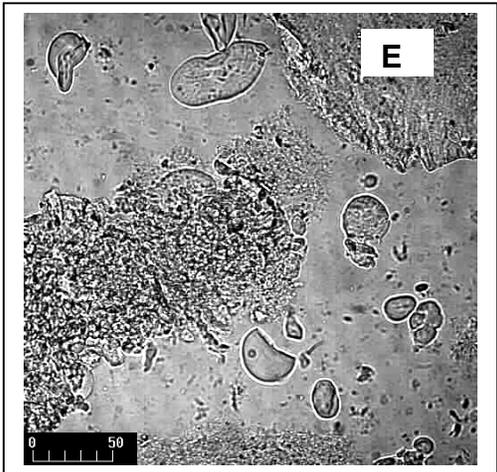
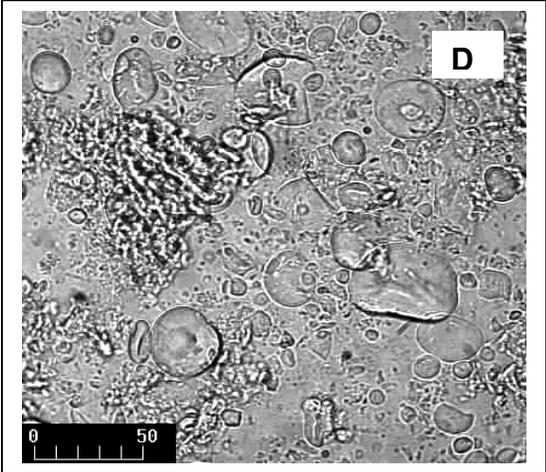
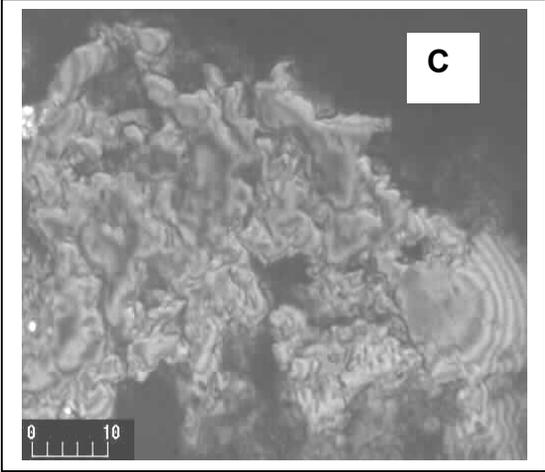
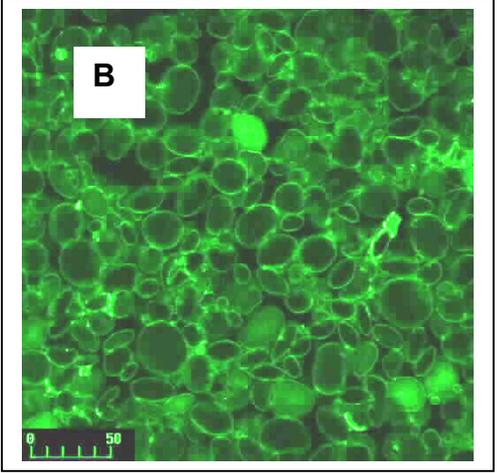
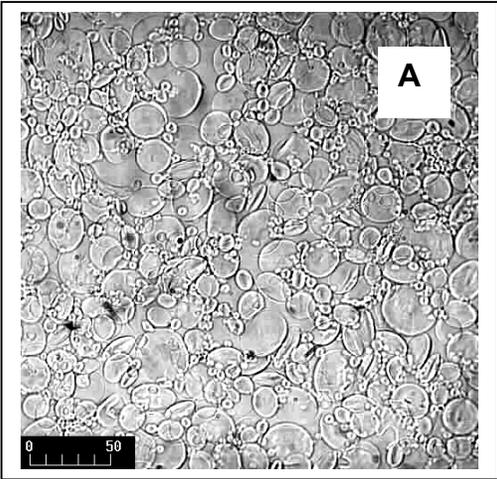
Las gráficas de superficie de respuesta de la cuantificación de los miligramos de glucosa equivalente a las temperaturas de 126, 160 y 194°C muestran que la cantidad de glucosa o azúcares totales solubles en DMSO se incrementó al incrementarse la proporción de almidón en la mezcla siendo los valores máximos alcanzados para las muestras con 95% de almidón, así como también los valores mínimos de cantidad de glucosa son observados a la mínima proporción de almidón del 5% en conjunción con la humedad en el intervalo de contenido de humedad de 21 a 27%

Referente al efecto de la temperatura de procesamiento en la cuantificación de glucosa o azúcares totales solubles en DMSO no es significativo ya que la superficie de respuesta solo denota un ligero aumento al incrementarse la temperatura de 126 a 194°C.

El resultado de los análisis de azúcares reductores no revelaron la presencia significativa de estos atribuyendo este hecho al que el proceso por extrusión (altas temperaturas y cortos tiempos de procesado) y a la presencia de proteína con la posible formación de complejos almidón–caseína, que evita una fragmentación intensa del granulo de almidón, dentro de los intervalos de trabajo de las variables a la que fueron sometidos estas macromoléculas, resultados semejantes fueron obtenidos por Gropper et al (2002) en la que encuentra que el proceso de extrusión no produce una fragmentación intensa en los gránulos y el peso molecular que encuentra es de 1×10^4 a 6.7×10^4 . A partir estos resultados se puede indicar que el contenido de azúcares reductores en nuestro proceso es muy pequeño no pudiendo ser detectadas por los métodos usuales.

5. 14. Microscopia Confocal

5.14 Microfotografías de los biopolímeros caseína y almidón nativos y procesados por extrusión en un microscopio electrónico confocal



Almidón

Proteína

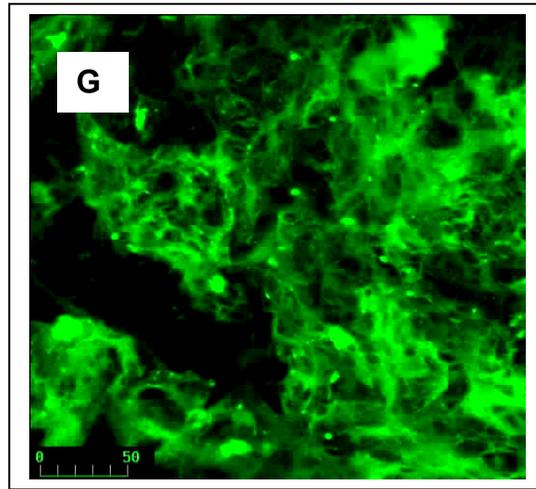


Figura 5. 14. Microfotografías confocal de los biopolímeros almidón–caseína extrudidos

Las microfotografías confocal A y B presentan al almidón nativo observado por transmitancia y por fluorescencia, C es la caseína sin tratamiento. Los resultados de las demás microfotografías son muestras extrudidas, El análisis micro estructural reafirma los resultados observados por los métodos de análisis previos donde el proceso de extrusión desarrollado en esta investigación no fragmenta intensamente los gránulos de almidón, como se observa en la microfotografía D y E algunos fragmentos del almidón y en su mayoría los restantes gránulos todavía se mantienen íntegros interactuando con la matriz proteica desnaturalizada. Las microfotografías F y G indican como los gránulos y fragmentos de almidón se encuentran embebidos en la matriz de proteína, interactuando entre las macromoléculas formando una sola red. Nuevamente la interacción se facilita debido a que los gránulos de almidón de trigo poseen en su superficie e internamente proteínas que no se pueden extraer mediante los métodos convencionales, estas proteínas pueden formar enlaces con las caseínas, adquiriendo una nueva estructura.

VI Conclusiones

La disminución de expansión de los productos extrudidos a altas temperaturas (170 a 190° C) y humedades (25 a 30%) son atribuidas a una determinada fragmentación y una cierta fragilidad estructural del granulo de almidón, provocando también la desnaturalización de la caseína por el efecto de la alta temperatura y presión de vapor. Se debe destacar que el grado de fragmentación o daño en los gránulos de almidón no es tan intenso una vez que los valores de expansión no se disminuyen significativamente.

La solubilidad de los biopolímeros estudiados se incrementó con una mayor proporción de almidón en la mezcla y de manera contraria a mayor proporción de proteína disminuyó la solubilidad debido a la desnaturalización de la proteína por el proceso de extrusión. Los cambios estructurales se deben a que los grupos hidrofílicos como $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$ y $-SH$ de las proteínas puedan reaccionar e interactuar con el almidón, o proteínas del almidón con la caseína, provocando la disminución en la solubilidad. Los resultados del índice de absorción de agua también corroboran los resultados de solubilidad que para altas concentraciones de almidón se presentaron mayores valores de IAA, para menores niveles de almidón y consecuentemente alta proporción de proteína se obtuvieron bajos valores de IAA debido a la pérdida de solubilidad de la proteína, cuando el proceso esta sujeto a altas temperaturas de extrusión.

Cuando se incrementó la proporción de almidón en la mezcla (alrededor de 95%), mayores valores de viscosidad fueron obtenidos (IV y V90). Sin embargo, menor viscosidad no corresponde solamente a un menor valor de almidón en la mezcla (alrededor de 5%), sino también a la pérdida de solubilidad de la proteína por desnaturalización. Lo que confirma la afirmación anterior en ISA e IAA

El cambio de color en los polímeros, posiblemente son causados por reacción de Maillard entre los azúcares reductores (almidón dextrinizado) y grupos amino libres de la caseína e interacciones entre ambas macromoléculas. Sin embargo una alta proporción de caseína en la mezcla con altos o bajos niveles de contenido de humedad intensifican el cambio en color cuando la temperatura es de 194°C. Obteniendo los mínimos valores de diferencia de color cuando la humedad fue cercana al 25% con una proporción de almidón alrededor del 45% en la mezcla

La fuerza de compresión máxima se obtuvo cuando la relación de almidón caseína fue proxima a 50% para contenidos de humedad de alrededor del 28.5% los biopolímeros extrudidos adquieren una densa y rígida estructura la cual requirió mayor fuerza para su fragmentación, esto se debe probablemente a las interacciones entre almidón y caseína.

El máximo porcentaje de cristalinidad encontrado en las muestras de los extrudidos de caseína-almidón fue del 6% lo que significa una pérdida del 84% de la cristalinidad en relación al almidón nativo (36%). Este porcentaje de cristalinidad del 6% disminuyó aun más tanto por el incremento en la temperatura de procesamiento de 120 a 194°C como con la disminución de la proporción de almidón presente en la mezcla de biopolímeros lo que indica que el grado de

cristalinidad en la interacción de caseína–almidón es altamente dependiente de la proporción de almidón.

Los termogramas obtenidos por DSC de las muestras extrudidas no presentaron transición vítrea T_g “glass transition” una vez que estas ya se encuentran en estado gomoso debido al efecto de extrusión, reafirmando los resultados de difracción de rayos X de pérdida parcial o total de la cristalinidad.

El grado de daño que sufre el almidón y la desnaturalización de la proteína se manifiestan en los valores de T_m . Es decir que altas temperaturas de extrusión y bajos contenidos de humedad resultaron los valores de T_m , menores. Mientras que a bajas temperaturas y altas humedades resultaron también los valores de T_m menores y viceversa. Los cambios dan como resultado una proteína más resistente al calor a bajas concentraciones de agua.

De acuerdo a los resultados anteriores se indica que existe una probable interacción entre el almidón de trigo y caseína, que es observada a través de los espectros de IR. Cuando se sustrae el espectro del almidón de los espectros de interacción caseína almidón se obtiene un espectro de caseína y / o almidón que difiere de los espectros obtenidos individualmente. Este desplazamiento de bandas en particular como también la diferencia de los espectros, indican claramente que las muestras de almidón–caseína después de ser extrudidas llevan a la formación de complejos o modificaciones estructurales que favorecen la interacción entre ellas. Las bandas más sobresalientemente desplazadas son las de la región de la vibración del grupo CO –NH (aproximada a 1530 cm^{-1}).

Los resultados obtenidos indican que en los productos extrudidos el almidón es el responsable de las propiedades de elasticidad del producto, en la medida que incrementa la proteína (caseína) disminuye esta propiedad debido a la desnaturalización que sufre la caseína en el proceso de extrusión la hace menos soluble, razón por la cual no contribuye en la elasticidad de los productos extrudidos. También se observa que los menores valores de G' y G'' se obtuvieron para una relación de almidón: caseína próximos a 50% (varia en función de la humedad), indicando que posiblemente en esta relación se tiene la máxima interacción de estos dos macromoléculas por lo que se registraron los menores valores de G' y G'' o viscoelasticidad.

El análisis de azúcares reductores realizado por varios métodos reveló que el proceso por extrusión no libera cantidades significativas de estos azúcares debido a la posible formación de complejos almidón–caseína, evita una fragmentación intensa del granulo de almidón. Aunque en el análisis de azucares totales se tiene fragmentos solubles en DMSO que indican una determinada fragmentación de los gránulos de almidón.

Las microfotografías revelan que el proceso de extrusión forma estructuras de interacción entre ambos biopolímeros las cuales modifican las propiedades funcionales, texturales y reológicas de los productos, que podrían tener grandes posibilidades de nuevas aplicaciones en la industria alimenticia, e industria en general.

VII Bibliografía

1. AACC. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists Ninth Edition. 1995. St. Paul. Minnesota U.S.A
2. Abboud, A. M. and Hosene, R. C. Differential scanning calorimetry of sugar cookies and doughs. *Cereal Chemistry*.1984. 61:34
3. Abdulmola, N. A., Hember, M. W. N., Richardson, R K. and Morris, E. R 1996a. Application of polymer blending laws to starch- gelatin composites. *Carbohydrate Polymer* , 31:53-63
4. Abe, M., Miyasaka, S., and Arai, S Analyses of sulfhydryl groups in Zein. *Agric. Biol. Chem.* 1985. 49: 1415- 1420
5. Abecassis. J., Cakmakli, U. and Feillet, P La qualité culinaire des pâtes alimentaires I. Méthode objective d' appréciation de la consistance des produits cuit. *Bull E, F. M.* 1974.264-303
6. Aggour, Y.A. Chemical modification, cross-linking and characterization of some starch hydrogels. *Starch/Die Staerke*, 1993. 45, 55-59.
7. Aguilera, J. M., and Rojas. E. Rheological thermal and micro-structural properties of whey protein –cassava starch gels. *Food Sci.*1996, 61(5) : 962-966
8. Ainsworth, P., Fuller, D., Plunkett, A., İbanođlu, S. Influence of extrusion variables on the protein *in vitro* digestibility and protein solubility of extruded soy tarhana *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1999. 79 (5): 675-678.
9. Alloncle, M and Dublier, J. L Viscoelastic properties of maize starch / hydrocolloid pastes and gels. *Food Hydrocolloids*, 1991, 5; 455-467
10. Alonso, R Orúe, E Zabalza, M J Grant, G Marzo F Effect of extrusion cooking on structure and functional properties of pea and kidney bean proteins *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000, 80, (3): 397-403
11. Alvarez- Martínez. L., Kondury. K. P., Harper.J.M. A General Model for Expansion of Extruded Products. *Journal of Food Science*, 1988. Volume 53 N° 2 pp 609 – 615
12. Anderson, R .A. Water Absorption and Solubility and Amylograph Characteristic of Roll- Cooked Small Grain Products. *Cereal Chemistry*. 1982. 59(4) 265-269
13. Anderson, R .A., Conway, H. F., Pfeifer, V. F and Griffin Jr. Gelatinization of Corn Grits by Roll and Extrusion -Cooking. *Cereal Science Today* 1969,Vol.14 pp 4 - 5, 7 - 8, 11 - 12.
14. Anderson, R .A. Conway, H. F., Pfeifer. V. F. and Griffin. E. L. JR. Gelatinization of corn grits by roll-and extrusion- cooking *Cereal Sci. Today* 1969a,14: 4-7, 11,12
15. Antila, J. Extrusion cooking of wheat flour M. Sci (Eng) Thesis Helsinki Univ. of Technol. Finland,1979.
16. Arevalonino, K., Sandoval. C.F., Galan, L.J., Imam, S.H., Gordon, S.H. & Greene, R.V. Starch-based Extruded plastic films and evaluation of their biodegradable properties. *Biodegradation*, 1996.7, 231-237.
17. Arvanitoyannis, I., Psomiadov, E., Nakayama, A., Aiba, S. & Yamamoto, N. Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols. *Food Chemistry*, 1997, 60, 593-604.

18. Asp, N.G., Johansson, C. G., Hallmer, H., and Siljestrom, M. Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fibre. *J. Agric. Food Chem.* 1983, 31: 476 – 482.
19. Barrett, A.H., and Kaletunc, G. Quantitative description of fracturability changes in puffed corn extrudates affected by sorption of low levels of moisture. *Cereal Chem.* 1998, 75:695-698
20. Bean, M. M., and Yamazaki, W. T. Wheat starch gelatinization in sugar solutions. I. Sucrose: Microscopy and viscosity effects. *Cereal Chem.* 1978, 55: 936.
21. Bhattacharya, M., and Hanna, M. A. Influence of process and products variables on extrusion energy and pressure requirements, *J. Food Eng.* 1987a, 6:153.163.
22. Biliaderis. C. G., Maurice. T. J and Vose J. R. Starch Gelatinization Phenomena Studied by Differential Scanning Calorimetry *Journal of Food Science* Volume 1980, 45: 1669- 1674, 1680.
23. Biliaderis C G. Structures and Phase Transition of Starch in Food Systems. *Food Technology.* 1992, 46(6): 98-100, 102,104,106 108-109
24. Biliaderis C. G and Zawistowski, J. Viscoelastic Behavior of Aging Starch Gels: Effects of Concentration, Temperature, and Starch Hydrolysates on Network Properties *Cereal Chemistry* 1990. 67(3) 240-246
25. Biliaderis C.G., Page. C. M.; Maurice T. J. and Juliano B. O. Thermal Characterization of rice Starches: A Polymeric Approach to Phase Transition of Granular Starch *J. Agric. Food.Chem* 1986a, 34: 6-14.
26. Bindzus.W S. Livings J., Gloria-Hernandez H., G. Fayard, B. van Lengerich, F. Meuser. Glass Transition of Extruded Wheat, Corn and Rice Starch. *Starch-Starke* 2002. 54 (9): 393-400
27. Björck, I.; Asp, N. G. Birkhed, D. and Lundquist, I. Effect of processing on starch availability in vitro and in vivo: Extrusion cooking of wheat flour and starch. *J. Cereal Science* 1984. 2: 91-103.
28. Borwankar y Shoemaker, F. C. *Rheology of foods.* Elsevier Science Publisher, Ltd: Londres 1992.
29. BRADFORD. M. M. Un rápido y sensible método para la cuantificación de cantidades de microgramo de proteína usando el principio de enlaces coloreados. *Anal, Biochem* 1976, 72 pp 143 – 147
30. Buck, J.S., and Walker, C. E. Sugar and sucrose ester effects on maize and wheat starch gelatinization patterns by differential scanning calorimeter. *Starch/Staerke* 1988. 40:353.
31. Burgess, D. J. Practical analysis of complex coacervate system. *J. Colloid Interface Sci.* 1990, 140, 227
32. Burgess, D. J., Carless. J. E. Microelectrostatic studies of gelatine and Acacia for the prediction of complex coacervation. *J Colloid Interface Sci.* 1984. 98. 1.
33. Bystricky, S., Malavikova, A. & Sticzay, T. Interaction of alginates and pectins with cationic polypeptides. *Carbohydrate Polymers*, 1990. 13, 283-294.
34. Bystricky, S., Malavikova, A. & Sticzay, T. Interaction of acidic polysaccharides with polylysine enantiomers. Conformation probe in solution. *Carbohydrate Polymers*, 1991, 15, 299-308.

35. Calvo. C y Durán. L. Propiedades Físicas II, Ópticas y color Capitulo 7 en Temas selectos de alimentos Editado por José Miguel Aguilera Volumen I CYTED 1977 pp 261- 288.
36. Case et al. (1992)
37. Chandra, R. and Rustigi, R. Biodegradation of meleated linear low-density polyethylene and starch Blends. *Polymers Degradation and Stability*, 1997. 56, 185-202.
38. Chang, Y. K Hashimoto, J. M. Moura-Alcioli, R..Martínez-Bustos F Twin-screw extrusion of cassava starch and isolated soybean protein blends. *Nahrung / Food* 2001. 45 (4): 234-240.
39. Chang, Y. K., Silva, M. R., Gutkovski, L. C., Sevio, L., Da Silva. M. A. A. P: Development of extruded snack using Jotobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart) flour and cassava starch blends. *J. Sci. Food Agric.*1998, 78, 59-66
40. Chedid, L. L., Kokini, J. L: Influence of protein addition on rheological properties of amylose and amylopectin-based starches in excess water: *Cereal Chem.* 1992. 69 (5) 551-555.
41. Cheftel, J. C. Nutritional effects of extrusion cooking. *Food Chem.* 1986. 20: 263
42. Chiang. B. Y. and Johnson. J. A. Gelatinization of Starch in Extruded Products *Cereal Chem.* 1977b. 54(3):436- 443
43. Chinnaswamy. R., Hanna. M A. Macromolecular and Functional Properties of Native and Extrusion Cooked Corn Starch. *Cereal Chemistry* 1990. 67 (5) 490-499
44. Chinnaswamy. R., Hanna.M A. and Zobel. H F. Microstructural Physicochemical, and Macromolecular Changes in Extrusion – Cooked and Retrograded Corn Starch. *Cereal Food World.* Volume 1989. 34: 415-422
45. Colonia. P. Tayeb. J and Mercier. C. Extrusion Cooking of Starch and Starchy Products In *Extrusion Cooking* C, Mercier , P, Linko and J. Harper, eds American Association of Cereal Chemistry. St. Paul Minnesota 1989. p 247
46. Colonna, P., Doublier. J. L., Melcion. J. P., Monredon. F de and Mercier .C Extrusion Cooking and Drum Drying of Wheat Starch. I. Physical and Macromolecular Modifications., *Cereal Chemistry.* 1984. 61 (6): 538 - 543
47. Conway .H.F., Lancaster C. B and Bookwalter. G. N How extrusion-cooking varies products properties. *Food Eng.* 1968, 40:102
48. Conway. H. F Extrusion Cooking of Cereal and Soybeans – Part I *Food Products Development* April 1971, pp 27, 29, 31
49. Conway. H. F Extrusion Cooking of Cereal and Soybeans – Part II *Food Products Development.* 1971. pp 14,16, 18,22
50. Cooper, A. and Johnson, C.M. Differential Scanning Calorimetry, in “Methods in Molecular Biology, Vol 22: Microscopy, Optical Spectroscopy and Macroscopic Techniques” Ed C. Jones, B. Mulloy and A.H. Tomas (Humana Press, Totowa, N.J., 1994, pp 109 –124
51. Curá. J.A., Jansson, P.E. and Krisman, C.R. Amylose is not strictly linear. *Starch/ Staerke* 1995. 47: 207-209
52. D’ Egidio. M. G., De Stefanis, E., Fortin, S., Nardi, S., et Sgrulletta, D. Interaction entre l’ amidon et une fraction protéique extraite des semoules de T. durum, *Can. J. Plant Sci.* 1984. 64: 785-796

53. Dahle. L. K Wheat Protein – Starch Interaction I Some Starch- Binding Effects of Wheat- Flour Proteins Cereal Chemistry.1971, Vol 48 pp 706-714
54. Dahle. L. K, Montgomery. E.P and Brusco. V.W., Wheat Protein – Starch Interaction II Comparative Abilities of Wheat and Soy Proteins to Bind Starch Cereal Chemistry. 1975, Vol 52 pp 212-225.
55. Dalev, P.G. & Simeonova, L.S. Emulsifying prop-containing foodstuffs. Journal of Science, Food and Agriculture, 1995. 68, 203-206.
56. Davidson 1992
57. Davidson, V. J., Paton, D., Diosady, L.L., and Larocque. G Degradation of Wheat Starch in a Single Screw Extruder: Characteristic of Extruded Starch Polymer. Journal of Food Science Volume 49.1984. pp. 453 - 458.
58. Davidson, V. J., Paton, D., Diosady, L.L., and Rubin. L. J A Model for Mechanical Degradation of Wheat Starch in a Single Screw Extruder Journal of Food Science Volume.49 1984. pp 1154 - 1157.
59. Davis. E. A., Wheat Starch. Cereal Food World (1994) Volume 39 No 1 pp 34-36
60. de Kruif, C.G., Tuinier, R. Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*. 2001, 15, 555.
61. Dejewski, A., Mazurkiewicz, J., Tomasiak, p. and Zaleska, H. Electrochemical synthesis of polysaccharide-protein complexes. Part I. Preliminary studies on apple pectin-albumin complexes. *Starch/Die Staerke*, 1995. 47, 219-223.
62. Dickinson, E. Stability and Rheological Implications of Electrostatic Milk Protein- Polysaccharide Interactions. Trends in Food Science and Technology. 1998, 9: 347- 354
63. Ding, X., and Tang, J. studies on extrusion of corn starches I. Degradation of corn starches in a twin- screw extruder and characteristic of extruded starches. J. Waxi Inst. Light. Ind. 1990, 9 (3): 1-11.
64. Diosady. L. L., Paton. D., Rosen.N., Rubin. L. J. and Athanassoulis. C., Degradation of Wheat Starch in a Single - Screw Extruder: Mechano - Kinetic Breakdown of Cooked Starch. Journal of Food Science 1985, 50: pp 1697 - 1699, 1706
65. Diosady. L. L., Paton. D., Rosen.N., Rubin. L. J., Athanassoulis Degradation of Wheat Starch in a Single - Screw Extruder: Mechano - Kinetic Breakdown of Cooked Starch. Journal of Food Science 1985, Vol. 50 pp 1697 - 1699, 1706
66. Donovan. J. W. Phase de transition of the starch- water system. Biopolymers 1979, 18. 263-275
67. Doublier, J. L. Colona, P., Mercier, C. Extrusion cooking and drum drying wheat starch II. Rheological characterization of starch pastes. Cereal Chem. 1986, 63(3), 240-246.
68. Doublier, J.L., Gamier, C., Renard, D. Sanchez, C. Protein-polysaccharide interactions. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2000, 5, 202.
69. Dworschak. E. Nonenzyme browning and its effect on protein nutrition. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1980, 13 pp1- 40.
70. Ebeler, S. E. and Walker, C. E. Effects of various sucrose fatty acid ester emulsifiers on high-ratio white layers cakes. J. Food Sci. 1984, 49: 380.

71. Eidam, D. and Kulicke, W. M. Formation of maize starch gels selectively regulated by the addition of hydrocolloids. *Starch/ Stärke*, 1995, 47:378-384
72. Eliasson, A. C. Starch-lipid interactions studied by differential scanning calorimetry. *Thermochim. Acta* 1985, 95: 369.
73. Eliasson, A. C. On the effects of surface active agents on the gelatinization of starch – A calorimetric investigation. *Carbohydrate Polym.* 1986, 6: 463.
74. Eliasson, A. C. and Krog, N. Physical properties of amylose-monoglyceride complexes. *J. Cereal Sci.* 1985, 3: 239.
75. Evans, I. D. and Lips, A. Viscoelastic of gelatinized starch dispersions. *Journal of Texture Studies.* 1992, 23: 69-83
76. Evans, L. D., and Haisman, D. R. The effect of solutes on the gelatinization temperature range of potato starch. *Starch/Staerke* 1982,. 34: 224.
77. Faubion. J.M., Hosenev. R. C., High - Temperature Short - Time Extrusion Cooking of Wheat Starch and Flour I. Effect of Moisture and Flour Type on Extrudate Properties *Cereal Chemistry.* 1982, 59: 6 pp 529 - 533
78. Fennema O.R. Water and ice pages 23-67 in *Food Chemistry.* O.R Fennema. Ed,. Marcel Dekker New York .1985.
79. Fishman, M.L. & Coffin, D.R.. Mechanical micro-Structural and solubility properties of pectin/poly (vinyl Alcohol) blends. *Carbohydrate Polymers*, 1998, 35, 195-203
80. Flory P. J. *Principles of Polymer Chemistry*, Cornell University Press, Ithaca 1953.
81. Foegeding, E.A Thermally induced changes in muscle protein. *Food Technology* 1988, 42(6):58,60-62,64.
82. Freire, E., van Osdol, W. W., Mayorga. O.L y Sánchez Ruiz J.M. Calorimetrically determined dynamics of complex unfolding transitions in protein *Annu. Rev. Biophys, Biophys. Chem.* 1990, 19: 159-188.
83. French, D. Organization of starch granules. Pages 183-247 in: *Starch Chemistry and Technology.* R. L. Whistler, E. F. Paschall, and J. N. Bemiller, eds. Academic Press: New York 1984.
84. Ganz, A. J.Effect of sodium chloride on the pasting of wheat starch granule. *Cereal Chem.* 1965, 42:429
85. Ghiasi, K., Hosenev, R. C. and Varriano-Marston E, Gelatinization of Wheat Starch III. Comparison by Differential Scanning Calorimetry and Light Microscopy. *Cereal Chemistry* 1982, 59 (4) 258-262.
86. Ghiasi, K., Hosenev, R. C. and Varriano-Marston, E. Effects of flour components and dough ingredients on starch gelatinization. *Cereal Chemistry.* 1983, 60:58
87. Ghorpade, V.M. Bhatnagar, S. & Hanna, M.A. Structural characteristics of corn starches extruded with soy protein isolate or wheat gluten. *Plant Foods and Human Nutrition*, 1997, 51, 109-124.
88. Goel. P. K., Rekha. S. S, .Pushpa .R. K Studies on Interaction of Corn Starch whit Casein and Casein Hydrolysates. *Food Chemistry* 1999, 64 pp 383-389.
89. Golachowski, A. and Leszczynski, W. Properties of plastics made of polyethylene and chemically modified starch. *Zywnoaa, technologia, Jakoaa*, 1997, 4, 16-25.

90. Gomez. M. H. and Aguilera. J .M Changes in the Starch Fraction During Extrusion - cooking of Corn. *Journal of Food Science* 1983, 48: 378 - 381
91. Gomez. M. H. and Aguilera. J .M. A Physicochemical Model for Extrusion of Corn Starch., *Journal of Food Science* 1984, 49: pp 40 - 43, 63
92. Gropper, M. Moraru, C.I.; Kokini, J. L. Effect of specific mechanical energy on properties of extruded protein-starch mixtures. *Cereal Chemistry*. 2002, 79 (3): 429-433.
93. Gujska. E. and Khan. K. Functional Properties of Extrudates from High Starch Fractions of Navy and Pinto Beans and Corn Meal Blender whit Legume High Protein Fraction. *Journal of Food Science* 1991, 56: No 2, 431- 435
94. Harper, J. M Extrusion processing of starch In: *Developments in Carbohydrate Chemistry*. Edited by Richard J. Alexander and Henry F. Zobel 1992 pp 37-64.
95. Hauck. B. W., Process variables and their control for the production of expanded products by extrusion cooking. Paper presented at 66th AACC. Meeting 1981, (Chicago, Illinois, 15 –19 October)
96. Heertje. I. Structure and Function of food Products: a Review. *Food Structure* 1993, 12: pp.343-364
97. Hermansson, A.M.I., Protein/starch complex U.S., Patent 4,159,982,3 July 1979.
98. Horn, R. E. Extrusion cooking system Paper N° 77- 3522 Am .Soc. Agrc. Engineers. 1977, St. Joseph. MO.
99. Hoseney. R. C. Principles of Cereal Science and Technology. A.A.C.C. St. Paul Minnesota. USA. De la edición en lengua Española Ed. Acribia S.A. Zaragoza España. 1991.
100. Hsieh. F; Huff. H. E; Lue. S and Stringer. L Twin – Screw Extrusion of Sugar Beet and Corn Meal. *Lebensm. Wiss Technol*. 1991, 24 - 495
101. Hsieh. F; Peng, C. I., Huff, H. E. Effect of salt, sugar and speed on processing and products variables of corn meal extruded whit a twin- screw extruder. *J. Food Sci*. 1990, 55: (1), 224.227.
102. Imam, S.H., Gould, J.M., Gordon, S.H., Kinney, M.P., Ramsey, A.M. & Tosteson, T.R. Fate of starch-containing plastic films exposed in aquatic habitats. *Current Microbiology*, 1992, 25: 1-8.
103. Imberty, A., and Perez, S., A revisit to the three-dimensional structure of β -type starch Biopolymers 1988b, 27:1205-1221
104. Imeson A. P., Ledward. D. A and Mitchell. J. R. On the Nature of the Interaction Between some Anionic Polysaccharides and Proteins. *J. Sci. Fd. Agric*. 1977, 28: 661-668
- 105.** International Starch Institute. Science Park Aarhus. Denmark. www.starch.dk/isi/stat/index.htm 1997.
106. Islam, A. M., Phillips, G. O., Slijivo, A. , Snowden, M. J., Williams , P. A. A review of recent development on the regulatory, structural and functional aspect aspect of gum Arabic. *Food Hydrocolloids*. **1997**, II. 493
107. Jane, J., Lin, S., Paetav, I., Spence, K. & Wand, S. Biodegradable plastics made from agricultural polymers. *ACS Symposium Series*, 1994, 575: 92-100.
108. Jin. Z, Hsieh. F. and Huff. H. E., Extrusion Cooking of Corn Meal whit Soy Fiber, Salt and Sugar. *Cereal Chemistry*.1994, 71(3):227-234

109. Johnson, J. A and Linko, Y. Y Analysis of bread flavor constituents. *Qualitas Plantarum Materiae Vegetabiles*. 1964, 11:256-268
110. Johnson, J. M., Davis, E. A., and Gordon, J. Interactions of starch and sugar water measured by electron spin resonance and differential scanning calorimetry. *Cereal Chem.* 1990, 67: 286.
111. Kaibara, K., Okazaki, T., Bohidar, H. B., Dubin, p. L. pH-induced coacervation in complexes of bovine serum albumin and cationic polyelectrolytes. *Biomacromoleculares*. 2000, 1. 100
112. Kalab, M.;Emmos, D. B. and Sargant, A. G. Milk gel structure IV. Microstructure of yogurts in relation to the presence of thickening agents. *J. Dairy Res.* 1975, 42: 453.
113. Kaletunc, G., and Breslauer, K. J., Construction of a water-flour state diagram: Application to extrusion processing. *J. Ther. Anal* 1996, 47: 1267-1288
114. Kaletunc, G., and Breslauer, K. J., Glass transition of extrudates: Relationship whit processing induced fragmentation and end-products attributes. *Cereal Chem* 1993, 70: 548-552
115. Kim C.S. and Walker. C. E Effects of Sugars and Emulsifiers on Starch Gelatinization Evaluated by Differential Scanning Calorimetry *Cereal Chem.* 1992, 69 (2): 212-217
116. Kim.J. C. and Rottier. Modification of Aestivum Wheat Semolina by Extrusion *Cereal Foods World* 1980, 24: 2 pp 62- 67
117. Kinsella., J. E Texturized proteins :Fabrication, flavoring and nutrition. *CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1978, 10: 147-207
118. Koh, G. L ., Toker, I. G. Characterisation of sodium carboxymethylcellulose - gelatine complex coacervation by viscosity. Turbidity and coacervate wet weight and volume measured *J. Pharmacy and Pharmacol* 1988a, 40:233
119. Koh, G. L ., Toker, I. G. Characterisation of sodium carboxymethylcellulose-gelatine complex coacervation by chemical analysis of the coacervate and equilibrium fluid phases. *J. Pharmacy and Pharmacol*, 1988b, 40:309
120. Konstance, R. P., Onwulata, C. I., Smith, P. W., Lu, D., Tunick, M.H., Strange, E. D., and Holsinger, V. H. Nutrient-based corn and soy products by twin-screw extrusion. *J. of Food Sci.* 1998, 63 (5): 864-868.
121. Korolezuk, J., Breton-Dollet, V., Tissier, J. P., and Maingon-nat, J.F. Rheological properties and microstructure of maize starch/milk protein gels. *Zywnoaa, Technologia, Jakoaeae*, 1996, 2: 67-74.
122. Krog, N. Amylose complexing effect on food grade emulsifiers. *Starch/ Staerke* 1971, 23: 206.
123. Krog, N. Functions of emulsifiers in food systems. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1977, 54: 124.
124. Lai. L. S and Kokini. J. L. Physicochemical Changes and Rheological Properties of Starch during Extrusion *Biotechnol. Prog.* 1991, 7: 251-266
125. Larsson, K. Inhibition of starch gelatinization by amylose-lipid complex formation. *Starch/Staerke* 1980, 32:125.
126. Lee, B., Pometto, A.L. III, Fratzke, A. & Bailey, T.B. Jr Biodegradation of biodegradable plastics polyethylene by *Phanerochaete and Streptomyces Species*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57, 678-685.

127. Leloup, V.M., Colonna, P. & Buleon, A. Influence of amylose-amylopectin ratio on gel properties. *Journal of Cereal Science*, 1991, 13, 1-13..
128. Lindahl. L and Eliasson. A. C Effects of Wheat Protein on the Viscoelastic Properties of Starch Gel *J. Sci. Food Agric.* 1986, 37, 1125 -1132
129. Linko. P Twin Screw Extrusion as Bioreactor for Starch Processing. Pp 335 - 344 in: *Food Extrusion Science and Technology*. J.L. Kokini., C.T. Hao and M.V. Karwe. 1992. Ed. Marcel Dekker., NY..
130. Linko. P., Colonna. P., Mercier. C. High – Temperature., Short - Time Extrusion Cooking Chapter 4 in *Advances in Cereal Science and Technology*. Vol. IV. Y. Pomerans. 1981, Ed. Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul .Mn.
131. Linko. P., Colonna. P., Mercier. C. HTST extrusion of cereal based materials, in *Advanced in Cereal Science and Technology*. Ed by Pomeranz Y. Published by American Association of Cereal Chemists. 1981, St Paul Minnesota pp 145-235.
132. Lorenz. R., Welsh. J., Norman. R ., Beetner. G., and Frey. A Extrusion processing of triticale. *J. Food Sci.* 1974, 39 pp 572 - 576
133. Luallen, T. E. Starch as a functional ingredient. *Food Technology*. January, 1985.
134. Lund, D.B. *Physical properties of food* 1983. AVI Publishing
135. Marsh, R. A., and Waight, S. G. The effect of pH on the zeta potential of wheat and potato starch. *Starch / Stärke* 1982, 34: 149
136. Marshall.W E; and Chrastil. J. Interaction of Food Proteins with Starch. Chapter.3 pp 75 – 97 *Biochemistry of food proteins.*, Elsevier Applied Science. Edited by B.J.F. Hudson. 1992, Elsevier Science Publishers. Ltd. England.
137. Martínez-Serna, M. D., and Villota, R. Reactivity, functionality, and extrusion performance of native and chemical modified whey protein. Page 387 in: *Food Extrusion Science and Technology*. J. L. Kokini, C. T. Ho, and M. V. Karwe. Eds. Mercel Deker 1992. New York
138. Mason. W.R and Hosney R. C Factors Affecting the Viscosity of Extrusion–Cooked Wheat Starch. *Cereal Chemistry* 1986, 63 (5) 436-441
139. Mattison, K. W., Brittain, L.J., Dubin, P. L. Micro and macro-phase behavior in protein-polyelectrolyte systems. *Macromol. Symp.* 1999, 140, 53
140. Matz, S, A., *The Chemistry and Technology of Cereals as Food and Feed*, 2nd Edition. Van Nostrand Reinhold ,. New York 1991.
141. Medeka, H., kokini, J. L: effect of addition of zein and gliadin on the rheological properties of amylopectin starch whit low-to-intermediate moisture. *Cereal Chem.* 1992, 69(5), 489-494
142. Méndez. M. M G del C., Núñez. S. M del C y Solorza. F J. *Introducción a la Reología* Ed. Instituto Politécnico Nacional México. Primera Edición 2001.
143. Mercier C. Comparative modifications of starch and starchy products by extrusion-cooking and drum-drying. Pages 120 – 130 in: *Pasta and Extrusion Cooked Foods. Some technology Aspects*. C. Mercier and C. Cantarelli. eds. Elsevier Applied Science Publ., 1986 London.
144. Mercier, C ., Charbonniere , R., Grebaut , J and de la Guériviere, J. F. Formation of amylose-lipid complexes by twin- screw extrusion cooking of manioc starch, *Cereal Chem.* 1980, 57:4
145. Mercier, J. C., Brignon, G., Ribadeau-Dumas, B. Structure primaire de la caséine κ , β bovine, Séquence complete, *Eur. J. Biochem.* 1973, 35: 222-235

146. Mercier. C and Feillet. P. Modification of Carbohydrate Components by Extrusion - Cooking of Cereal Products. *Cereal Chem.* 1975, 52: pp 283 - 297
147. Meuser. F., van Lengerich. B, Pfaller. W. and Harmuth-Hoene, A. E. The Influence of HTST Extrusion Cooking on the Protein Nutritional Value of Cereal Based Products. *Extrusion Technology for the Food Industry* ed. Colonna. Elsevier Applied Science. London 1987, pp 35 - 53
148. Mitchell, J. R., and Areas, J. A. G Structural changes in biopolymers during extrusion. Pages 345-360. in: *Food Extrusion Science and Technology*. J. L Kokini, C T. Ho, and M. V. Karwe, eds. Marcel Dekker 1991, New York.
149. Moore, W. E. and Carter, J. L., Protein - Carbohydrate Interactions at Elevated Temperatures. *J. Text. Stud.* 1974, 5 pp 77-88.
150. Morcillo. R J *Espectroscopia infrarroja Serie de Química Monografía no. 12* Organización de los Estados Americanos. Washington D. C. 1974.
151. Morr. C. V. Production and Use of Milk Proteins in Food. *Food Technology* 1984, pp 39-48
152. Morrison, W. R., Lipids in cereal starch: A review. *J. Cereal Sci.* 1988, 8:1-15 .
153. Muhrbeck, P., Eliasson, A.C: Rheological Properties of protein /starch mixes gels. *J. Texture Stud.*1991, 22, 317-332
154. Neuman, P. E., Jasberg, B. K., Wall, J. S., and Walker, C. E. Uniquely textured products obtained by co-extrusion of corn gluten meal and soy flour. *Cereal Chem.* 1984, 61: 438-445.
155. Oosten, B. J. Interactions Between Starch and Electrolytes. *Starch / Starke* 42 1990, Nr, 9, S, 327-330
156. Orford et al. (1993)
157. Otaigbe, J.U. & Jane, J. Pressure-volume-temperature relationship of soy protein isolate/starch plastics. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 1997, 5, 75-82.
158. Owusu-Ansah. J., van de Voort. F. R and Stanley. D W. Determination of starch gelatinization by x-ray diffractometry *Cereal Chemistry* 1982, 59:167.
159. Owusu-Ansah. J., van de Voort. F. R and Stanley. D W. Effect of extrusion variables on products moisture and extrusion crystallinity of corn starch. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 1982, 15:257
160. Owusu-Ansah. J., van de Voort. F. R and Stanley. D W. Physicochemical Changes in Corn starch as a Function of Extrusion Variables *Cereal Chemistry* 1983, 60:319
161. Paton. D. and Spratt. W. A. Component Interactions in the Extrusion Cooking Process I. Processing of Chorinated and Untreated Soft Wheat Flour *Cereal Chemistry* 1978, 55(6):973-980
162. Paton. D. and Spratt. W. A. Component Interactions in the Extrusion Cooking Process Influence of Process Conditions on the Functional Viscosity of the Wheat Fluor System *Journal of Food Science* 1984, 49: pp 1380- 1385
163. Paton. D. and Spratt. W. A. Simulated Approach to the Estimation of Degree of Cooking of an Extruded Cereal Product. *Cereal Chemistry* 1981, 58(3): 216-220
164. Politz, M. L., Timpa, J. D., White, A. R., and Wasserman, B. P. Non-aqueous gel permeation chromatography of wheat starch in dimethyl-acetamide (DMAC) and LiCl: Extrusion- induced fragmentation. *Carbohydrate Polymer*

- 1994, 24:91-99
165. Pommet, M., Redl, A., Morel, M. E., Domenek, S., Guilbert, S. Thermoplastic processing of protein based bioplastics: chemical engineering aspects of mixing, extrusion and hot molding. *Macromolecular Symposia* 2003, 127 (1): 207-218.
 166. Pradeep. K.G., Rekha. S. S., Pushpa. R. K Studies on Interactions of Corn Starch with Casein and Casein Hydrolysates. *Food Chemistry*. 1999, 64 pp 383 – 389
 167. Prestige Proteins 2003 [www.casein.com / products.htm](http://www.casein.com/products.htm)
 168. Riisom, T., Krog, N., and Eriksen, J.. Amylose complexing capacities of their functionality in bread. *J. Cereal Sci.* 1984, 2:105.
 169. Robin, J.P., Mercier, C., Charbonniere, R., and Guilbot , A. Lintnerized starches Gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. *Cereal Chem.* 1974, 51: 389-405
 170. Rossen, J. L and Miller, R. C Food extrusion. *Food Technol.* 1973, 27: 46-53
 171. Russell, P. L Gelatinization of starches of different amylose / amylopectin content. A study by differential scanning calorimetry. *J. Cereal Sci.* 1987, 6:133
 172. Sanchez Ruiz, J.M. *Subcellular Biochemistry*, vol 24 Proteins. Structure Function and Engineering (Biswas, B.B. and Roy, S., Eds) 1995, pp 133 – 176 Plenum Press, New York.
 173. Sanchez, C., Paquin, P. S. Protein and protein-polysaccharide Microparticles. *In Food Proteins and their applications*, Damoran, S. Paraf, A., Eds., Marcel Dekker. New York, 1997, chapter 17.
 174. SAS, Statistical Analysis System. TS020 software Release 6.12, SAS Institute Inc., Cary, NC. 1996.
 175. Schmitt, C., Sanchez. C., Desobry-Banon, S., and Hardy, J. Structure and technofunctional properties of protein . polysaccharide complexes. A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1998, 38(8), 689.
 176. Schweizer, T. F., and Reimann, S. Influence of drum- drying and twin-screw extrusion cooking on wheat carbohydrates. I. A comparison between wheat starch and flour of different extractions, *J. Cereal Sci.* 1986, 4:193-203
 177. Scow C. C. and Teo C. H. *Starch/Starke*, 45 (1993) 345.
 178. Seiller, K., Weipert, D. and Seibel, W Viscosity behavior of ground extrusion products in relation to different parameters. pp 808-820 in *Food Process Engineering. Vol I Food Processing System*. P Linko, Y. Mälkki, J. Olkku and J. Larinkari , eds. Applied Science Publishers: London 1980a.
 179. Seiller, K., Weipert, D. and Seibel, W Viskositätsverhalten vermahlener Extrudate in Abhängigkeit von verschiedenen Paranetern . *Z. Lebensm.Technol. Verfahrenstechnik.* 1980b, 31(2):37-42
 180. Segalen (1980)
 181. Shogren, R.L., Fanta, G.F. & Doane, W.M. Development of starch based plastics. A reexamination of selected polymer systems in historical perspective. *Starch/Die Staerke*, 1993, 45, 276-282.
 182. Slade, L. and Levine, H Glass transitions and water – food structure interactions. *Adv Food Nutr. Res.* 1995, 38
 183. Slade, L., and Levine, H and Finley, J. W. Protein – water interaction. Water as a plasticizer of gluten and other protein polymers. In *protein Quality and the*

- effect of processing ed, D, Phillips and J. W. Finlay. Merce Dekker New York 1988, pp 9-124.
184. Slade, L., and Levine, H.. Recent advance in starch retrogradation. Pages 387-430 in: Recent developments in industrial polysaccharides. S. S. Stivala, V. Crescenzi, and I. C. M. Dea, eds. Gordon and Breach Science Pubs.: New York. 1987b.
 185. Snoeren. THM., Both. .P., Schmidt. DG An Electron Microscopic Study of Carragenan and its Interaction whit κ - Casein. Neth. Milk Dairy J. 1976, 30, 132 - 141
 186. Spies. R. D. and Hosenev. R. C. Effect of sugars on starch gelatinization. Cereal Chemistry 1982, 59(2) 128-131.
 187. Steffe, J. F. Rhological Methods in Food Process Engineering. Freeman Press: 1992. East Lancing.
 188. Takeuchi, I., Interaction between Protein and Starch. Cereal Chem. 1969, 46: pp 570 - 579
 189. Tang, J. Studies on extrusion of corn starch. Physicochemical changes of corn starch during extrusion and application in preparation of α maltose. Ph. D. Thesis. Wuxi Institute of Light Industry. P. R. China 1991.
 190. Tang. J and Ding. X., Relationship Between Functional Properties and Molecular Modification of Extruded Corn Starch Cereal Chem. 1994, 71(4) pp 364 - 369
 191. Tecante. A and Doublier. J. L. Steady flow and viscoelastic behavior of cross linked waxy corn starch – k – carrageenan pastes and gels. Carbohydrate polymers 1999, 40:221-231
 192. Thomas. J.D y Atwell W.A., "Starches" by the American Association of Cereal Chemistry. St Paul, Minnesota USA 1999.
 193. Tolstoguzov, V.B. Structure-property relationships in foods. In Macromolecular interactions in food technology, Parris, N., Kato, A., Creamer, L.K., Pierce, J., Eds., ACS Symposium Series 650, American Chemical Society: Washington DC. 1996; pp 2-14.
 - 194.** Tomasik, P., and Schilling, C. H. Complexes of starch whit organic guests. In Advanced Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. 1998, 53: pp 345 427
 195. van de Voort. F. R., Staley D. W. and Edamura. R., Improved Utilization of Dairy Proteins Coextrusion of Casein and Wheat Flour. J. Dairy Sci 1984, 67:749-758
 196. Van Lengerich, B. Influence of extrusion processing on in-line rheological behavior structure and function of wheat starch. In: Dough Rheology and Baked Product Texture. Faridi,H., Faubion, J. M., Eds. Van Nostrand Reinhold. New York 1990; pp 421-471
 197. Van Soest, J.J.G., Hulleman, S.H.D., Dewit, D. & Viegenthart, J. F.G. Crystallinity in starch bioplastics. *Industrial Crops and Products*, 1996, 5, 11-22.
 198. Van Zuilichem, D. J., Lamers, G., and Stolp, W. Influence of process variables on quality of extruded maize grits. Proc. Eur. Symp. Engineering and Food Quality 1975, 6th Cambridge, UK.
 199. Van Zuilichem, D. J., Stolp, W., and Conzales, R. J. Future tends and limitations in food extrusion. Paper presented at the Symposium "Cooking Extrusion" Sept. 27-29. Zentralfachschule der Deutschen Süswarenwirtschaft, Solingen 1978.

200. Vega. M y Bontoux. L Aplicaciones Alimenticias de las Nuevas Tecnologías en Polisacáridos. Número Especial de IPTS Report (Institute for Prospective Technological Studies 2000, Vol 20
201. Veisseyre, R Technologie du laté (Lactologia Técnica) Cap. 1 Caracteres, Composición y estructura de la leche Paginas 11- 31 ed. Acribia Zaragoza España, 1988.
202. Waigh. T. A., Gidley. M. J., Komanshek. B U and Donald. A. M. The Phase Transformation in Starch During Gelatinisation: A Liquid Crystalline Approach. Carbohydrate Research 2000, 328: 165-176.
203. Wang, S. S., Chiang, W. C., Zheng, X., Zhao, B., Yeh, A. L., and Cho, M. H., Application of an energy equivalent concept to study the kinetics of starch conversion during extrusion. Page 165. in: Food Extrusion Science and Technology., J. L. Kokini, ed. CHIPS Books. Kingwood, TX 1992.
204. Wang, Y Rakotonirainy, A. M.. Padua G. W Thermal Behavior of Zein-based Biodegradable Films. Starch-Starke 2003, 55 (1): 25-29
- 205.** Weinbreck. F., Vries. R de., Schrooyen. P and Krulf .C.G. Complex Coacervation of Whey Protein and Gum Arabic. Biomacromolecules 2002, 4(2) 293-303.
206. Wen, L.-F. Rodis, P. and Wasserman, B. P. Starch Fragmentation and Protein Insolubilization During Twin-Screw Extrusion of Corn Meal. Cereal Chemistry 1990, 67(3):268-275
207. Whittam, M.A., Noel, T. R and Ring, S. G. Melting and glass/rubber transitions of starch polysaccharides. Chpt 22 In Food Polymers, Gels and Colloids. ed. E. Dickinson. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, 1991 pp 277-288
208. Wootton, M. and Bamunuarachchi, A. Application of Differential Scanning Calorimetry to Starch Gelatinization. II. Effect of Heating Rate and Moisture Level. Starch/Starke 1979, 31: 262-264
209. Wu, H-C.,H., and Sarko, A., The double-helical molecular structure of crystalline β -amylose. Carbohydr. Res. 1978a, 61:7
210. Wu, H-C.,H., and Sarko, A., The double-helical molecular structure of crystalline α -amylose Carbohydr. Res. 1978b, 61:27
211. Wunderlich B. Thermal Analysis, Academic Press, Boston p. 450.
212. Yannas, I. V. 1972 Collagen and gelatin. In the solid state. J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 1990, C7 (1):49-104
213. Yu. L and Chistie. G. Measurement of Starch Thermal Transition using Differential Scanning Calorimetry Carbohydrate Polymers 2001, 46: 179-184.
214. Zaleska, H., Mazurkiewicz, J., Tomasik, P. & Baczkowicz, M. Electrochemical synthesis of polysaccharide-Protein complexes. Part. II. Apple-pectin casein complexes. *Die Nahrung*, 1999, 43: 278-293.
215. Zaleska, H., Ring, S. & Tomasik, P. Apple pectin complexes with whey protein isolate. Food Hydrocolloids, 2000, 14: 377-382
216. Zaleska. H., Ring. S., Tomasik. P. Electrosynthesis of Potato Starch - Casein Complexes. International Journal of Food Science and Technology. 2001,.36. 509 - 515
217. Zbikowska, A., Dziuba, J. & Szerszunowics, I. Effect of mineral salts on molecular state and solubility of sodium coprecipitate of milk protein. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, 1998, 7/2, 241-250

218. Zhang. W. and Hosney. R.C Factors Affecting Expansion of Corn Meals with Poor and Good Expansion Properties. *Cereal Chem.* 1998, 75(5):639-643
219. Zobel, H. F. Gelatinization of starch and mechanical properties of starch pastes In: *Starch Chemistry and Technology*. Eds: Whistler, R .L., Berniller, J. N ., Paschall, E. F., Academic Press, London , 2nd edn. 1984, pp 285-309
220. Zobel, H. F. Molecules to granules a comprehensive starch review. *Starch / Stärke*. 1988, 40: 44-50

Anexo 1

Tabla 1- Características de la amilosa y amilopectina

Característica	Amilosa	Amilopectina
Forma	Esencialmente lineal	Ramificada
Uniones glucosídicas	α -1,4	α -1,4 y α -1,6
Peso molecular	Menor a 500,000	50 a 500 millones
Formación de películas	Resistentes	Frágiles
Formación de gel	Firmes	Suaves
Color con yodo	Azul	Rojo – café

Fuente: Starches (Thomas y Atwell 1999)

Tabla 2- Aproximaciones de tamaños y formas de gránulos de almidón

Material	Maíz	Trigo	Arroz	Papa	Yuca
Fuente	cereal	Cereal	Cereal	tubérculo	Raíz
Diámetro en micras	5 a 30	1 a 45	1 a 3	5 a 100	4 a 35
Formas	Poligonal redondeado	Lenticular redondeado	Poligonal esférico	Oval esférico	Barrilete

Fuente: Starches (Thomas y Atwell 1999)

Tabla 5. Condiciones de ejecución de las corridas de extrusión

Muestra	% Humedad	Caseína gr..	Ca(OH) ₂ gr.	Agua mL
01	21	2588.12	47.77	372.15
02	21	784.020	14.47	372.15
03	29	2879.74	53.16	752.11
04	29	872.360	16.40	752.11
05	21	2588.12	47.77	372.15
06	21	784.020	14.47	372.15
07	29	2879.74	53.16	752.11
08	29	872.36	16.10	752.11
09	25	1776.00	32.78	552
10	31.72	1950.50	36.00	901
11	25	177.600	3.278	552
12	25	177.600	32.78	552
13	18.27	1629.75	30.08	259.5
14	25	3374.40	62.29	552
15	25	1776.00	32.78	552
16	31.72	1950.50	36.00	901
17	25	177.600	3.278	552
18	25	1776.00	32.78	552
19	18.27	1629.75	30.08	259.5
20	25	3374.4	62.29	552
21	25	1776.00	32.78	552
22	25	1776.00	32.78	552
23	25	1776.00	32.78	552

24	25	1776.00	32.78	552
25	25	1776.00	32.78	552

Tabla 11 Porcentaje de humedad y actividad de agua (a_w) de extrudidos

Muestra	%Humedad	a_w
01	11.755	0.371
02	11.331	0.383
03	12.513	0.397
04	12.521	0.353
05	10.977	0.386
06	10.234	0.364
07	11.705	0.374
08	11.798	0.37
09	12.868	0.395
10	11.913	0.384
11	11.489	0.379
12	11.630	0.395
13	9.635	0.361
14	10.432	0.382
15	12.644	0.405
16	11.917	0.385
17	10.880	0.366
18	11.402	0.39
129	9.909	0.364
20	10.833	0.379
21	11.423	0.379
22	11.245	0.35
23	11.051	0.38
24	11.162	0.372
25	11.107	0.407

Tabla 12 Lista de colorantes y muestras seleccionadas para observación en microscopio electrónico láser confocal.

Muestra	Colorante	Proporción a / c	Peso de muestra
21	Safranina	50/50	1 gramo
21	Rodinila "blue"	50/50	1 gramo
21	Lisamina	50/50	1 gramo
21	Acridina	50/50	1 gramo
21	Fluoreceina	50/50	1 gramo
21	Acido fusinico	50/50	1 gramo
14	Safranina	05/95	1 gramo
14	Rodinila "blue"	05/95	1 gramo
14	Lisamina	05/95	1 gramo
14	Acridina	05/95	1 gramo
14	Fluoreceina	05/95	1 gramo
14	Acido fusinico	95/05	1 gramo
17	Safranina	95/05	1 gramo
17	Rodinila "blue"	95/05	1 gramo
17	Lisamina	95/05	1 gramo
17	Acridina	95/05	1 gramo
17	Fluoreceina	95/05	1 gramo
17	Acido fusinico	95/05	1 gramo
Almidón 100%	Safranina	100/0	1 gramo
Almidón 100%	Rodinila "blue"	100/0	1 gramo
Almidón 100%	Lisamina	100/0	1 gramo
Almidón 100%	Acridina	100/0	1 gramo
Almidón 100%	Fluoreceina	100/0	1 gramo
Almidón 100%	Acido fusinico	100/0	1 gramo
Caseína 100%	Safranina	0/100	1 gramo
Caseína 100%	Rodinila "blue"	0/100	1 gramo
Caseína 100%	Lisamina	0/100	1 gramo
Caseína 100%	Acridina	0/100	1 gramo
Caseína 100%	Fluoreceina	0/100	1 gramo
Caseína 100%	Ácido fusinico	0/100	1 gramo