(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 488 465**

(51) Int. Cl.:

A23J 3/22 (2006.01)
A23J 3/14 (2006.01)
A23L 1/325 (2006.01)
A23L 1/317 (2006.01)
A23L 1/314 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2007 E 07834616 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014 EP 2083637**

(54) Título: **Material alimenticio fibroso**

(30) Prioridad:

03.10.2006 EP 06076818
18.10.2006 EP 06076895
09.02.2007 EP 07102099

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.08.2014

(73) Titular/es:

FRIESLAND BRANDS B.V. (100.0%)
Stationsplein 4
3818 LE Amersfoort, NL

(72) Inventor/es:

MANSKI, JULITA MARIA;
VAN DER ZALM, ELIZABETH EGBERDINA JOHANNA;
BOOM, REMKO MARCEL;
VAN DER GOOT, ATZE JAN;
NIEUWENHUIJSE, JOHANNES ANDRIES y
PAQUES, MARCEL

(74) Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 488 465 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Material alimenticio fibroso.

La invención se refiere a materiales fibrosos, y especialmente a materiales alimenticios fibrosos, a procesos para la producción de estos, y al uso de dichos materiales fibrosos. En un aspecto importante, la presente invención tiene como objetivo proporcionar productos de reemplazo de carne o pescado a partir de fuentes proteicas alternativas. En otro aspecto, se usan partículas fibrosas sueltas como un ingrediente que tiene varios usos de aplicación.

En las últimas décadas, la formación de texturas de alimentos fibrosos ha recibido mucho interés por parte de la industria, así como de los científicos en alimentos. Un desafío particularmente importante fue la sustitución de productos cárnicos por productos procedentes de fuentes proteicas alternativas. Generalmente, esto implica la creación de propiedades estructurales y sensoriales similares a la carne con materiales basados en proteínas no cárnicas; es decir, a partir de fuentes basadas en proteínas no cárnicas se intentó lograr estructuras anisotrópicas en diversas escalas de longitud y en diversos regímenes de concentración.

La investigación llevada a cabo sobre materiales proteicos fibrosos a grandes rasgos puede dividirse en el auto-ensamblaje de las proteínas en fibrillas, y el ensamblaje forzado de proteínas en texturas fibrosas.

El auto-ensamblaje fibrilar de diversas proteínas, tales como las proteínas β-lactoglobulina, ovoalbúmina y albúmina sérica bovina, se ha logrado en regímenes diluidos y semi-diluidos bajo severas condiciones de pH y temperatura (ver, por ejemplo Veerman y otros, J. Rheol. 49(2) (2005) 355-368). Las fibrillas producidas estaban en el orden de nm de espesor y µm de longitud.

Se publicó un caso especial de auto-ensamblaje para la formación de fibrillas amiloideas de κ-caseína (Thorn y otros, Biochemistry 44(51) (2005) 17027).

En contraste con el auto-ensamblaje, el ensamblaje forzado de soluciones proteicas en un régimen más concentrado (> 10% p/p de proteína) se ha abordado tradicionalmente mediante el uso de técnicas de extrusión o de hilatura, aunque se describen además otras técnicas.

La cocción por extrusión se ha usado para texturizar proteínas a partir de diversas fuentes, tales como harinas de soya, trigo, y proteínas lácteas. La plastificación, fusión y desintegración de proteínas ocurren en el barril extrusor y las texturas fibrosas pueden formarse debido a la alineación de las proteínas en troqueles largos de enfriamiento. En este sentido ver *por ejemplo,* Aguilera & Stanley, Food Rev. Int. 9(4) (1993) 527-550; y Cheftel y otros, Food Rev. Int. 8(2) (1992) 235-275.

En estas modalidades, el valor de la relación de la resistencia longitudinal y transversal al estiramiento es - de acuerdo con Thiebaud y otros (Food Science And Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie 29(5-6) (1996) 526-535) - indicativo de la calidad de la fibra. Los valores típicos de la relación de la resistencia longitudinal y transversal al estiramiento son, por ejemplo, 1-5 para extruidos fibrosos a partir de harina de soya desgrasada, en dependencia de la temperatura y el pH del barril (Cheftel *y otros, antes mencionado*); y 1-2 para materiales extruidos de harina de soya desgrasada y cerdo como se determina al cortar (Liu y otros, Food Sc. Techn. Int. 11(6) (2005) 463-470).

Los estudios referidos en los dos párrafos anteriores muestran que se necesitan mezclas de fuentes animal y vegetal para obtener un grado aceptable de fibrosidad.

Tolstoguzov (en: J.A.O.C.S., 70(4) (1993) 417-424) subrayó que se requieren biopolímeros incompatibles para formar estructuras anisotrópicas durante la extrusión.

En US-A-4,118,520, se preparan fibras proteicas, que contienen caseína y al menos una proteína termoendurecible, mediante hilatura en seco de una mezcla acuosa de proteínas que contiene iones calcio y fosfato a una temperatura por debajo del punto de gelificación de la mezcla de proteínas, seguido por secado de las fibras obtenidas.

US-A-2,830,902 y su continuación en parte US-A-2,879,163 describen que una suspensión de materia prima rica en proteínas se coagula bajo la influencia de calor para formar un gel de proteínas, el gel se conforma por extrusión mediante el uso de una prensa de macarrones.

Generalmente, las técnicas de extrusión tienen un número de deficiencias, tales como el uso de altas temperaturas para la desnaturalización de proteínas, que induce reacciones químicas no controlables; y el uso de altas fuerzas de cizalladura durante la extrusión, que pueden conducir a la desintegración de elementos estructurales (ver, *por ejemplo,* Peighambardoust y otros, J. Cereal Sc. 43 (2006) 183-197), incluso a un nivel molecular (ver Van den Einde y otros, Polymer Degradation And Stability, 85(1) (2004) 589-594). Aún más, en extrusores, al igual que en

muchos otros dispositivos de mezcla o amasado, se obtienen efectos diferentes de los procesos físicos y/o químicos en dependencia de la posición en el aparato.

A fin de obtener productos fibrosos bien definidos, es evidente que debe haber una interacción sutil entre la desintegración y la inducción de textura en los elementos estructurales.La presente invención tiene como objetivo proporcionar un proceso que permita obtener productos fibrosos bien definidos.

Aún más, los productos preparados mediante cocción con extrusión generalmente se calientan a temperaturas por encima de 100°C. Tales productos pueden calentarse, pero no pueden procesarse en la cocina mediante el uso de técnicas como hornear y freír, lo que conduciría a efectos obtenidos también con pescado y carne.

La otra técnica mencionada anteriormente en la presente, *a saber* hilatura de biopolímeros, se basa en la alineación de macromoléculas debido a la cizalladura y al flujo de alargamiento en una tobera de hilatura y durante la coagulación (ver, *por ejemplo,* Gallant y otros, Food Microstructure 3 (1984) 175-183). Típicamente, las fibras resultantes (~100 µm) se coagulan en baños que contienen soluciones de ácido y sal, y luego se lavan. Hidrocoloides, tales como carragenina (Downey & Burgess, J. Food Techn. 14(1) (1979) 21-31; Downey & Burgess, J. Food Techn. 14(1) (1979) 33-40) y alginato (Antonov y otros, Die Nahrung 29(1) (1985) 39; Suchkov y otros, Nahrung-Food 24(9) (1980) 893-897), o proteínas vegetales, tales como proteínas de soya (Suchkov y otros, Nahrung-Food 32(7) (1988) 669-678) o del frijol del campo (Suchkov y otros, Nahrung-Food 32(7) (1988) 679-689), se usaron en combinación con caseína en una mezcla de dos fases para disminuir la solubilidad en agua de las fibras producidas a base de caseína.

US-A-2,682,466 describe fibras proteicas comestibles fabricadas por un proceso de hilatura en húmedo. Una materia prima rica en proteínas se disuelve en un medio alcalino, y subsecuentemente se extrude en la forma de chorros finos dentro de un baño acídico de sal en que las fibras se coagulan.

Las desventajas de este método de hilatura siguen siendo las grandes corrientes de residuos de agua a partir de los baños de coagulación y lavado. Más aún, las necesidades de bajo pH y altas concentraciones de sal, y aditivos químicos para coagular las fibras hacen que el diseño de un proceso y un aparato para la producción de fibras adecuadas para el consumo sea una materia compleja. Además, la combinación de fibras obtenidas a través de hilatura para una estructura fibrosa es compleja, de ser posible en absoluto.

En NL-C-1019816 se preparan productos, estos productos tienen como objetivo reemplazar carne y pescado, y pueden hornearse. Estos productos se preparan a partir de cuajada, que se mezcla con alginato y/o fosfato en agua, dicha mezcla se emulsiona y subsecuentemente se agita vigorosamente en una solución de sal. Después de eso el producto fibroso obtenido se lava y además se elimina el agua. El método descrito tiene desventajas similares a las del método de hilatura antes descrito.

Además en el documento WO 2005/004624 y el documento WO 2005/004625, mezclas homogéneas de proteínas (proteínas de la leche y vegetales, respectivamente) y un hidrocoloide que precipita cuando se pone en contacto con iones metálicos con una carga de al menos +2 se ponen en contacto con una solución que contiene tales iones metálicos para formar productos alimenticios que contienen fibras conformadas.

Los productos obtenidos en los métodos de los dos párrafos anteriores obtienen una estructura basada en los hidrocoloides gelificados.

Más aún el antecedente de la técnica incluye la reticulación de proteínas con transglutaminasa, para obtener productos proteicos para diferentes usos, que no implican texturas fibrosas para el reemplazo de carne o pescado. Se hace referencia a la EP 1 085 023 la que se refiere a un proceso para reticular parcialmente las proteínas mediante el uso de transglutaminasa. El objetivo es proporcionar proteínas reticuladas útiles en productos alimenticios como un espesante o un aglutinante. El material se obtiene a partir de un reactor agitado continuamente o un reactor de lecho fijo, prefiriéndose el último. Además se hace referencia al documento EP 0 821 881, al que pertenece un polvo que contiene proteínas del suero de la leche útil en pastas alimenticias y alimentos emulsionados. La proteína de suero de la leche se hace reaccionar en solución con una transglutaminasa.

Otro antecedente de la técnica incluye estructuras proteicas micro-fibrosas, tal como EP 0 340 035. El proceso descrito en la presente implica triturar fibras de un complejo xantano/proteína y someter las fibras molidas a alta cizalladura con el fin de obtener micro fibras. El producto resultante puede usarse en productos alimenticios, por ejemplo sobre la base de componentes de carne. En sí mismo no tiene una estructura de reemplazo de carne o pescado.

El documento EP 0 420 165 se refiere a un tipo fundamentalmente diferente de reemplazo de carne o pescado, a saber, sobre la base de proteína de carne o pescado triturados, que implica un proceso de reestructurar las proteínas en estructuras similares a músculos. Este tipo de reemplazo obviamente no es adecuado cuando se desea

usar fuentes de proteínas no cárnicas. Más aún, aparte de las proteínas globulares y caseína, las proteínas originales de la carne usadas en la presente son proteínas fibrosas *per se.*

Es un objeto de la presente invención proporcionar un método para preparar estructuras y texturas alimenticias fibrosas, en donde se han superado los problemas identificados anteriormente en la presente.

Es un objeto adicional de la presente invención preparar productos y especialmente productos sólidos blandos con una apariencia y un comportamiento comparables con carne y pescado. Particularmente, se desea una composición que comprenda una estructura fibrosa jerárquica.

En este sentido, las estructuras jerárquicas implican que las estructuras de los niveles más altos de organización se ensamblen progresivamente de la escala molecular a la macro escala hasta alcanzar las propiedades y funciones deseadas. Adaptado de: J.M. Aguilera, S.W. Stanley, (1999), Microstructural principles of food processing and engineering, 2da ed, Aspen Publishing, Inc, Gaithersburg, Maryland, (ISBN 0-8342-1256-0), páginas 186-187.

Como se define en la presente, un producto alimenticio sólido blando es un producto alimenticio que exhibe principalmente deformación elástica (deformación elástica: G'>G") al aplicar un esfuerzo, y en que se necesita una cantidad relativamente pequeña de esfuerzo para obtener una deformación sustancial, ya sea debido a un bajo módulo elástico o un pequeño límite de fluencia. Detalles adicionales sobre los productos alimenticios sólidos blandos se describen en: P. Walstra (2003) Physical Chemistry of Foods; Capítulo 17: Soft-solids; Marcel Dekker, Nueva York.

La apariencia y/o el comportamiento comparables con carne y pescado se refieren preferentemente tanto en la capacidad de procesamiento durante la cocción, que incluye freír y saltear, como en el consumo. Particularmente, la estructura de la invención se acortará durante el calentamiento lo que da un comportamiento que es similar a lo que sucede con la carne de pollo.

Además, se desea proporcionar un material alimenticio fibroso con buenas propiedades de ab- y adsorción de compuestos aromáticos y saborizantes, tales como compuestos de hierbas y condimentos.

Otros objetos de la presente invención aparecerán después de leer el resto de la descripción que incluye los ejemplos de trabajo.

Los objetos de la presente invención se cumplen mediante el uso de una tecnología basada en la aplicación de flujo de cizalla simple y reticulación enzimática concurrente para inducir una estructura fibrosa anisotrópica en una proteína concentrada, y con la máxima preferencia en una composición concentrada de caseinato cálcico, sin la necesidad de baños de coagulación, y sin tener que aplicar altas temperaturas o altas fuerzas de cizalladura.Además, el número de etapas de lavado puede reducirse considerablemente y frecuentemente, no se requieren etapas de lavado.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para la preparación de estructuras alimenticias fibrosas jerárquicas, que comprende someter una suspensión de proteína comestible a flujo de cizalla simple y reticulación enzimática. La reticulación enzimática se lleva a cabo simultáneamente con la operación de flujo de cizalla simple.

El proceso de la presente invención se basa en un tipo específico de deformación, que es la cizalla simple. El término "cizalla simple" es bien conocido en la técnica e implica que los planos de los materiales se deslizan uno sobre otro en una sola dirección. Se hace referencia en este sentido a C.W. Macosko, "Rheology, Principles, Measurements and Applications", VCH Publishers Inc., Nueva York (1994), particularmente páginas 27-29, 40 y 70-75; esta referencia se refiere con el objetivo de definir el concepto "cizalla simple".

Cuando muchos de los procesos de la técnica anterior identificados anteriormente se refieren a sistemas de fases separadas de proteínas y polisacáridos en donde una alineación en una fase se impone, o más bien se mantiene fija, por la otra fase, la presente invención abarca un alineación del material proteico en una mezcla de proteína/agua. Es decir, la alineación y la formación de la estructura fibrosa ocurren en una y la misma fase de acuerdo con la presente invención. La estructura obtenida con la invención no requiere fijación en una matriz separada como sí lo requieren los procesos de la técnica anterior basados en la gelificación.

En el proceso de la presente invención, una suspensión de proteínas se somete a un perfil de cizalla lineal simple, que por ejemplo puede establecerse entre una placa y un cono; entre un cono y un cono; o en un reactor couette, de cono y placa. Un ejemplo de un aparato adecuado se representa en la Figura 1, en donde la Figura 1a muestra una fotografía de un dispositivo de célula a escala de laboratorio, y la Figura 1b es un dibujo esquemático de la zona de corte de dicho aparato. Particularmente, los polímeros pueden someterse a un perfil de cizalla lineal simple mediante el uso de, en la modalidad de la Figura 1, una placa y un cono, en donde el ángulo α_{placa} es por ejemplo aproximadamente 105°, y el α_{cono} por ejemplo 100°. El dispositivo de la célula de corte de la Figura 1 tiene un

volumen de aproximadamente 70 ml. La placa giratoria y el cono fijo se calientan (o enfrían) con agua. La temperatura del material se mide con un termopar situado en el cono. El dispositivo se une a un Brabender Do-Corder 330 (Brabender OHG, Duisburg, Alemania) para permitir el control de la velocidad de corte, y lecturas del torque y de temperatura. El aparato de la Figura 1 está basado en el aparato descrito por Peighambardoust y otros en: Journal of Cereal Science. 42(1) (2005) 59-68, cuyo documento se incorpora en la presente como referencia para una definición adicional del aparato adecuado para el uso en la presente invención.

Los esfuerzos aplicados durante la cizalladura no deben conducir a la desintegración de las proteínas. Generalmente, los esfuerzos aplicados no deben exceder 25 kPa, preferentemente no exceder de 20 kPa (calculado sobre la base del radio proyectado de la placa).

En este proceso, el flujo de cizalla simple conduce a la alineación de las proteínas, mientras que la reticulación enzimática conduce a la solidificación.

Por supuesto, pequeñas desviaciones de un perfil de flujo de cizalla simple, que todavía da materiales fibrosos, se abarcan además por la presente invención.

Basado en el conocimiento de la presente invención, es concebible, aunque no preferido, realizar el perfil de cizalla simple en un "equipo sin cizalladura", es decir un equipo que no se usa normalmente para aplicar cizalla, tal como un mezclador. En un equipo de este tipo, pueden existir dominios de procesamiento en que de hecho ocurre cizalla simple. Si se hace tal, debe tenerse cuidado para obtener - por ejemplo de las paredes del equipo agitado - sólo aquellas partes del material que se han sometido al dominio de cizalla simple en el equipo sin cizalladura. Además, si se usa un equipo sin cizalladura tal como un mezclador, el orden de adición de los componentes será más crítico para la formación de estructuras fibrosas. En un equipo de este tipo, las fases líquidas (agua, aceite), y el agente de reticulación enzimático, deben añadirse antes que la proteína. Es concebible que para algunos usos podría ser suficiente un material del que sólo partes son anisotrópicas (y están por ejemplo, contenidas en una matriz isotrópica).

La etapa de procesamiento de cizalla simple se lleva a cabo preferentemente con material proteico que no tiene temperatura de desnaturalización, tal como con caseinato cálcico (ver además en la presente más abajo), o preferentemente se lleva a cabo a una temperatura inferior a la temperatura de desnaturalización del material proteico. En cuanto a la cizalla simple *per se* el límite inferior de la temperatura no es crítico, siempre y cuando la solución o dispersión proteica sea capaz de fluir. Efectivamente, una etapa de calentamiento modesto conduce a una alineación más rápida. Los requisitos de temperatura para la reticulación enzimática concurrente pueden ser más críticos. En la práctica, el proceso de la invención se lleva a cabo adecuadamente en el intervalo de temperatura de aproximadamente 15-60°C, preferentemente a partir de la temperatura ambiente, *es decir* a partir de 20-25°C, hasta 55°C, y con mayor preferencia en el intervalo de temperatura de 35-50°C.

El proceso de la invención requiere soluciones o dispersiones proteicas más bien densas, preferentemente en agua o al menos en sistemas acuosos, aunque pueden usarse además otros disolventes no desnaturalizantes. Preferentemente, la concentración de proteínas es al menos 5% en peso, preferentemente al menos 10% en peso, con mayor preferencia al menos 15% en peso y aún con mayor preferencia al menos 20% en peso, calculado sobre el peso de toda la solución o dispersión; en los mejores modos encontrados hasta ahora preferentemente se usa al menos 25% en peso, y con mayor preferencia 30% en peso de proteína y más. El límite superior de la concentración de proteínas se rige por el requisito de que el material proteico debe ser lo suficientemente móvil para alinearse en el medio. Esto puede determinarse fácilmente por la persona experta en la técnica sobre la base de la presente solicitud. En la práctica, los contenidos proteicos no serán superiores a aproximadamente 60% en peso y preferentemente no superiores a 50% en peso.

En un aspecto preferido de la invención la proteína comestible está basada en caseína, y particularmente en caseínas de leche bovina. La caseína de leche bovina consiste principalmente de α_{S1}-, α_{S2}-, β- y κ-caseína en la relación 4:4:2:1. La serina y treonil fosfatos de α- y β-caseínas pueden interactuar con calcio (Ca^{2+}) y otros iones di- y trivalentes. Debido a esta interacción, las dispersiones de caseinato cálcico contienen agregados de proteínas que son comparables con micelas de caseína (~ 100-300 nm) en la leche; el caseinato sódico tiene una estructura terciaria más abierta y forma agregados proteicos de aproximadamente 50 nm.

A causa de los agregados proteicos más grandes en dispersiones de caseinato que contienen cationes di-valentes y de valencias superiores, cuyos cationes deben ser seguros para el consumo, y con la máxima preferencia que contienen iones de calcio, se prefieren especialmente formas de caseinatos de cationes divalentes y de valencia superior para su uso en la presente invención. Sin embargo, pueden usarse además proteínas de soya y otros vegetales (sin sabor) que pueden derivarse a partir de semillas oleaginosas; proteínas vegetales en general, concentrados de proteínas de suero de la leche (polvos WPC), permeados de suero de la leche, proteínas de la leche, caseínas, proteínas de patata, ovoalbúminas y mezclas de tales proteínas.

Para la reticulación de proteínas en principio es elegible un número relativamente grande de tipos de enzimas, tales

como la proteína disulfuro isomerasa, sulfhidrilo oxidasas, polifenol oxidasas, lisil oxidasas, peroxidasas, transglutaminasas, tirosinasa de setas, lipoxigenasas y glucosa oxidasas. Las enzimas mencionadas catalizan diferentes reacciones, y en dependencia de las proteínas presentes en los productos de partida a ser alineados, un experto puede seleccionar enzimas adecuadas. Muy adecuadas son la transglutaminasa, la peroxidasa y la glucosa oxidasa, *entre otras* debido a su disponibilidad.

En una modalidad preferida, se usa una transglutaminasa como la enzima de reticulación de proteínas. Se conocen dos tipos de transglutaminasa: animal y microbiana. Contrario a la transglutaminasa animal, la actividad de la transglutaminasa producida microbiológicamente es independiente de la presencia de iones de calcio. La enzima transglutaminasa cataliza reacciones de reticulación específicas entre proteínas. Más particularmente, un grupo de glutamina de una molécula proteica se une - a través de un enlace covalente - con un grupo de lisina de una molécula proteica, de manera que pueden formarse enlaces intermoleculares.

Como se ha dicho, una proteína preferida para usarse en el proceso de la invención se basa en la caseína, y con mayor preferencia es caseinato cálcico. Las caseínas forman un sustrato adecuado para la transglutaminasa. Para una descripción adicional de esta enzima, se hace referencia a los artículos de Lorenzen y Schlimme en el Boletín del IDF 332, páginas 47-53, en Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 49(3) 221-227 (1997), y en Nahrung-Food 42(3-4) (1998) 151-154, a Nonaka y otros, J. Food Sc. 57(5) (1992) 1214, y a la EP-A-0 610 649. La transglutaminasa está disponible comercialmente, *entre otras* de Ajinomoto Co., Inc. Tokio, Japón.

Los presentes inventores encontraron que una solidificación mediante el uso de una enzima de reticulación es esencial para obtener la formación de la estructura anisotrópica deseada. Los materiales fibrosos obtenidos mediante el proceso de la invención mostraron anisotropía tanto en micro como en macroescala como puede determinarse con microscopía de barrido de electrones (SEM) y análisis mecánicos, respectivamente.

La SEM reveló fibras de proteínas con un diámetro de ~100-200 nm, mientras que visualmente se observaron fibras de hasta 1 mm.

Tanto la cizalla simple como la enzima de reticulación, preferentemente transglutaminasa, afectaron el refuerzo de las fibras en gran medida, mientras que las propiedades mecánicas en la dirección perpendicular al flujo de corte se mantuvieron constantes.

Las propiedades reológicas fueron isotrópicas y sólo se afectaron por la enzima de reticulación.

Después de cizallar caseinato de Ca sin transglutaminasa, se encontró una estructura estratificada ligeramente anisotrópica pero no se formaron fibras. Tanto la reticulación en ausencia de cizalladura, como la reticulación durante el mezclado resultaron en geles de caseinato de Ca sin ninguna alineación.

Por lo tanto, la presente invención se basa en un efecto sinérgico obtenido por la aplicación combinada de cizalla simple y la reticulación por medio de una enzima. Este efecto se ilustra en la Tabla 2 en el Ejemplo 1, en la presente más abajo, para el caseinato de Ca mediante el uso de cizalla simple y transglutaminasa (TGA; referida además como TGasa). Los valores se obtienen de las propiedades de tracción, normalizados con valores correspondientes de muestras de caseinato de Ca de manera que puedan deducirse el efecto de corte (caseinato de Ca cizallado y reticulado normalizado con caseinato de Ca reticulado bajo condiciones de inactividad), y de la TGA (caseinato de Ca cizallado y reticulado normalizado con caseinato de Ca cizallado sin TGA). Tanto la cizalladura como la TGA afectaron las propiedades de tracción en la dirección paralela en gran medida, y así en la dirección de las microestructuras anisotrópicas. Aún más, al considerar los valores normalizados del límite de fluencia, el efecto de refuerzo de la cizalladura (en la presencia de TGA) fue casi dos veces mayor que el efecto de TGA solamente.

En el proceso de la presente invención se forma una estructura estratificada. Particularmente, la reticulación enzimática durante la cizalla simple cambia la morfología de los agregados proteicos a fibras.

En un segundo aspecto importante, la presente invención se refiere por tanto a una estructura proteica comestible jerárquica fibrosa, que tiene anisotropía a microescala (es decir, que tiene una estructura orientada al estudiar la morfología mediante el uso de SEM) y a macroescala (es decir, que tiene una estructura orientada al estudiar la morfología a simple vista). La anisotropía a macroescala puede determinarse además mediante el uso de una prueba de resistencia a la tracción; para la anisotropía a macroescala se obtienen diferentes resistencias a la tracción cuando se mide la pieza de prueba en diferentes direcciones.

Estas estructuras proteicas se comportan como carne e incluso se doran tras un horneado. Para hacer este dorado más explícito, puede añadirse un pequeño contenido de azúcares reductores, preferentemente lactosa.

En un tercer aspecto importante, la presente invención se refiere a partículas fibrosas sueltas que tienen una forma de fibra anisotrópica adecuadas para usarse como un ingrediente en aplicaciones alimentarias. Debido al carácter

particulado, estas partículas tienen un efecto de aumento de la viscosidad. Estas partículas permiten controlar la viscosidad de un producto en un amplio intervalo, que incluye productos muy líquidos hasta casi sólidos.

Adicionalmente, las partículas fibrosas pueden influir en el comportamiento de flujo de productos líquidos (espesos). El carácter anisotrópico de las partículas proporciona un efecto adicional al aumento en la inercia de los sistemas en donde se usan tales fibras. Efectos similares se aplican a sistemas más sólidos que tienen un comportamiento de fluencia. Mediante un ajuste fino de la estructura de la proteína; es decir, al proporcionar una estructura con una cantidad mayor o menor de anisotropía a micro o macro escala, los productos que tienen el mismo contenido de proteínas pueden prepararse para que tengan una viscosidad y/o comportamiento de flujo totalmente diferentes.

El carácter anisotrópico de la fase dispersada puede dar además la oportunidad de proporcionar un comportamiento de fluidificación por cizalla y, opcionalmente un comportamiento de fluencia de un producto. Es decir, cuando un producto espeso se somete a cizalladura, la viscosidad de dicho producto disminuye. Un producto espeso puede llegar a ser capaz de fluir o cogerse con cuchara y subsecuentemente puede llegar a ser espeso otra vez.

Como se ha mencionado anteriormente con respecto al "equipo sin cizalladura" para algunas aplicaciones puede concebirse obtener un material en que las partes anisotrópicas están contenidas en una matriz isotrópica. Un ejemplo de esto es además un método para preparar fibras sueltas, es decir fibras que no son necesariamente parte de una estructura jerárquica, sino que están en gran medida separadas unas de otras por una matriz. Con el objetivo de preparar tales fibras sueltas, parece esencial tener una fase adicional presente en la suspensión a cizallar. Particularmente, los polisacáridos o proteínas que no entrarán en acoplamientos químicos, pueden crear fibras sueltas. Al tener esta fase adicional presente, se produce una relación más suelta en la organización jerárquica, que puede terminar en fibras sueltas. Por tanto, en dependencia de la presencia de una fase adicional presente en la suspensión, y en dependencia de los parámetros de procesamiento puede obtenerse una estructura jerárquica o fibras sueltas, o toda un área poco definida entre fibras sueltas y estructura jerárquica. Ver además en este sentido el ejemplo de trabajo 3 en la presente más abajo.

Los polisacáridos adecuados para usarse en este proceso son xantano, carragenina, galactomanana, goma de guar, goma tara, goma de algarrobo, goma arábiga, pectina, celulosa, que incluye carboxi metilcelulosa (CMC), metilcelulosa (MC), e hidroxi propilcelulosa (HPC), y almidones, que incluyen almidones modificados.

Los polisacáridos permiten reducir el contenido de proteínas en la suspensión a procesar de acuerdo con la invención y/o permiten una variación en la coherencia y/o la capacidad de formación de tejido de las fibras y finalmente pueden conducir a la formación de fibras sueltas.

Las cantidades adecuadas de tales proteínas o polisacáridos a adicionar a la suspensión están generalmente en el intervalo de 0.01-5% en peso, preferentemente 0.05-3% en peso, con mayor preferencia 0.1-1.5% en peso y/o la cantidad (en peso) de proteína o polisacárido adicional con relación al peso de proteína a alinearse está en el intervalo de 1:1000-1:5, preferentemente 1:500-1:8, con mayor preferencia 1:100-1:10.

En una modalidad preferida estas estructuras fibrosas pueden obtenerse mediante el proceso de la invención.

Las estructuras fibrosas basadas en caseinato reticulado por transglutaminasa son altamente preferidas.

Las muestras fibrosas anisotrópicas de la presente invención son mucho más fuertes en la dirección paralela en comparación con la dirección perpendicular. Esto puede reflejarse especialmente mediante la relación del límite de fluencia. En una modalidad preferida, la estructura fibrosa de la invención tiene una relación de límite de fluencia $\sigma_{paralelo}/\sigma_{perpendicular}$ de al menos 6, preferentemente al menos 7 y con la máxima preferencia al menos 8. Para el caseinato cálcico, la relación de límite de fluencia $\sigma_{paralelo}/\sigma_{perpendicular}$ puede ser de manera adecuada aproximadamente 9.

La formación de estructuras anisotrópicas inducidas por cizalladura y enzimas se explicó por un aumento de la separación de fases de agregados proteicos debido a la cizalladura y solidificación concurrente de los agregados proteicos alineados.

La gelificación enzimática de caseinato cálcico mediante el uso de cizalla simple y reticulación enzimática induce una novedosa estructura proteica fibrosa. Las propiedades microestructurales resultantes se estudiaron con análisis de SEM. Las características estructurales se revelan con deformaciones pequeñas y grandes que conducen a propiedades viscoelásticas lineales deseadas y propiedades mecánicas deseadas, que se describirán en más detalle en la presente más abajo para estructuras de caseinato cálcico reticulado con transglutaminasa.

En la práctica, primero se prepara una solución o dispersión de proteínas en un medio adecuado, preferentemente un medio acuoso como una premezcla. Esta premezcla se transfiere a una célula de corte, y preferentemente se calienta a una temperatura entre 35 y 50°C. La enzima de reticulación se introduce ya sea en la célula de corte o preferentemente ya en la premezcla, y la mezcla se somete a una cizalla simple. Para obtener resultados óptimos,

es decir para un campo de corte bien definido, se requiere un llenado completo de la célula de corte. La cizalladura debe ser lo suficientemente grande para efectuar la alineación del material proteico, pero no demasiado grande, porque después puede romperse la estructura.

De acuerdo con la invención, una estructura proteica fibrosa anisotrópica, y preferentemente una estructura anisotrópica de caseinato de Ca, se formó mediante el uso de una tecnología basada en la formación de estructuras inducidas por cizalladura y solidificación concurrente. La reticulación enzimática durante la cizalladura parece esencial para la formación de la estructura anisotrópica. La simplicidad del método combinado con la alta anisotropía obtenida muestra el gran potencial de la tecnología para estructuras alimenticias y aplicaciones novedosas.

Como se dijo la reticulación durante la cizalladura es esencial, el ajuste del tipo y la actividad de la enzima, la velocidad de corte y el tiempo de procesamiento, usados en una proteína particular, depende de la proteína particular. Para un medio acuoso que contiene 25-30% en peso de caseinato cálcico, por ejemplo, la velocidad mínima de corte en el aparato mostrado en la Figura 1 (ver en la presente más abajo) mediante el uso de transglutaminasa (TGA) es 24 s^{-1}, y el tiempo de procesamiento está entre 300 y 3600 segundos. La temperatura óptima se determina por la enzima usada. Para la TGA, esta es de aproximadamente 50 °C.

En los ejemplos de trabajo en la presente más abajo, el caseinato cálcico en combinación con TGA se usa como un sistema modelo para la invención. Se muestra que después de la cizalladura y la reticulación enzimática mediante el uso de TGA, se formaron estructuras fibrosas anisotrópicas en una matriz concentrada de caseinato de Ca a macro- y microescala. Visualmente se observaron fibras de hasta 1 mm, mientras que las imágenes de SEM revelaron fibras proteicas con un diámetro de ~50-200 nm, que estaban compuestas de dominios proteicos encadenados.

En la ausencia de TGA, se encontró una estructura estratificada y ligeramente anisotrópica pero no se formaron fibras. La reticulación en la ausencia de cizalladura resultó en un gel fuerte de caseinato de Ca sin ninguna alineación. Las propiedades LVE mostraron un aumento de *G*' y una disminución de tanδ debido a la adición de TGA. Estas propiedades fueron isotrópicas (*es decir* independientes de la dirección de la deformación).

En contraste, las propiedades de tracción confirmaron la presencia de estructuras anisotrópicas, especialmente basadas en grandes diferencias entre los valores de límite de fluencia en las direcciones paralela y perpendicular en comparación con el flujo de corte aplicado (ver en la presente más abajo). La cizalladura afectó el refuerzo de las fibras anisotrópicas en gran medida, mientras que las propiedades en la dirección perpendicular permanecieron constantes. Además la TGA influyó en la formación de estructuras en la dirección del corte de manera significativa.

Al cizallar una dispersión concentrada de proteínas, se formó una estructura estratificada, que se representa esquemáticamente en la Figura 10. La reticulación enzimática durante la cizalladura cambió la morfología de la proteína en las fibras. Sin desear estar ligados por ninguna teoría específica, se plantea la hipótesis de que en el proceso de la presente invención la separación de fases de agregados proteicos a nivel molecular debido a la cizalladura conduce a estructuras anisotrópicas inducidas por cizalladura y enzima. Se necesita una reticulación enzimática para solidificar los agregados proteicos alineados, que posiblemente podrían relajarse tras el cese de la cizalladura cuando no está presente un agente de solidificación.

En los ejemplos de trabajo en la presente más abajo, se usa un sistema de caseinato altamente concentrado, en donde los agregados de caseína están estrechamente compactados o en un estado apretado. La separación local de fases en una fase rica en proteínas y pobre en proteínas con una baja tensión interfase, que podía haber estado ya presente en el sistema en reposo, se mejoró por la cizalladura lo que resultó en la alineación de estas fases. En la ausencia de TGA, los efectos combinados de la cizalladura y las interacciones con Ca^{2+} condujeron a una macroestructura estratificada de caseinato de Ca, que mostró un comportamiento anisotrópico durante las pruebas de tracción. En contraste, la microestructura apenas se afectó por la cizalladura. Esto resultaría en una estructura estratificada, similar a la representada en la Figura 10A. Es probable que la alineación en el caseinato de Ca a microescala estaba presente debido a la separación de fases y a la cizalladura, pero que la escala de tiempo del método de solidificación empleado, es decir de enfriamiento, fue mucho más larga que el tiempo de relajación de los ensamblajes proteicos alineados. Por lo tanto, el caseinato de Ca cizallado no resultó en una estructura fibrosa. En presencia de TGA, la reticulación posiblemente aumentó el tamaño de los agregados de caseinato de Ca, que los hizo aún más susceptibles a la alineación por cizalladura. Más aún, en la fase rica en proteínas de las fases separadas, la TGA indujo enlaces covalentes en la dirección del flujo. Dado que la solidificación ocurrió en una escala de tiempo más corta que la relajación, la micro- y la macro-estructura fibrosa se conservaron después del cese de la cizalladura.

El caseinato de Ca y el caseinato de Na tienen propiedades físicas diferentes y por lo tanto requieren regímenes diferentes para obtener estructuras anisotrópicas. El siguiente marco se considera para diferencias en la formación de estructuras inducidas por cizalladura de dispersiones densas de caseinato.

Consideramos las dispersiones densas de caseinato como sistemas que comprenden esferas blandas compactadas coloidales, y como sistemas similares a polímeros semi-diluidos con entrelazamientos que pueden formarse y

perturbarse en dependencia del tiempo y el flujo de corte. La cizalladura sólo puede inducir estructuras en estos sistemas si su efecto no puede compensarse por la movilidad del sistema. Esto indica que las propiedades físicas intrínsecas del caseinato de Ca son tales que la formación de estructuras inducidas por la cizalladura se favorece en las escalas de tiempo que hemos investigado.

Con referencia a los resultados obtenidos sobre la base del caseinato de Ca, será evidente para la persona experta en la técnica cómo pueden obtenerse estructuras fibrosas anisotrópicas similares, nuevas y útiles sobre la base de otras proteínas comestibles. Aunque las condiciones específicas pueden variar con la proteína, la persona experta será capaz de evaluar si las condiciones elegidas son aptas o no para producir la anisotropía requerida.

Las condiciones que deben tenerse en cuenta al abordar la invención con cualquier proteína comestible dada incluyen velocidad de corte, duración de corte, temperatura, viscosidad de corte, contra-iones, concentración de proteínas, tamaño de partículas proteicas, resistencia de la interacción de atracción mutua, comportamiento de flujo no monótono, esfuerzos normales significativos.

Sin considerar estar atados por la teoría, se observa que con el conocimiento de la invención, pueden aplicarse modelos teóricos para determinar las condiciones del proceso. Esto se ilustra con referencia al caseinato de Na.

Generalmente, el flujo de corte tendrá la tendencia a alinear elementos estructurales hacia la dirección del flujo de corte cuando las fuerzas hidrodinámicas dominen el movimiento browniano, que se expresa por el número de Péclet Macosko, C. W. (1994). Rheology: Principles, measurements, and applications. Nueva York: Wiley-VCH:

$$Pe = \frac{6\pi a^3 \dot{\gamma}\eta}{kT} >> 1$$

El radio de los elementos estructurales se denota con α, γ̇ es la velocidad de corte, η es la viscosidad (corte) de las soluciones, *k* es la constante de Boltzmann y *T* es la temperatura. El número *Pe* resume los parámetros principales (es decir el tamaño de partículas y la velocidad de corte) que son relevantes para la alineación de partículas inducida por cizalladura, o en este caso de proteínas micelares. Cuando se aplica *Pe* como una regla de escala para el caseinato de Ca y de Na, puede predecirse la velocidad de corte a la que el caseinato de Na será influenciado por el flujo de corte:

$$\dot{\gamma}_{NA} \cong \frac{\eta_{CA}(\dot{\gamma})a_{CA}^3\dot{\gamma}_{CA}}{\eta_{NA}(\dot{\gamma})a_{NA}^3}$$

Si se supone que el tamaño de los agregados de caseinato de Na a_{NA} es un factor 5 veces más pequeño que el tamaño de los agregados de caseinato de Ca αC_A(suponiendo α_{NA} ~25 nm y α_{CA}~125 nm (De Kruif, C. G. (1998). Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation. Journal Of Dairy Science, 81(11), 3019-3028. Lucey, J. A., Srinivasan, M., Singh, H. & Munro, P. A. (2000). Characterization of commercial and experimental sodium caseinates by multiangle laser light scattering and size-exclusion chromatography. Journal Of Agricultural And Food Chemistry, 48(5), 1610-1616. Dickinson, E., Semenova, M. G., Belyakova, L. E., Antipova, A. S., Il'in, M. M., Tsapkina, E. N. & Ritzoulis, C. (2001). Analysis of light scattering data on the calcium ion sensitivity of caseinate solution thermodynamics: Relationship to emulsion flocculation. Journal Of Colloid And Interface Science, 239(1), 87-97), y que existe una diferencia de aproximadamente un factor de 2 para la viscosidad de corte *η* ($\eta_{CA} \approx 2 \cdot \eta_{NA}$ a una velocidad de corte de ~ 120 s^{-1}), puede deducirse que la velocidad de corte necesaria para inducir la alineación en el caseinato de Na es de aproximadamente un factor $2.5 \cdot 10^2$ mayor en comparación con el caseinato de Ca.

Otro criterio para la alineación inducida por cizalladura se basa en el número de Deborah (*De*), es decir el producto de τ y la velocidad de corte, que debe superar el valor de 1: τγ̇ >> 1 (Forster, S., Konrad, M. & Lindner, P. (2005). Shear thinning and orientational ordering of wormlike micelles. Physical Review Letters, 94(1), 17803-17801-17804). Después es aplicable la siguiente regla de escalado que incluye interacciones:

$$\dot{\gamma}_{NA} \cong \frac{\tau_{CA}\dot{\gamma}_{CA}}{\tau_{NA}}$$

Mediante el uso del número *De* como una regla de escalado para caseinato de Ca y Na, puede concluirse además que la velocidad de corte necesaria para inducir alineación en el caseinato de Na es de dos órdenes en magnitud (10^2) más grande en comparación con la velocidad de corte necesaria para el caseinato de Ca, que está en línea con la predicción basada en el número *Pe*. Tanto *Pe* como *De* indican los factores que son importantes para la formación de estructuras inducidas por cizalladura, tal como la velocidad de corte, la viscosidad de corte, el tamaño de partículas y las interacciones de proteínas. Estos factores se afectan tanto por las propiedades como por el

procesamiento de los ingredientes, lo que subraya la importancia para que la persona experta ajuste estos aspectos para la formación de estructuras de caseinatos. Aún más, el uso de estos números adimensionales está en línea con el enfoque mecanicista de los sistemas de caseinato que por un lado son esferas compactadas y por otro lado redes de polímeros entrelazados.

El experto en la técnica será consciente de la importancia de ciertos factores relacionados con la formación de estructuras inducidas por cizalladura en materiales relevantes industrialmente:

1. La formación de fibras debido a cizalladura y reticulación enzimática está influida por, por ejemplo el contraión presente y la concentración de proteínas para obtener estructuras anisotrópicas, que afectan el comportamiento reológico en gran medida.
2. La formación de estructuras inducidas por cizalladura ocurre más probablemente si el material de partida es susceptible de ordenarse por cizalladura. Elementos estructurales micelares más grandes e interacciones atractivas pronunciadas en el caseinato de Ca en comparación con el caseinato de Na son responsables de las diferencias encontradas en la formación de estructuras. Generalmente, con el conocimiento de la invención, será evidente para la persona experta en la técnica que, en dependencia de la proteína, la concentración de iones (tales como calcio en el caso del caseinato cálcico) determinará también la anisotropía obtenida.
3. Las mezclas de proteínas relevantes industrialmente parecen mostrar similitudes con materiales modelos frecuentemente usados para estudiar la formación de estructuras inducidas por cizalladura, tales como los tipos de estructuras y el comportamiento reológico. Las principales similitudes observadas en el comportamiento último fueron el comportamiento de flujo no monótono, esfuerzos normales significativos, e interacciones atractivas, que indican con esos que las mediciones reológicas son útiles para analizar las capacidades de formación de estructuras de proteínas. Se entenderá, con el conocimiento de la invención, que los parámetros como el tiempo de relajación y de fluidificación por cizalla o espesamiento pueden usarse para evaluar, sin experimentación indebida, la idoneidad potencial de una suspensión de proteínas para obtener estructuras fibrosas jerárquicas de acuerdo con la invención.

Los materiales alimenticios fibrosos de la presente invención pueden contener aditivos. Así la mezcla puede comprender uno o más aditivos, particularmente uno o más aditivos seleccionados del grupo que consiste de saborizantes, ingredientes nutricionales adicionales, ingredientes para beneficiar la salud, y colorantes. Mediante la adición de uno o más saborizantes y/o colorantes apropiados puede obtenerse el sabor y/o apariencia deseados.
Otros aditivos son, por ejemplo, los conservantes, para los cuales el benzoato sódico es un ejemplo bien conocido.

Con la presente invención, se encontró que el benzoato sódico es un ingrediente preferido además para facilitar la formación de fibras como se desee. Sin considerar estar atados por la teoría, está presente la creencia de los inventores que sales adicionadas, tales como benzoato sódico, al aumentar la fuerza iónica de una solución de proteínas, tienen la capacidad de afectar las interacciones proteína-proteína, lo que influye en la termodinámica del sistema. Particularmente, en el caso del caseinato cálcico, las sales de fuerza iónica adecuadas son capaces de competir con el caseinato para la unión con calcio. Así, al perder algunas de sus uniones con calcio, se cree que la estructura del caseinato pierde coherencia interna, y por lo tanto llega a ser más receptiva a la cizalladura, y más capaz de alinearse. De nuevo, la persona experta en la técnica será capaz de una manera directa y adecuada de determinar, para un sistema de proteínas dado con o sin adición de sales, si las condiciones elegidas son suficientes para obtener la anisotropía requerida por cizalla simple.

La sal comprende preferentemente un catión monovalente y un anión divalente de calidad alimentaria. Los ejemplos incluyen sales tales como las conocidas de la fabricación de queso procesado, tales como lactato sódico, citrato sódico, y fosfato sódico, y otras sales que tienen una afinidad comparable para la unión con calcio, con el objetivo de competir con el calcio unido en la proteína.

Particularmente adecuados son D-lactato sódico y tripolifosfato sódico. Estas sales pueden usarse generalmente en un intervalo de 0.1 a 10% en peso, preferentemente 0.1 a 4% en peso y con mayor preferencia 0.1 a 2.5% en peso. El caseinato sódico puede usarse también, y típicamente en concentraciones superiores de 1 a 40% en peso.

En un aspecto adicional de la invención, el proceso usa la presencia adicional de grasa. Cuando la grasa está presente en la composición usada en el proceso, la grasa induce una estructura a nivel de mesoescala, además de la anisotropía a micro y macro escala que ya estaba presente en un sistema proteína-agua. La grasa puede estar presente en la suspensión en cantidades de hasta 30% en peso y a veces incluso más alto. Preferentemente, la cantidad de grasa es inferior a 25% en peso, con más preferencia menos de 20% en peso.

Las grasas adecuadas incluyen todo tipo de grasas vegetales y animales. Las grasas animales preferidas incluyen grasa de leche y especialmente grasa de leche de vaca. Las grasas vegetales preferidas incluyen grasa de girasol, grasa de frijol de soya, grasa de semilla de colza, grasa de mijo y maíz y mezclas de estos. En una modalidad preferida se usa una grasa con una relación aumentada de grasa poliinsaturada con respecto a grasa saturada (pufa/safa) en comparación con la grasa láctea. La grasa usada debe estar líquida durante el proceso. El uso de grasa como una segunda fase permite la estructuración en una escala de longitud adicional en materiales

jerárquicos de proteína-grasa en comparación con la proteína en una sola fase. La reticulación enzimática concurrente mediante el uso de transglutaminasa (TGA) permite la fijación de la estructura inducida por cizalladura. En los ejemplos de trabajo se muestra el efecto de la velocidad de corte, el tiempo de corte y la concentración de proteínas sobre la formación de estructuras anisotrópicas basadas en caseinato de Ca y grasa de palma mediante la aplicación de cizalla simple y reticulación enzimática mediante el uso de TGA. Las estructuras de caseinato de Ca y grasa se investigaron con microscopía confocal de barrido láser (CSLM) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Las deformaciones pequeñas y grandes proporcionaron una visión en las propiedades viscoelásticas lineales (LVE), que incluyen el comportamiento de fluencia, y propiedades de tracción respectivamente de los materiales únicos de caseinato de Ca y grasa.

Más en detalle, para el sistema de prueba basado en dispersiones de caseinato cálcico y grasa de palma se forman materiales fibrosos jerárquicos después de la reticulación enzimática bajo deformación bien definida. El tiempo de corte prolongado influyó en la transición de materiales fibrosos en estructuras dañadas acompañado por sinéresis.

En cuanto al efecto de la grasa sobre la formación de estructuras, se observa que las estructuras fibrosas cizalladas y reticuladas de caseinato de Ca que contienen grasa mostraron pequeñas diferencias con las estructuras fibrosas sin grasa basado en imágenes de SEM. El espesor estimado de fibras fue más o menos similar (~100-200 nm), que está en el intervalo de micelas de caseína. Sin embargo, con CSLM, se observó una escala de longitud adicional en los materiales de proteína y grasa, donde fueron visibles haces de proteínas y estructuras de grasa alargadas o deformadas. Los enlaces se crean sólo en la dirección del flujo de corte, que es más probable que ya se faciliten por la alineación de proteínas inducida por la cizalladura. La presencia de grasa dificulta la formación de enlaces covalentes en la dirección perpendicular al flujo, de esta manera mejora posiblemente el carácter fibroso del material. Los valores de las propiedades mecánicas de la muestra fibrosa que contiene grasa fueron ligeramente más altos en comparación con la muestra proteica fibrosa sin grasa, lo que sugiere un refuerzo de la estructura por la fase de grasa sólida. Las relaciones de las propiedades mecánicas medidas de manera paralela y perpendicular al flujo de corte fueron similares a la muestra fibrosa sin grasa, ambas tienen una relación alta del límite de fluencia de aproximadamente 8-9. En la ausencia de TGA, las gotitas de grasa fueron más grandes y menos deformadas en el material isotrópico de caseinato de Ca y grasa en comparación con las gotitas de grasa presentes en las estructuras fibrosas que contenían TGA. En la presencia de TGA, la viscosidad en la matriz aumentará con el aumento del tiempo de corte, lo que conduce a grandes fuerzas viscosas y por consiguiente a la desintegración de las gotitas. Sin embargo, un aumento en la elasticidad de la matriz aumentará el alargamiento de la fase dispersada, y temporalmente incluso la orientación hacia la dirección del flujo. Además la relación de viscosidad de las fases influye en la formación de estructuras durante la deformación bien definida: cuando la viscosidad de la fase dispersada es menor que la viscosidad de la fase de matriz, que es probablemente el caso durante la cizalladura y la reticulación del caseinato de Ca y grasa, las gotitas se volverán alargadas durante la cizalladura. Para el efecto de la concentración de proteínas sobre la formación de estructuras se observa que las dispersiones de caseinato de Ca comprenden agregados proteicos que son comparables con las micelas de caseína (~100-300 nm) en la leche. Estos elementos estructurales son muy probablemente susceptibles a la alineación por cizalladura cuando dominan fuerzas hidrodinámicas. La TGA induce enlaces covalentes en la fase proteica, lo que aumenta de esa manera el tamaño de los grupos de caseína, lo que mejorará su susceptibilidad para alinearse por cizalladura. Basado en el hecho de que después de la cizalladura a 24 s^{-1}se formó un material isotrópico, se supone que la velocidad de corte aplicada fue demasiado baja para alinear los elementos estructurales, *es decir* las moléculas de caseína o mejor: micelas de caseína, que se reticularon a una velocidad relativamente más alta. Se necesitó una cizalladura a velocidades de corte relativamente altas (> 120 s^{-1}) para la alineación y la creación de fibras. Cuando la velocidad de corte es demasiado baja, la matriz proteica es más viscosa debido al comportamiento de fluidificación por cizalla. Por lo tanto, es probable que se forme una red covalente más aleatoria, que alcanzará un estado percolado rápidamente. La cizalladura a una alta velocidad de corte (240 s^{-1}) resultó en una mejor fibrosidad como se refleja por las propiedades mecánicas. Esto puede explicarse por un aumento en la separación de micro fases debido a la alta velocidad de corte, que conduce a más fibras, y a la presencia de pequeñas gotitas de grasa en capas delgadas. En resumen, la velocidad de corte parece ser una herramienta esencial para influir en la creación y el grado de fibrosidad de materiales fibrosos basados en caseinato de Ca y grasa.

De acuerdo con la invención, una interacción entre la velocidad de reticulación y la velocidad de corte determina la formación de estructuras fibrosas. Los resultados de esto se resumen en un diagrama (Figura 21) con el objetivo de proporcionar una visión general de los tipos de estructuras que pueden obtenerse. En el eje y se grafican la velocidad de solidificación (r_s) y la velocidad de corte, fluencia /r_s /j_s, en función del tiempo del proceso. En el caso de la reticulación enzimática, π_s se modifica a escala con [E/P], mientras que la velocidad de corte se interpreta como una medida de alineación. Todos los puntos de datos experimentales para materiales de caseinato de Ca al 30% y grasa se muestran en el diagrama, a excepción de los materiales de caseinato de Ca al 25% y grasa con el objetivo de excluir los efectos de la concentración de proteínas, que influye en [E/P], pero además en la viscosidad. Se espera que los últimos efectos sean altamente no lineales y requieren mayor investigación. En base a los datos experimentales y consideraciones teóricas, pueden construirse cuatro regiones estructurales en el diagrama: (1) estructuras fibrosas denotadas con F, (2) estructuras 'granulares', que son las estructuras dañadas y desintegradas después de sobre-cizalladura, denotadas con G, (3) materiales sólidos isotrópicos que están reticulados en un sólido pero no alineados denotados con Is, y (4) materiales líquidos isotrópicos, que son materiales que contienen la misma

consistencia que el material de partida, denotados con II. En una relación fija [E/P]/ γ < 6.10^{-4}, pueden ocurrir tres transiciones estructurales con un aumento del tiempo del proceso. Primero, se forma un líquido isotrópico en tiempos cortos del proceso cuando γ → ∞ o [E/P] → 0. Los elementos estructurales, que son propensos a la alineación por cizalladura cuando dominan fuerzas hidrodinámicas, se alinearán a altas velocidades de corte, pero perderán su orientación cuando no se aplica solidificación. Sin embargo, a una velocidad de solidificación muy baja, la orientación se fijará a escalas de tiempo más largas que resultan en un material fibroso. Esta transición se indica con la línea a. Incluso en tiempos más largos del proceso la estructura alineada se desintegrará, lo que resulta en una estructura 'granular' acompañada con sinéresis, que se representa con la línea de transición *b* dependiente del tiempo. En un punto determinado cuando la velocidad de solidificación domina la velocidad de corte ([E/P]/ γ> ~ 8.10^{-4}), ocurre una transición independiente del tiempo a partir de materiales fibrosos a sólidos isotrópicos, ilustrado con la línea c. Cuando γ → 0 o [E/P] → ∞, existen también tres transiciones dependientes del tiempo. En escalas de tiempo muy cortas se forma un líquido isotrópico, que se transforma rápidamente en un sólido isotrópico con una red percolada altamente aleatoria (línea *a*). A medida que la resistencia de la red aumenta con el tiempo del proceso, puede esperarse una transición a la región granular (línea *b*) debido a la desintegración de la estructura. Con el aumento de la velocidad de solidificación, la transición de un sólido isotrópico a un material granular ocurrirá en tiempos más cortos, lo que explica el comportamiento asintótico de la línea b. De manera similar, la línea *a* es además una asíntota hacia el eje y. Debe señalarse que los valores de [E/P]/ γ son arbitrarios y específicos para el sistema bajo investigación. Sin embargo, la existencia de dos transiciones dependientes del tiempo (*a*, *b*) y una (*c*) independiente del tiempo que dividen el diagrama estructural en cuatro regiones distintas, de las que la región fibrosa es la más estrecha, se espera que sea genérica para el proceso de estructuración en base al flujo bien definido y la solidificación. El diagrama proporciona una explicación de por qué los procesos de estructuración, con excepción de los procesos de flujo bien definidos, no resultan en estructuras altamente alineadas y fibrosas. Durante el mezclado, los biopolímeros están sujetos a velocidades de corte relativamente bajas, y ocasionalmente a picos altos de velocidades de corte. Debido al movimiento inherente durante el mezclado, las macromoléculas continuamente se están reorientando, y finalmente el material total se tratará en estos picos altos de esfuerzos, que pueden resultar en desintegración de las estructuras. Por lo tanto, durante el mezclado, el material nunca alcanzará la región fibrosa como un sólido isotrópico (región Is), o incluso se formará rápidamente una estructura granular (región G). Otro proceso de estructuración es la extrusión durante la que los biopolímeros tienden a alinearse en troqueles ranurados debido al flujo laminar, mientras que la estructura posiblemente se fija por enlaces di-sulfuro e interacciones hidrofóbicas durante el enfriamiento. El grado de fibrosidad se determina en gran medida por la velocidad de enfriamiento y la longitud del troquel ranurado, que es equivalente a la velocidad de solidificación y al tiempo del proceso, respectivamente. La alineación a escala molecular no se informó para materiales fibrosos extruidos basados en proteínas. La alta presión necesaria para empujar el material a través del troquel en combinación con altas temperaturas conduce a altos esfuerzos de corte sobre el material dentro del extrusor, lo que resulta en daño severo a las proteínas y riesgo de sinéresis.

El nuevo proceso de estructuración de la invención basado en el flujo de corte bien definido y la reticulación enzimática conduce a estructuras altamente fibrosas a macro y microescala en dispersiones densas de caseinato de Ca. La presencia de grasa indujo una escala de longitud adicional a nivel de mesoescala, ya que se separaron haces (~ 40 µm) de fibras proteicas (~ 100-200 nm) mediante capas de grasa y gotitas de grasa deformadas (~ 10 µm). Tanto el tiempo de corte como la velocidad de corte afectan grandemente la formación de estructuras fibrosas. Para estructuras fibrosas de caseinato de Ca al 30%, ya se observaron después de 5 minutos de cizalladura a 120 s^{-1}, pero se observó una desintegración de la estructura fibrosa después de una cizalladura prolongada durante 60 minutos. En el caso de caseinato de Ca al 25%, la desintegración se observó más pronto en la medida que se incrementó la velocidad de reticulación relativa en este sistema. Una baja velocidad de corte (24 s^{-1}) produjo una estructura isotrópica, mientras que una cizalladura a una alta velocidad de corte (240 s^{-1}) resultó en un mayor grado de fibrosidad. Las propiedades LVE y el comportamiento de fluencia proporcionaron una visión en el efecto de enlaces covalentes inducidos por la enzima durante la formación de estructuras, independientemente de su orientación. Las pruebas de tracción mostraron que los enlaces covalentes se formaron en la dirección del flujo de corte.

Las estructuras fibrosas se forman debido a una combinación de propiedades de los productos iniciales, que requieren elementos estructurales que son propensos a la alineación por cizalladura, y condiciones del proceso bien definidas, lo que implica un flujo de corte lineal y una solidificación de las estructuras alineadas.

La invención se describirá con más detalles, mientras se refiere a los siguientes ejemplos no limitantes y las figuras.

En las figuras:

La Figura 1 muestra el dispositivo de la célula de corte. La célula de corte se basa en un concepto de reómetro y una célula de corte a escala piloto. El ángulo del cono = 100°; ángulo entre el cono y la placa (zona de corte) = 2.5°; R_{placa} = 0.08508 m; $R_{placa,}$ proyectado = 0.06750 m; R_{cono} = 0.07638 m; $R_{cono, proyectado}$ = 0.05851 m. El cono fijo y la placa giratoria se calientan/enfrían con agua.

La Figura 2 muestra una imagen de caseinato de Ca al 30% cizallado y reticulado después de una prueba de tracción (A). Es de señalar la fibra que se hizo visible después del alargamiento durante la medición. Después de la suspensión de la misma muestra durante 1 día en agua desmineralizada, fueron visibles distintas fibras (B).

La Figura 3 muestra imágenes de SEM de superficies fracturadas en paralelo (columna izquierda; plano de gradiente de velocidad - flujo de corte) y perpendiculares (columna derecha; plano de gradiente de velocidad - vorticidad) al flujo de corte ejercido en el dispositivo de la célula de corte de caseinato de Ca al 30% y TGA (E:P = 1:20) cizallado a 50°C y 50 rpm durante 35min (C + TG - Cizalla). Las barras de escala en A3 y B3 denotan 1 µm.

La Figura 4 muestra imágenes de SEM de superficies fracturadas en paralelo (columna izquierda; plano del gradiente de velocidad - flujo de corte) y perpendiculares (columna derecha; plano del gradiente de velocidad - vorticidad) al flujo de corte ejercido en el dispositivo de la célula de corte de caseinato de Ca al 30% cizallado a 50°C y 50 rpm durante 35 min (C - Cizalla).

La Figura 5 muestra imágenes de SEM de superficies fracturadas en paralelo (columna izquierda; plano del gradiente de velocidad - flujo de corte) y perpendiculares (columna derecha; plano del gradiente de velocidad - vorticidad) al flujo de corte ejercido en el dispositivo de célula de corte de caseinato de Ca al 30%, reticulado mediante TGA (E:P = 1:20) bajo condiciones de inactividad a 50°C (C + TG - Inactividad).

La Figura 6 muestra imágenes de SEM de superficies fracturadas en dirección imaginaria "paralela" (columna izquierda) y "perpendicular" (columna derecha) de caseinato de Ca al 30% y TGA (E:P = 1:20) mezcladas en un mezclador a 50°C y 50 rpm durante 35 min (C + TG - Mezcla).

La Figura 7 muestra las propiedades LVE de *G*' (A) y tanδ (B) con intervalos de confianza del 95% de las diversas estructuras de caseinato de Ca al 30%. C = caseinato de Ca; TG = TGA; (no) cizalla = (no) cizallado en el dispositivo de célula de corte; mezcla = mezclado en un mezclador.

La Figura 8 muestra las curvas típicas de esfuerzo-deformación de caseinato de Ca al 30% y TGA (E:P = 1:20) cizallado a 50°C y 50 rpm durante 35 min (C + TG - Cizalla) que se alargó en la dirección paralela y perpendicular al flujo de corte.

Figura 9 Propiedades de tracción límite de fluencia σ, límite de deformación ε y módulo de Young E con intervalos de confianza del 95% de los diversos materiales de caseinato de Ca al 30%. C = caseinato de Ca; TG = TGA; (no) cizalla= (no) cizallado en un dispositivo de la célula de corte; mezcla = mezclado en un mezclador.

La Figura 10 muestra una vista general esquemática de la anisotropía inducida por cizalladura y enzima en caseinato de Ca denso: estructura estratificada como se observa después de cizallar caseinato de Ca (A) y estructura fibrosa como se observa después de cizallar caseinato de Ca en la presencia de TGA.

La Figura 11 muestra macroestructuras cizalladas y reticuladas de caseinato de Ca al 30%, grasa de palma al 15% y TGA (1:20): A. Macroestructura fibrosa obtenida después de la cizalladura a 120 s^{-1} durante 30 min; B. Macroestructura dañada obtenida a 120 s^{-1} durante 60 min.

La Figura 12 muestra el efecto del tiempo de corte en el torque durante la cizalladura en el dispositivo de la célula de corte de caseinato de Ca al 30% y TGA (1:20) (izquierda) y caseinato de Ca al 25% y TGA (1:17) (derecha). Todas las muestras contenían grasa de palma al 15%. El asterisco (*) denota los materiales que no fueron fibrosos después de la cizalladura. No TG indica la muestra de caseinato de Ca al 30% sin TGA.

La Figura 13 muestra imágenes de SEM de superficies fracturadas en paralelo (columna izquierda; plano del gradiente de velocidad - flujo de corte) y perpendiculares (columna derecha; plano del gradiente de velocidad - vorticidad) al flujo de corte ejercido en el dispositivo de la célula de corte de caseinato de Ca al 30% y grasa de palma al 15% reticulados con TGA (1:20).

La Figura 14A muestra imágenes seleccionadas de CSLM de materiales cizallados y reticulados de caseinato de Ca al 25% y 30% y grasa de palma al 15% (TGA 1:17 y 1:20, respectivamente) obtenidos después de la cizalladura a diversos tiempos a 120s^{-1}. El material no reticulado de caseinato de Ca al 30% y grasa se incluye también. Las imágenes se tomaron del plano de vorticidad - flujo de corte. B. Frecuencias acumulativas promedio del diámetro de gotitas de grasa y del parámetro de deformación *D* de muestras seleccionadas de caseinato de Ca y grasa, determinadas con análisis de imágenes mediante el uso de al menos 6 imágenes con un aumento de 10x.

La Figura 15 muestra el efecto del tiempo de corte sobre las propiedades LVE *G'* y tanδ con intervalos de confianza del 95% de caseinato de Ca al 30% y TGA (1:20), caseinato de Ca al 25% y TGA (1:17), y caseinato de Ca al 30% sin TGA. Todas las muestras contenían grasa de palma al 15%. Los símbolos abiertos denotan muestras que no fueron fibrosas después de la cizalladura.

La Figura 16 muestra el efecto del tiempo de corte (A.) y la velocidad de corte (B.) sobre los valores normalizados de *G'* con el valor de G' en la región viscoelástica lineal (LVE) en función de la deformación γ medida con barridos de amplitud de deformación de los materiales que consisten de caseinato de Ca al 30%, grasa de palma al 15% y TGA (1:20). Las curvas normalizadas son el promedio de mediciones por duplicado. La muestra denotada con no TG no se reticuló con TGA. Los símbolos abiertos denotan muestras que no fueron fibrosas después de la cizalladura.

La Figura 17 muestra curvas de fluencia medidas de caseinato de Ca al 25% y al 30%, grasa de palma al 15% y TGA (1:17 y 1:20, respectivamente) obtenidas después de diversos tratamientos de cizalladura (puntos de datos). Las líneas representan las curvas ajustadas con el modelo de Burgers de 6 elementos. El gráfico insertado muestra caseinato de Ca y grasa cizallado no reticulado. Las muestras no fibrosas se denotan con un asterisco.

La Figura 18 muestra el efecto del tiempo de corte sobre las propiedades de tracción límite de fluencia σ, límite de deformación ε y el módulo de Young *E* con intervalos de confianza del 95% de caseinato de Ca al 25% y TGA (1:17), caseinato de Ca al 30% y TGA (1:20) o sin TGA (no TG). Todas las muestras contenían grasa de palma al 15%. Las propiedades de tracción se midieron de manera paralela y perpendicular al flujo de corte ejercido en el dispositivo de la célula de corte.
La Figura 19 muestra el efecto de la velocidad de corte sobre el torque en función del tiempo durante la cizalladura en el dispositivo de la célula de corte para caseinato de Ca al 30% y TGA (1:20). Todas las muestras contenían grasa de palma al 15%. El asterisco (*) denota el material que no fue fibroso después de la cizalladura.
La Figura 20 muestra el efecto de la velocidad de corte sobre las propiedades de tracción límite de fluencia σ, límite de deformación ε y el módulo de Young *E* con intervalos de confianza del 95% de caseinato de Ca con TGA (1:20) o sin TGA (no TG). Todas las muestras contenían grasa de palma al 15%.
La Figura 21 muestra un diagrama basado en la relación de la velocidad de solidificación y la velocidad de corte en función del tiempo del proceso. Las líneas *a, b* y *c* representan transiciones a cuatro regiones estructurales: (1) materiales líquidos isotrópicos (Il), (2) materiales fibrosos (F), (3) materiales sólidos isotrópicos (Is) y (4) materiales "granulares" dañados (G). Los círculos, triángulos y cuadrados representan materiales fibrosos, granulares e isotrópicos respectivamente sobre la base de caseinato de Ca al 30%, grasa de palma al 5% y TGA (1:20) obtenidos en diversas condiciones del proceso.

En los ejemplos, los porcentajes son porcentajes en peso calculados sobre el peso total de la composición.

En estos ejemplos, se hace uso de los siguientes compuestos:

Transglutaminasa (TGA, de ahora en adelante): una transglutaminasa microbiana independiente de Ca^{2+} (proteína-glutamina:amina γ-glutamil-transferasa, EC 2.3.2.13) derivada a partir de *Streptoverticilium moberansae* (1% TGA, 99% de maltodextrina, *ex* Ajinomoto Co. Inc., Tokio, Japón) que tiene una actividad de 81-135 unidades-g^{-1} de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Una solución al 20% (p/p en agua desmineralizada) de TGA se preparó poco antes de las corridas experimentales mediante agitación mecánica a temperatura ambiente durante 1 h.

Caseinato cálcico (caseinato de Ca): contenía al menos 88% de proteínas de acuerdo con las especificaciones del fabricante (*ex* DMV International, Veghel, Holanda).

La grasa de palma se adquirió de Barentz Raw Materials (Hoofddorp, Holanda). Tiene una trayectoria de fusión de 20°C a 37°C, lo que implica que la grasa era líquida durante el procesamiento (50°C), y sólida durante su análisis posterior (20°C).

El Rojo Nilo (72485, Sigma Aldrich), un colorante fluorescente para grasa para Microscopía Confocal de Barrido por Láser, se adicionó a la grasa de palma fundida en una concentración de 0.1 g L-1.

El dimetilsulfóxido (DMSO) y el etanol usados para la preparación de muestras para SEM fueron de grado analítico (*ex* Sigma Aldrich, Zwijndrecht, Holanda).

En los ejemplos, los datos de prueba se obtuvieron mediante los siguientes métodos:

Microscopía electrónica de barrido: Se observaron aspectos micro y nanoestructurales de materiales de caseinato de Ca con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) a temperatura ambiente. Las muestras secas se prepararon de acuerdo con el método modificado descrito por Muller y otros en Scanning 22 (2000) 295-303. Las muestras cizalladas de caseinato de Ca se cortaron cuidadosamente en cuadrados (<10 x 10 mm), y se sumergieron en DMSO (intervalo de concentración 15%, 30% y 50% v/v en agua desmineralizada) durante 60 min cada una. El exceso de 50% de DMSO se eliminó de las muestras con papel de filtro. La congelación lenta de las muestras se realizó en nitrógeno gaseoso frío por encima de nitrógeno líquido. Subsecuentemente, las muestras se introdujeron en nitrógeno líquido, y se fracturaron por congelación sobre una mesa de metal con una hoja de afeitar (acero de carbono de un solo filo, EMS Washington Estados Unidos) y un martillo. La fracturación por congelación se realizó de manera paralela y perpendicular al flujo de corte que se ejerció sobre las muestras en el dispositivo de la célula de corte (basado en el plano del flujo de corte - vorticidad). Los planos de fractura resultantes fueron el plano del gradiente de velocidad - flujo de corte y el plano del gradiente de velocidad -vorticidad, respectivamente. En la presente, estas direcciones y los planos de fractura resultantes se definen como paralelos y perpendiculares, respectivamente. La muestra mezclada, que no tiene una clara dirección de corte, se trató de manera similar después de definir una dirección imaginaria paralela y perpendicular. Todas las muestras de caseinato de Ca mostraron una fractura frágil. Después de la fractura, las muestras se descongelaron en DMSO al 50% durante > 60 min, y subsecuentemente se rehidrataron con agua a través del intervalo invertido de concentración de DMSO (60 min cada una). Las muestras se deshidrataron en una serie graduada de etanol (10%, 30%, 50%, 70%, 90% v/v) a 100% de etanol (20 min en cada una). Las muestras en etanol al 100% se secaron en el punto crítico con dióxido de carbono (CPD 020, *ex* Balzers, Liechtenstein), y se examinaron con un microscopio estereoscópico para identificar los planos de fractura.

Subsecuentemente, las muestras se pegaron sobre un soporte para muestras mediante el uso de cemento conductor de carbón (Leit-C, *ex* Neubauer Chemicalien, Alemania), y se recubrieron por deposición con 20 nm de platino (JFC 1200, *ex* JEOL, Japón). Las superficies fracturadas se analizaron con un FESEM (JEOL 6300 F, Tokio, Japón) a temperatura ambiente a una distancia de trabajo de 8 mm, con detección SE a 3.5 - 5 kV. Todas las imágenes se registraron digitalmente (Orion, 6 E.L.I. sprl., Bélgica) a una velocidad de barrido de 100 segundos (marco completo) con un tamaño de 2528 x 2030, 8 bit. La reducción del ruido y el cambio de tamaño de las imágenes se realizaron con Adobe Photoshop CS.

Microscopía confocal de barrido por láser (CSLM): la mesoestructura, definida como la estructura entre la micro y macro escala de longitud, de los materiales procesados de caseinato de Ca y grasa se observó con CSLM en el plano de vorticidad - flujo de corte. Después de un almacenamiento a 4°C, las muestras de proteína y grasa tomadas de la sección central de la célula de corte se cortaron cuidadosamente, se transfirieron a portaobjetos tapados de 2 cámaras (*ex* Nunc, Naperville, IL, Estados Unidos) y se analizaron con un LSM invertido 510 (*ex* Zeiss, Oberkochen, Alemania). Se usaron un láser de iones de Ar (488 nm) y un láser de He-Ne (543 nm) para excitar las muestras. Para la fase proteica, se aplicó un filtro de emisión de 505-530 nm, mientras que se usó un filtro de 600-650 nm para la fase de grasa. Las imágenes se registraron digitalmente con un objetivo seco de 10x (N.A. 0.3, aumento de 2x y 4x) y un objetivo de inmersión en aceite de 40x (N.A. 1.3). El análisis de las imágenes en bruto (512 x 512 píxeles) de la fase de grasa se realizó mediante el uso de la Caja de Herramientas de imágenes del Matlab 7.0 (*ex* The Mathworks Inc., Natick MA, Estados Unidos). Al menos 6 imágenes por muestra obtenidas a un aumento de 10x se usaron para determinar el tamaño del diámetro basado en el área de píxeles (d = (4π/área). *Además, el parámetro de deformación* D *se calculó a partir de la longitud máxima del eje* (L_{max}) *y la longitud mínima del eje* (L_{min}) *de un elipsoide:* D = $(L_{max} - L_{min})/(L_{max} + L_{min})$. Sobre la base de las distribuciones acumulativas del diámetro de gotitas de grasa y D, se construyeron las distribuciones acumulativas promedio.

Propiedades reológicas: las propiedades viscoelásticas lineales (LVE) (G' y tanδ) se determinaron por duplicado con pruebas de amplitud de deformación oscilante dinámica con un Bohlin CVO de esfuerzo controlado (ex Bohlin Instruments Ltd., Cirencester, Reino Unido) a una frecuencia constante de 1 Hz y a una temperatura de 20°C. Los barridos de frecuencias individuales (0.01 a 100 Hz) se realizaron a una deformación constante dentro de la región LVE a 20°C. Las pruebas de fluencia se llevaron a cabo por duplicado a 20°C a un nivel de esfuerzo estable dentro de la región LVE (< 350 Pa). El tiempo de fluencia fue de 2000 s. Las placas paralelas dentadas (diámetro 25 mm, interrupción 2 mm) se usaron con el objetivo de prevenir el deslizamiento. Se usó una cámara que cubriera la muestra para evitar la evaporación. Antes de medir, las muestras se dejaron en reposo durante 5-15 minutos para permitir la relajación de los esfuerzos inducidos por la carga de la muestra. Los espectros mecánicos obtenidos se analizaron con un ajuste de la ley de potencia a las curvas de frecuencia G' ($G' \propto \omega^n$). Las curvas de fluencia se analizaron con el modelo de Burgers de 6 elementos, que probó ser adecuado para describir las propiedades viscoelásticas de materiales sólidos blandos (ver: Edwards y otros, Rheologica Acta. 40 (2001) 142-153). El modelo comprende un elemento de Maxwell con dos elementos de Kelvin-Voigt en serie:

$$J(t) = 1/G_1 + (1/G_2)[1 - exp(-tG_2/\eta_2)] + (1/G_3)[1 - exp(-tG_3/\eta_3)] + t/\eta_1$$

La capacitancia instantánea J_1es igual a $1/G_1$, el flujo viscoso se representa por t/η_1, y el resto de la ecuación (dos elementos de Kelvin-Voigt) representa la capacitancia retardada. En los ejemplos de trabajo, los inventores se centraron en J, η_1 y los tiempos de retardo τ_2 (= G_2/η_2) y τ_3 (= G_3/η_3) para discriminar entre los diversos materiales cizallados y reticulados.

Propiedades mecánicas:. Un analizador de textura T2 (*ex* Stable Micro Systems Ltd., Surrey, Reino Unido) se usó para las pruebas de gran deformación. Los ensayos de tracción uniaxial se llevaron a cabo con una velocidad de deformación constante de 3 mm-s^{-1} a temperatura ambiente dentro de 2 h después de crear los materiales de caseinato de Ca. Las muestras se cortaron en una forma rectangular (30 x 12 mm) con un espesor de 3-5 mm (medido para cada muestra individual). La longitud de la parte a extenderse fue de 15.2 mm. Se realizaron al menos tres mediciones en una muestra proteica fibrosa en cada dirección, paralela y perpendicular al flujo de corte (basado en el plano del flujo de corte - vorticidad, así los planos de fractura resultantes eran los mismos planos vistos con SEM). Debido al carácter fibroso de las muestras, la fractura se produjo a veces de inmediato, y a veces en múltiples etapas, lo que condujo a variaciones entre las mediciones. La deformación de Hencky (ε), el límite de fluencia de tracción (σ) y el módulo de Young (E) se calcularon como se describe en Gunasekaran & Ak, (2003) Cheese Rheology and Texture, CRC Press. El coeficiente de endurecimiento por deformación aparente $n_{deformación}$ se determinó mediante la aplicación de un ajuste de ley de potencia ($\sigma = k \cdot \varepsilon^n$) en la curva σ ε en el intervalo de ε medido de 30 a 100%. Cuando $n_{deformación}$ excede el valor de 1, la muestra exhibe un endurecimiento por deformación.

Ejemplo 1

Una premezcla de proteínas (pH 6.8 - 7.0) que consiste de 30% p/p de caseinato de Ca, TGA (relación enzima-proteína (E:P) 1:20 en base al peso) y agua desmineralizada, se preparó en un mezclador de cocina a baja

velocidad y a temperatura ambiente antes de su procesamiento. Para la conservación se adicionó 1% (p/p) de benzoato de sodio (*ex* Sigma Aldrich, Zwijndrecht, Holanda).

La premezcla de proteínas preparada en un mezclador de cocina se transfirió a la célula de corte precalentada (mostrada en la Figura 1 y descrita en detalle en la descripción anterior en la presente) que se mantuvo a una temperatura constante de 50°C. Después de llenar la célula de corte, la mezcla se sometió al siguiente tratamiento de cizalladura: 4 min a 5 rpm (12 s^{-1}), después un aumento de 5 a 50 rpm (12 a 120 s^{-1}) en 1 min, y 30 min a 50 rpm (120 s^{-1}). En caso de un tratamiento en inactividad, la mezcla se sometió a 5 rpm durante 30 s, y subsecuentemente la célula de corte se detuvo (0 rpm) durante 35 min.

Además, se preparó una muestra de caseinato de Ca en un recipiente de mezcla (W-50) con elementos contra-rotatorios, que se unió al Brabender Do-Corder, a la misma velocidad de rotación que las muestras cizalladas preparadas en el dispositivo de la célula de corte.

(El contenido proteico de las muestras procesadas se determinó por el método de Dumas mediante el uso de un analizador de nitrógeno y proteínas NA2100 (*ex* CE Instruments, Milán, Italia). El factor de conversión nitrógeno-proteína fue 6.38 (ver: Grappin & Lefier, Proc. Int. Dairy Fed. Seminar (1993), Cork; y Guo y otros, Int. Dairy J. 6(5) (1996) 473-483). El contenido de proteínas promedio medido, que fue 28.43% ± 1.12% dentro de un intervalo de confianza del 95%, estuvo de acuerdo con el contenido proteico objetivo de 30%. La muestra de caseinato de Ca mezclada y reticulada tenía un contenido proteico de 35.39%, lo que se atribuyó a la sinéresis).

Después del procesamiento, el material se enfrió en la célula de corte fija a aproximadamente 12°C en ~10 min con un baño de agua.

El material mezclado no se enfrió, pero se tomó una muestra de inmediato a 50°C.

Los materiales procesados se transfirieron a moldes que consisten de dos placas paralelas cuadradas (100 x 100 mm), que proporcionaron una altura controlada de la muestra de 3 mm. Parte del material se usó dentro de 2 h para un análisis posterior (pruebas de tracción y preparación de muestras para SEM), y una parte se almacenó en un refrigerador a 4°C hasta un análisis posterior (mediciones de contenido proteico y LVE).

En cuanto a los aspectos macroestructurales, se observa que la reticulación con TGA durante la cizalladura condujo a macroestructuras fibrosas reales que podrían rasgarse a lo largo de la dirección del flujo de corte. Las estructuras obtenidas eran blancas y brillantes. La Figura 2 representa la muestra proteica cizallada y reticulada después de una prueba de tracción que se realizó en la dirección paralela al flujo de corte en la célula de corte. Pueden observarse fibras macroscópicas individuales que se estima tienen un tamaño típico de < 1 mm después de dispersar una pieza de la muestra durante 1 día en agua desmineralizada, mostradas en la Figura 2B.

La cizalladura de caseinato de Ca al 30% sin TGA resultó en una estructura muy estratificada con un carácter anisotrópico sutil. Después de cizallar exclusivamente la matriz de proteínas, la estructura de color blanco opaco podía despegarse en la dirección del flujo de corte sobre escalas de longitud en el orden de cm. El caseinato de Ca que se reticuló bajo condiciones de inactividad resultó en un gel proteico firme sin ninguna alineación observable.

Por último, el mezclado normal de caseinato de Ca y TGA durante 35 min condujo a la sinéresis y resultó en un gel proteico compacto. Después de la sinéresis, el contenido de proteínas de la muestra restante fue de 35% en lugar del 30% adicionado. Sobre la base de las observaciones macroestructurales, cizallar y reticular con TGA pareció ser esencial para la creación de una estructura fibrosa anisotrópica de caseinato de Ca.

Sobre el efecto de la cizalladura y la reticulación sobre la microestructura, se señala lo siguiente. Las estructuras a micro y nanoescalas de los materiales procesados de caseinato de Ca se estudiaron con SEM. La Figura 3A muestra las imágenes de SEM de caseinato de Ca reticulado cizallado y no cizallado. La alineación inducida por cizalladura fue visible en la microestructura paralela al flujo de corte. La mayor parte de la estructura proteica reticulada no cizallada era muy compacta, y no reveló una clara alineación.

Las estructuras proteicas cizalladas y reticuladas contenían además espacios abiertos y burbujas de aire, lo que permite ver fibras con una clara orientación.

La Figura 3A.3 es un ejemplo de fibras en la superficie de una burbuja de aire. En algunos casos, la orientación de las fibras se desvió de la dirección del corte. Obviamente, las fibras vistas con SEM eran de una escala totalmente diferente de las fibras observadas visualmente en la macroestructura, es decir una escala de nm contra mm, lo que indica una estructura fibrosa jerárquica. Perpendicular al flujo de corte, se observaron dos tipos de microestructuras, a saber, dominios esféricos de proteína densa, que puede representar los extremos de las fibras, y de nuevo estructuras proteicas alineadas (Figura 3B). Esta última alineación puede ser causada por partículas de proteínas encadenadas, o por una proyección ópticamente engañosa del plano observado del gradiente de velocidad-vorticidad. Sin embargo, la alineación en este plano no se observó en una macroescala.

En base a las imágenes, podría deducirse un diámetro de fibra típica de ~100-200 nm.

La microestructura de caseinato cálcico cizallado sin uso de TGA mostró grandes diferencias en comparación con las microestructuras proteicas cizalladas y simultáneamente reticuladas. En una macroescala, no existieron fibras visibles, sino que se formó una estructura estratificada que podía despegarse. En microescala, una orientación sutil podría deducirse a partir del plano paralelo al flujo de corte (Figura 4A), que fue menos clara para el plano perpendicular al flujo de corte (Figura 4B). La red proteica apareció más porosa en comparación con la red proteica reticulada, lo que puede sugerir que el agua libre se localizó en esos poros, o que en el material reticulado había ocurrido un encogimiento de las fibras. El tamaño de los dominios proteicos fue comparable con el tamaño de las esferas que estaban presentes en la red proteica reticulada (~100-200 nm).

La Figura 5 muestra las imágenes de SEM de caseinato de Ca reticulado bajo condiciones de inactividad. Las microestructuras de las superficies de fractura paralela (Figura 5A) y perpendicular (Figura 5B) al flujo de corte imaginario se parecían entre sí. Pueden observarse áreas compactas (~ 0.5 µm), rodeadas de zonas menos compactas que contienen dominios proteicos. La TGA puede haber estado presente en estas áreas compactas, y la reticulación podría haber conducido a tal compacidad acompañada por expulsión de agua libre, que conduce a estructuras proteicas ligeramente dilatadas y porosas entre las áreas compactas.

Por último, el caseinato de Ca mezclado y reticulado produjo una microestructura compacta que consiste en esferas proteicas de ~100 nm, que se muestra en la Figura 6. La compacidad puede explicarse por la sinéresis que ocurrió durante el mezclado. No se observaron diferencias entre la dirección "paralela" elegida aleatoriamente, y la dirección perpendicular correspondiente.

En resumen, en la presencia de TGA, una cizalla simple indujo fuerte anisotropía a una macroescala. Además se observó alineación a una microescala, pero no siempre fue consistente con la dirección del flujo de corte. Sólo la acción combinada de la cizalladura y la TGA produjo estructuras anisotrópicas de caseinato de Ca.

Las propiedades del material de las estructuras de caseinato de Ca cizalladas y reticuladas como se midió fueron las propiedades reológicas y mecánicas. Estas últimas revelaron propiedades anisotrópicas de los materiales proteicos procesados.

La Figura 7 muestra *G'* y tanδ dentro de la región LVE de las diversas muestras de caseinato de Ca. La reticulación enzimática aumentó *G'* mientras que tanδ disminuyó, lo que es típico de estructuras donde se introducen enlaces covalentes. No se encontró diferencia en *G*' ni tanδ entre el tratamiento de cizalladura y de inactividad del caseinato de Ca reticulado. Así, la cizalladura no afectó la formación de enlaces covalentes. La muestra mezclada y reticulada de caseinato de Ca mostró un mayor *G*' y un valor tanδ ligeramente inferior, que puede explicarse por una concentración de proteínas mayor y eficaz. El comportamiento anisotrópico de las muestras de caseinato de Ca cizalladas y reticuladas no se encontró en las propiedades LVE. Sólo la presencia de TGA resultó en diferencias distintas en *G*' y tanδ. Por lo tanto, puede concluirse que las fibras anisotrópicas actuaron como un continuo isotrópico a la escala de longitud probada con pequeñas deformaciones.

La Figura 8 representa curvas típicas de esfuerzo-deformación del comportamiento a la tracción de caseinato de Ca cizallado y reticulado en las dos direcciones relativas al flujo de corte aplicado sobre la muestra durante el procesamiento. Inmediatamente es evidente que tanto el límite (máximo) de fluencia como el límite de deformación en la dirección paralela, y así en la dirección de las fibras, fueron mucho mayores en comparación con los valores en la dirección perpendicular. Además, la curvatura de la curva esfuerzo-deformación para la muestra alargada en la dirección paralela mostró un comportamiento de endurecimiento por deformación, mientras que este no fue el caso para la muestra alargada en la otra dirección.

La Figura 9 ilustra las propiedades de tracción: límite de fluencia σ, límite de deformación ε y módulo de Young *E* para las diversas muestras de caseinato de Ca que se extendieron hasta la fractura. Sobre la base de estas propiedades de tracción, se concluye que el caseinato de Ca que se reticuló y cizalló mostró un grado significativo de anisotropía debido a las grandes diferencias entre las propiedades medidas en la dirección paralela y perpendicular al flujo de corte.

El caseinato de Ca cizallado se comportó de manera anisotrópica, lo que es evidente por las diferencias en σ y ε (la diferencia en *E* no fue significativa).

El caseinato de Ca reticulado bajo condiciones de inactividad no fue anisotrópico, como se observó visualmente y por SEM (Figura 5). Los valores promedios de σ, ε y *E* (Figura 9) coinciden con los valores perpendiculares de caseinato de Ca reticulado y cizallado, lo que indica que la reticulación durante la cizalladura había ocurrido además en la dirección perpendicular al flujo de corte.

El caseinato de Ca mezclado y reticulado no mostró diferencias en las curvas de esfuerzo-deformación medidos de

las muestras alargadas en las direcciones paralelas y perpendiculares. Por lo tanto, los valores promedios de σ, ε y *E* indican que el material era altamente elástico (alto valor de *E*) y dúctil (alto valor de σ).

La Tabla 1 resume las relaciones entre las propiedades de tracción medidas en la dirección paralela y perpendicular al flujo de corte. Como ya se ha mostrado, las muestras fibrosas anisotrópicas eran mucho más fuertes en la dirección paralela en comparación con la dirección perpendicular, lo que se reflejó especialmente por la relación de límite de fluencia $\sigma_{paralelo}/\sigma_{perpendicular}$ (*es decir* ~ 9). Las relaciones del límite de deformación y el módulo de Young fueron de ~2-3 para las estructuras anisotrópicas de caseinato de Ca. Sobre la base de los valores de las relaciones de las propiedades de tracción, el caseinato de Ca cizallado en la ausencia de TGA mostró una ligera anisotropía.

Tabla 1 (Relación de las propiedades de tracción límite de fluencia σ, límite de deformación ε y módulo de Young *E* medidas de manera paralela y perpendicular al flujo de corte. Las muestras anisotrópicas de caseinato de Ca al 30% son: caseinato de Ca cizallado y reticulado (C + TG - Cizalla) y caseinato de Ca cizallado (C - cizalla)). Relación paralelo/perpendicular

	σ	ε	*E*
C + TG - cizalla	9.23	2.60	1.88
C - cizalla	2.27	1.79	1.13

La Tabla 2 enumera los valores de las propiedades de tracción, normalizados con los valores correspondientes de muestras de caseinato de Ca de manera que pueda deducirse el efecto de cizalladura (caseinato de Ca cizallado y reticulado normalizado con caseinato de Ca reticulado bajo condiciones de inactividad), y de la TGA (caseinato de Ca cizallado y reticulado normalizado con caseinato de Ca cizallado sin TGA). Tanto la cizalladura como la TGA afectaron las propiedades de tracción en la dirección paralela en gran medida, y así en la dirección de las microestructuras anisotrópicas. Aún más, al considerar los valores normalizados del límite de fluencia, el efecto de refuerzo de la cizalladura (en la presencia de TGA) fue casi dos veces mayor que el efecto de TGA solamente. Esto puede explicarse por un efecto sinérgico de la cizalladura y la TGA.

Desafortunadamente, no pudo determinarse el efecto de la cizalladura en caseinato de Ca no reticulado, ya que no pudieron medirse las propiedades mecánicas del caseinato de Ca sin cizalladura ni reticulación debido a la débil estructura. Los efectos tanto de cizalladura como de TGA fueron insignificantes para las propiedades de tracción normalizadas en la dirección perpendicular, ya que los valores normalizados estaban cerca de 1.

Tabla 2 (Propiedades de tracción normalizadas límite de fluencia σ, límite de deformación ε y módulo de Young E para la dirección paralela y perpendicular medidas. La muestra de caseinato de Ca cizallado y reticulado (C + TG - cizalla) se normalizó con caseinato de Ca reticulado en condiciones de inactividad (C + TG - sin cizalla), y con el caseinato de Ca cizallado (C - cizalla), que conduce al efecto de cizalla y TGA, respectivamente).

	Paralelo, normalizado			Perpendicular, normalizado		
	σ	ε	*E*	σ	ε	*E*
Efecto de cizalla	7.74	2.59	1.58	0.84	1.00	0.84
Efecto de TGA	3.54	1.34	1.35	0.93	0.87	0.81

(Efecto de cizalla= $(C+TG)_{cizalla}/(C+TG)_{no\ cizalla}$; Efecto TGA = $(C+TG)_{cizalla}/(C)_{cizalla}$)

La Tabla 3 proporciona una visión general de las características macro-, microestructurales y mecánicas más importantes de las estructuras discutidas de caseinato de Ca después de cizalladura, mezcla, o tratamiento de inactividad, con o sin TGA. Puede observarse que tanto la cizalladura como la reticulación enzimática fueron esenciales para la formación de materiales fibrosos de caseinato de Ca. En la Tabla 3, los aspectos macro-, microestructurales y mecánicos se denotan con "macro", "micro" y "mecánico".

Tabla 3

	Propiedad	Caseinato de Ca	Caseinato de Ca + TG
Cizalla	Macro	Estratificado	Fibras < 1 mm
	Micro	Apenas orientación, dominios proteicos -~60-120 nm	Fibras ~100-200 nm
	Mecánica	Ligeramente anisotrópico	Fuertemente anisotrópico
Inactivo	Macro	Isotrópico, granulado*	Isotrópico

	Propiedad	Caseinato de Ca	Caseinato de Ca + TG
	Micro		Dominios de proteína ~50-100 nm y parches ~ 200-700 nm
	Mecánico		Isotrópico
Mezclado	Macro		Fibras < 1 mm
	Micro		Dominios de proteína 100 nm
	Mecánica		Isotrópico

* La muestra no fue lo suficientemente adherente para realizar SEM y análisis mecánico.

Ejemplo 2

Una solución o dispersión que contiene proteínas se preparó de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1, donde la premezcla de proteínas puede contener ya sea 25% o 30% (p/p) de caseinato de Ca. La concentración absoluta de enzima [E_0] fue igual para ambas concentraciones de caseinato de Ca, lo que condujo a relaciones enzima:proteína (E:P) de 1:20 y 1:17 para las soluciones de 30% y 25% de caseinato de Ca, respectivamente.

Durante el procesamiento (50°C), el rojo Nilo (72485, Sigma Aldrich), un colorante fluorescente para grasa para Microscopía Confocal de Barrido por Láser, se añadió a la grasa de palma fundida en una concentración de 0.1 g L-1. De esta solución sin diluir, 15% v/v se mezcló por poco tiempo a mano con una cantidad apropiada de la premezcla de proteínas antes de transferir la mezcla de proteína y grasa al dispositivo de la célula de corte.

La premezcla combinada de proteína y grasa se transfirió al dispositivo de célula de corte pre-calentado (50°C). Después de llenar la célula de corte, la mezcla se sometió al siguiente tratamiento de cizalla: 4 min a 5 rpm (12 s^{-1}), después un aumento en un minuto de 5 rpm a un valor de rpm deseado (10, 50 o 100 rpm, que son equivalentes a 24, 120 y 240 s^{-1}, respectivamente) durante un período de tiempo establecido. A este período de tiempo establecido se hará referencia como el tiempo de corte. Después del procesamiento, el material se enfrió en la célula de corte fija a aproximadamente 12°C en ~10 min. Las curvas de torque medido se calibraron de acuerdo con el valor de torque medido en t = 0.

Los materiales procesados se transfirieron a moldes que consisten de dos placas paralelas cuadradas (100 x 100 mm), que proporcionaron una altura controlada de la muestra de 3-5 mm. Parte del material se usó dentro de 2 h para un posterior análisis (pruebas de tracción y preparación de muestras para SEM), y una parte se almacenó a 4°C antes de un análisis posterior (CSLM, mediciones LVE, y de fluencia).

Las condiciones del proceso y la composición del material determinaron si se formó o no un material fibroso a partir de caseinato de Ca y grasa. Por lo tanto, el efecto de la velocidad de corte, el tiempo de corte y la concentración de proteínas se discutirán en términos de los aspectos de procesamiento y las propiedades estructurales consiguientes en diferentes escalas de longitud.

En cuanto al efecto del tiempo de corte y la concentración de proteínas sobre estructuras de caseinato de Ca y grasa, se observa que sólo la reticulación enzimática en combinación con la cizalladura condujo a estructuras fibrosas de caseinato de Ca y grasa. La presencia de grasa indujo anisotropía a una escala de longitud adicional en las estructuras, que de esta manera produce estructuras jerárquicas de proteína y grasa. La formación de estructuras fibrosas fue dependiente del tiempo, que mostró una transición gradual de una estructura fibrosa a una estructura dañada acompañada por sinéresis cuando se excedió un cierto tiempo de corte.

La cizalladura de caseinato de Ca al 30% y grasa al 15% en la presencia de TGA a una velocidad de corte y tiempo de corte fijos (120 s^{-1} y 30 min) resultó en una macroestructura fibrosa como se muestra en la Figura 11A. El material fibroso pudo separarse fácilmente a mano (fibras <1 mm). En contraste, cuando el caseinato de Ca y grasa se cizallaron en ausencia de TGA, se observó una macro-estructura homogénea sin ninguna orientación inducida por el flujo de corte.

La Figura 12 muestra curvas de torque típicas en función del tiempo de corte (total) durante la cizalladura de caseinato de Ca y grasa en el dispositivo de la célula de corte. La presencia de TGA aumentó la respuesta de torque debido a la creación de enlaces covalentes en la fase proteica. El torque medido para el caseinato de Ca al 25% fue ligeramente inferior en comparación con el caseinato de Ca al 30%. A pesar de que la composición de las muestras reticuladas fue similar (caseinato de Ca al 30%, grasa al 15% y TGA (1:20)), las curvas de torque muestran cierta variación. Sin embargo, se observó una clara tendencia: después de un valor de torque relativamente constante, el torque aumentó de repente tanto para el caseinato de Ca al 30% como al 25% después de 45 min y 30 min (tiempo de corte total) respectivamente, que sugiere un cambio drástico en las propiedades del producto. Las muestras

correspondientes con estas curvas eran estructuras dañadas y estuvo presente líquido expulsado (sinéresis) como se muestra en la Figura 11B. A primera vista, las estructuras no parecían fibrosas, pero después de un cuidadoso examen, todavía podían observarse algunas piezas fibrosas. La transición de una estructura fibrosa a una dañada no es un proceso controlado. Un tratamiento duplicado de cizalladura a 120 s^{-1} durante 30 min de caseinato de Ca al 25% y grasa resultó en una macroestructura menos dañada, con claras partes fibrosas y sólo cierta sinéresis.

En conclusión, sólo en condiciones específicas de tiempo de corte, en dependencia de la concentración de proteínas, podrían obtenerse estructuras fibrosas.

En cuanto a la microestructura, las imágenes de SEM en la Figura 13 ilustran la microestructura de caseinato de Ca al 30% y grasa después de la cizalladura y la reticulación mediante el uso de TGA (1:20). Las diferencias entre los planos paralelos (Figura 13.A1-A2) y perpendiculares (Figura 13.B1-2) al flujo de corte son muy distintas para el material cizallado y reticulado de manera simultánea. Las fibras compactas se formaron en la dirección paralela al flujo de corte con un tamaño de fibra típico de ~100-200 nm. En espacios abiertos en la estructura o en la superficie interior de burbujas de aire, las fibras podrían distinguirse mejor. La dirección de las fibras en la superficie interior de las burbujas de aire difirió a veces de la dirección de corte lo que indica perturbaciones locales del flujo de corte, como se muestra en la Figura 13.A2. Perpendicular al flujo de corte, se observaron algunas partículas proteicas y algunas estructuras "fundidas" (Figura 13.B2) en que la proteína parecía cubierta por la fase de grasa. En la estructura se encontraron varios glóbulos de grasa, pero en general sólo pequeñas cantidades de grasa pudieron encontrarse por SEM, lo que podría atribuirse a la escala de longitud observada con SEM (en dependencia del aumento empleado). Adicionalmente, el método de preparación de las muestras para SEM, tal como la inmersión de las estructuras de caseinato y grasa en líquidos orgánicos (DMSO, etanol), probablemente causó la pérdida de grasa.

A un nivel mesoestructural, imágenes de CSLM de caseinato de Ca al 30% cizallado y reticulado revelan que la presencia de la fase de grasa indujo anisotropía en una escala de longitud adicional, lo que hizo a las estructuras aún más jerárquicas. En la Figura 14.A3 se distinguieron dos tipos de estructuras de grasa en materiales de caseinato de Ca al 30% y grasa, obtenidas después de 30 min de cizalladura a 120 s^{-1}. Se observaron gotitas de grasa dispersas relativamente pequeñas y grandes, así como capas de grasa alargadas en la dirección del corte. Sobre la base de varias muestras procesadas de manera independiente, pudo observarse que la grasa estaba presente sobre todo en forma de gotitas, pero además en un estado deformado basado en los valores del parámetro de deformación (D) (Figura 14.B3-4). Las gotitas de grasa muy pequeñas causaron un cierto grado de estructura en la fase proteica con una orientación paralela o inclinada con respecto a la dirección del corte. Puede estimarse un espesor típico de la capa proteica de ~ 40 µm (que consiste así de ~200 fibras proteicas individuales), y un espesor de la capa de grasa de ~ 10 µm.

La Figura 14.A1 muestra la mesoestructura isotrópica de caseinato de Ca al 30% y grasa cizallado sin TGA que consiste de una fase proteica continua con gotitas de grasa dispersas. Las distribuciones acumulativas promedio (máximo) del diámetro de gotitas de grasa y el parámetro de deformación D indican que sin TGA, las gotitas de grasa eran más grandes en tamaño y menos deformadas en comparación con las estructuras fibrosas que contenían TGA (Figura 14.B2-4).

El efecto del tiempo de corte (15 y 30 min) a una velocidad de corte constante de 120 s^{-1} para caseinato de Ca al 30% se ilustra en la Figura 14.A2-3. Después de 5 y 15 min de cizalladura de caseinato de Ca al 30% y grasa, ya se observaron macroestructuras fibrosas a simple vista. Sin embargo, a excepción de cierta orientación de gotitas de grasa esto no es evidente a partir de la imagen de CSLM como se muestra para 15 minutos de cizalladura, en comparación con la muestra de referencia que se cizalló durante 30 min. Las áreas negras en las imágenes de CSLM obtenidas después de 15 minutos de la cizalladura indican que estaban presentes inclusiones de aire en esta muestra, que además se observó para 5 min de cizalladura. El diámetro de las gotitas de grasa disminuyó con el aumento del tiempo de corte, mientras que *D* mostró poca variación (Figura 14.B1-3).

Al disminuir el contenido de proteínas a 25% (E:P aumentó a 1:17), ya después de 17 minutos de cizalladura se creó una macroestructura fibrosa, que exhibió alineación de gotitas de grasa finamente dispersas como se muestra en la Figura 14.A4. Las gotitas eran más pequeñas en comparación con las gotitas en las estructuras con mayor contenido de proteínas (Figura 14.B1), y no se observaron capas de grasa. En conclusión, el desarrollo de las estructuras de grasa a mesoescala evoluciona durante una estrecha ventana de tiempos de corte, es decir entre 15 y 60 min para caseinato de Ca al 30%. Una disminución en la concentración de proteínas incluso reduce esta ventana del proceso de tiempos de corte para obtener estructuras fibrosas.

Las propiedades LVE (*G*' y tanδ) de los materiales de caseinato de Ca y grasa se representan gráficamente en la Figura 15 en función del tiempo de corte. Para las estructuras fibrosas de caseinato de Ca al 30% y grasa, se midió un aumento moderado en G' en función del tiempo de corte, y así el tiempo de reacción de reticulación. El aumento en G' puede explicarse por el aumento en enlaces covalentes. La disminución en el contenido de proteínas a 25% de caseinato de Ca resultó en un valor ligeramente inferior de G' del material de caseinato de Ca al 25% y grasa después de 17 min de cizalladura.

La estructura cizallada de caseinato de Ca y grasa en ausencia de TGA, que resultó en una estructura dispersa homogénea, muestra un valor menor de G' y uno mayor de tanδ en comparación con las muestras reticuladas con TGA. Es notable que tanδ ya disminuyera después de 5 minutos de cizalladura al valor que se mantuvo constante tras la cizalladura continua. Esto indica que *G*" aumentó rápidamente dentro de 5 min de cizalladura, y aún más al seguir la misma tendencia que *G*'.

La Tabla 4 resume los valores de *n* derivados a partir de un ajuste de ley de potencia para las curvas de frecuencia de G' de todas las muestras.

Tabla 4: Valores de n, extraídos a partir de un ajuste de ley de potencia a G' en función de la frecuencia ($G' \propto \omega^n$) con valores de R^2 para muestras de caseinato de Ca tratadas en diversas condiciones. Las muestras no fibrosas se denotan con un asterisco.

Caseinato de Ca	Relación	Tiempo de corte	Velocidad de corte	N	R^2
(%)	E:P	(min)	(s^{-1})	(de $G' \propto \omega^n$)(-)	(-)
30	0	30 *	120 *	0.22 *	0.983
				0.29 (ω< 1Hz)	0.991
				0.19 (ω> 1Hz)	0.996
30	1:20	5	120	0.14	0.988
30	1:20	15	120	0.13	0.965
30	1:20	30	120	0.13	0.994
25	1:17	17	120	0.13	0.988
30	1:20	30 *	24 *	0.15 *	0.909
30	1:20	30	240	.14	0.987

Los espectros mecánicos en términos de valores de *n* fueron apenas influenciados por el tiempo de corte o velocidad de corte, y parecían depender sólo de la composición de los materiales. La presencia de enlaces covalentes en los materiales influyó en la pendiente del gráfico log-log al comparar las muestras reticuladas con la muestra de caseinato de Ca al 30% no reticulado, que se comportaba menos como un material sólido. Ya 5 min de cizalladura en presencia de TGA indujo el cambio más grande en el valor de *n* del material de caseinato de Ca y grasa en comparación con el material no reticulado.

La Figura 16A representa el efecto del tiempo de corte sobre las curvas normalizadas de *G'* en función de la deformación, normalizadas con los correspondientes valores de *G*" de la región LVE para muestras de caseinato de Ca al 30% y grasa. Para las muestras fibrosas basadas en caseinato de Ca al 30%, no puede deducirse una tendencia clara para el límite de la región LVE en función del tiempo de corte. La muestra homogénea y no reticulada de caseinato de Ca al 30% mostró una disminución más pronunciada en el régimen no lineal en comparación con las muestras fibrosas, lo que indica que el material homogéneo se afectó más bruscamente a valores altos de deformación probablemente debido a la presencia de enlaces no covalentes más débiles.

Las curvas de fluencia, que incluyen los ajustes con el modelo de Burgers de 6 elementos, de los materiales de caseinato de Ca y grasa se muestran en la Figura 17, que exhiben la forma típica de los materiales viscoelásticos. El aumento en el tiempo de reticulación, y así el aumento en enlaces covalentes, resultó en una disminución de la capacitancia elástica, que es inversamente proporcional al módulo elástico. Más aún, el caseinato de Ca y grasa no reticulados pero cizallados se comportaron más viscosos en comparación con los materiales reticulados, lo que se representa en el inserto en la Figura 17.

La Tabla 5 resume los parámetros ajustados J_1, η_1 y los tiempos de retardo τ_2 y τ_3 a partir del modelo de Burgers.

Tabla 5 Parámetros de fluencia ajustados que incluyen las desviaciones estándar a partir del modelo de Burgers de 6 elementos. El modelo se ajustó a las curvas de fluencia que se midieron a 20°C dentro de la región LVE. Las muestras no fibrosas se denotan con un asterisco:

Tabla 5

Cas Ca (%)	Relación E:P	Tiempo de corte (min)	γ (s^{-1})	J_1 (10^{-5} Pa^{-1})	η_1 (10^{-6} Pa.s)	τ_2(=G_2/η_2) (s)	τ_3(=G_3/η_3) (s)
30	-	30*	120*	15.9 ± 0.7*	0.8 ±0.4*	6122 ± 8241*	127 ± 15*
30	1:20	5	120	4.0 ± 0.2	11.3 ± 1.7	260 ± 11	11 ± 1
30	1:20	15	120	4.0 ± 0.5	15.5 ± 0.9	256 ± 13	10 ± 1
30	1:20	30	120	3.2 ± 0.9	27.7 ± 16	214 ± 17	8 ± 1
25	1:17	17	120	5.5 ± 0.05	10.1 ± 0.9	261 ± 12	9 ± 1
30	1:20	30*	24*	2.3 ± 0.4*	29.6 ± 11.9*	210 ± 34*	8 ± 1*
30	1:20	30	240	3.5 ± 0.5	26.0 ± 6.1	200 ± 28	8 ± 1

La gran disminución en J_1 y los tiempos de retardo, y el aumento de η_1 después de 5 min de cizalladura y reticulación en comparación con el material no reticulado indica claramente que la presencia de TGA tuvo el mayor efecto sobre los parámetros de fluencia. El fuerte descenso en los tiempos de retardo indica que la matriz de caseinato de Ca se transformó rápidamente por la enzima de una matriz proteica más o menos viscosa a un material elástico. La presencia de enlaces covalentes resultó en menos moléculas móviles dentro de las estructuras, y una mayor resistencia a fluir a escalas de tiempo más largas como se refleja por un aumento en η_1. El aumento adicional en el tiempo de corte (reacción) tuvo un efecto decreciente sutil sobre J_1, τ_2 y τ_3. Debe señalarse que los parámetros G_2, G_3, τ_2 y τ_3, que determinan los tiempos de retardo, aumentaron con el aumento del tiempo de corte.

La Figura 18 representa las propiedades mecánicas (límite de fluencia σ, límite de deformación s, módulo de Young *E* y coeficiente de endurecimientos de deformación aparente *n*) en función del tiempo de corte para materiales fibrosos de caseinato de Ca al 25% y 30% y grasa. Las propiedades mecánicas del material no reticulado de caseinato de Ca al 30% y grasa se incluyen además en la Figura 18. Ya después de 5 min. de cizalladura a 120 s^{-1}, se observó anisotropía en el material de caseinato de Ca al 30% y grasa ya que las propiedades mecánicas en paralelo y perpendicular a la dirección de la fibra mostraron diferencias. Más aún, las propiedades mecánicas medidas en la dirección perpendicular permanecieron más o menos constantes en función del tiempo de corte. Esto indica que el refuerzo de las estructuras fibrosas a través de enlaces covalentes ocurrió principalmente en la dirección del flujo. La anisotropía, caracterizada por el límite de fluencia en la dirección paralela, aumentó drásticamente al aumentar el tiempo de corte para el caseinato de Ca al 30% y grasa. Las propiedades mecánicas del caseinato de Ca al 25% y grasa, cizallado durante 17 min, fueron más o menos similares a las propiedades de la muestra de caseinato de Ca al 30% que se cizalló durante 15 min. El material no reticulado basado en caseinato de Ca al 30% y grasa se comportó como un material isotrópico para todos los parámetros de tracción. De manera sorprendente, las propiedades mecánicas del material isotrópico no reticulado igualaron más o menos las propiedades mecánicas de los materiales fibrosos medidas de manera perpendicular al flujo de corte. Esto implica de nuevo que no se formaron enlaces covalentes perpendiculares al flujo de corte. El módulo de Young comenzó a aumentar después de 15 minutos de cizalladura (caseinato de Ca al 30%), mientras que el límite de deformación y el coeficiente de endurecimientos por deformación aumentaron en los primeros 15 minutos de cizalladura, y se mantuvo constante después de eso. Generalmente, los materiales fibrosos de caseinato de Ca al 30% y grasa se volvieron más dúctiles y mostraron endurecimiento por deformación en la dirección de la fibra (aumento del límite de fluencia y límite de deformación), mientras que permanecieron quebradizos (bajo límite de fluencia y límite de deformación) en la dirección perpendicular.

La Tabla 6 resume el efecto del tiempo de corte sobre la relación de las propiedades mecánicas medidas de manera paralela y perpendicular a la dirección de la fibra, que puede interpretarse como una medida de la calidad de la fibra. Un aumento en el tiempo de corte afectó todos los cuatro parámetros mecánicos de los materiales fibrosos de caseinato de Ca al 30% de manera positiva, de los que el límite de fluencia fue el que aumentó principalmente. Cabe destacar que la relación más grande de límite de fluencia se encontró para la estructura fibrosa con menor contenido proteico (caseinato de Ca al 25%).

Tabla 6: Efecto del tiempo de corte y la velocidad de corte sobre la relación de las propiedades de tracción de materiales fibrosos y no fibrosos de caseinato de Ca y grasa, medidas de manera paralela y perpendicular al flujo de corte (a 120 s^{-1}) ejercido en el dispositivo de la célula de corte. Las muestras no fibrosas se denotan con un asterisco.

Ca-cas (%)	Relación E:P	Tiempo de corte (min)	Límite de fluencia $\sigma_{//}/\sigma_{\perp}$(-)	Límite de deformación $\varepsilon_{//}/\varepsilon\perp$(-)	Módulo de Young $E_{y.//}/E_{y.\perp}$(-)	Ap. endurecimiento por deformación $n_{8.//}/n_{8.\perp}$(-)
30	-	30*	1.44*	1.29*	1.02*	1.09*
30	1:20	5	2.70	1.73	1.49	1.16
30	1:20	15	7.03	2.12	1.5	1.72
30	1:20	30	8.19	2.59	1.54	1.96
25	1:17	17	13.02	2.90	1.87	1.85

Después de investigar el efecto del tiempo de corte a una velocidad de corte constante, se exploró la influencia de la velocidad de corte en un tiempo de corte fijo de 30 min sobre la formación de estructuras fibrosas basadas en caseinato de Ca al 30%, grasa al 15% y TGA (1:20). La velocidad de corte pareció ser un parámetro del proceso para controlar tanto la formación de estructuras fibrosas como el grado de fibrosidad.

La Figura 19 muestra el efecto de tres velocidades de corte sobre el torque en función del tiempo de corte durante el procesamiento de caseinato de Ca al 30%, grasa y TGA en la célula de corte. Un aumento en la velocidad de corte causó una mayor respuesta de torque, que fue válida hasta un tiempo (total) de corte de 25 min. Sin embargo, a 24 s^{-1}, la curva de torque aumentó de repente, de manera similar a como se observó previamente para 30 min y 60 min de cizalladura a 120 s^{-1} de caseinato de Ca al 30% y 25% y grasa, respectivamente. En los dos últimos casos, las estructuras dañadas y la sinéresis fueron el resultado de un exceso de cizalladura de una estructura fibrosa. Después de cizallar durante 30 min a 24 s^{-1}, se observó una macroestructura isotrópica acompañada de cierta grasa expulsada y una sinéresis sutil. Probablemente no se indujo ninguna alineación en el material de caseinato de Ca y grasa a baja velocidad de corte antes de desintegrarse. Parece que el aumento repentino en los perfiles de torque medidos puede ser indicativo ya sea de una desintegración o de la formación de una estructura isotrópica durante la cizalladura, que con ello expulsa una fase rica en agua o grasa. Tanto la cizalladura a 120 s^{-1} (muestra de referencia que se discutió anteriormente) como a 240 s^{-1} resultó en materiales fibrosos, de los que el último pareció cualitativamente más fibroso en comparación con el primero. Al comparar la velocidad de corte baja e intermedia, la curva de diámetro acumulativo promedio de gotitas para la velocidad de corte baja (24 s^{-1}) indicó la presencia de gotitas de grasa de menor tamaño en la mesoestructura, mientras que las curvas acumulativas promedio del parámetro D fueron las mismas (Figura 14.B2-4). La mesoestructura obtenida a la mayor velocidad de corte de 240 s^{-1} mostró estructuras dispersas con gotitas de grasa aleatorias, así como estructuras de grasa alineadas en capas (~ 10 µm de espesor) en la dirección del flujo de corte. No pudo deducirse un efecto claro de la velocidad de corte sobre el diámetro y D cuando se toman en cuenta todas las velocidades de corte investigadas. No se encontraron variaciones en las propiedades LVE de los materiales fibrosos como el tiempo de reacción de TGA, lo que sugiere que el número de enlaces covalentes fue igual para cada velocidad de corte. A baja velocidad de corte, el material isotrópico obtenido tuvo un valor de G' ligeramente mayor, lo que puede explicarse por la presencia de una red de proteínas más interconectadas ya que no todos los enlaces cruzados se crearon en la dirección del flujo de corte. La Figura 16B, que muestra las curvas normalizadas de G' en función de la deformación, muestra que el límite de la región LVE de la muestra no fibrosa (24 s^{-1}) fue mucho mayor en comparación con el límite LVE de muestras fibrosas (120 y 240 s^{-1}), lo que implica que la deformación que limita la región LVE podría usarse como una medida de anisotropía. La velocidad de corte apenas afectó los parámetros de fluencia como se muestra en la Tabla 5.

La Figura 20 resume el efecto de la velocidad de corte sobre las propiedades mecánicas. Generalmente, los grandes intervalos de confianza de 95% pueden explicarse por la fractura por etapas y gradual de muestras fibrosas, especialmente en paralelo con la dirección de la fibra. En base a las propiedades mecánicas medidas de manera paralela y perpendicular al flujo de corte, puede concluirse que el material de caseinato de Ca al 30% y grasa obtenido a una baja velocidad de corte (24 s^{-1}) se comportó como un material isotrópico. El módulo de Young de esta muestra confirmó que el material era muy elástico en comparación con los materiales fibrosos creados a mayores velocidades de corte. El límite de fluencia, el límite de deformación y el coeficiente de endurecimiento por deformación aparente, medidos de manera paralela a la dirección de las fibras aumentó con el aumento de la velocidad de corte, mientras que el módulo de Young disminuyó. Las propiedades mecánicas determinadas de manera perpendicular a la dirección del flujo disminuyeron ligeramente con el aumento de la velocidad de corte en la transición de materiales isotrópicos a anisotrópicos (*es decir* entre 24 y 120 s^{-1}). Después de la transición, las propiedades mecánicas de los materiales anisotrópicos determinadas de manera perpendicular a la dirección de las fibras apenas se afectaron por la velocidad de corte.

Al considerar todos los parámetros del proceso (velocidad de corte y tiempo de corte), puede concluirse que todas las propiedades mecánicas de los materiales fibrosos anisotrópicos medidos de manera perpendicular al flujo de

corte fueron similares e independientes del tratamiento. Aún más, estas propiedades mecánicas igualaron las del material isotrópico no reticulado de caseinato de Ca al 30% y grasa. Esto confirma que no se crearon enlaces covalentes en el plano de vorticidad - flujo de corte en los materiales fibrosos, que en parte se ve obstaculizado por la presencia de grasa. La Tabla 7 resume las relaciones de las propiedades mecánicas de los materiales fibrosos medidas de manera paralela y perpendicular a la dirección de las fibras. Sobre la base de estas relaciones, el material de caseinato de Ca al 30% y grasa, formado a la más alta velocidad de corte (240 s^{-1}) fue el más fibroso, lo que sugiere que la velocidad de corte puede usarse para controlar la fibrosidad de materiales de proteína y grasa cizallados y reticulados.

Tabla 7: Efecto de la velocidad de corte sobre la relación de las propiedades de tracción de materiales fibrosos y no fibrosos de caseinato de Ca al 30% y grasa, medidas de manera paralela y perpendicular al flujo de corte ejercido en el dispositivo de la célula de corte (durante 30 min). Las muestras no fibrosas se denotan con un asterisco.

Ca-cas (%)	Relación E:P	Velocidad de corte (s)	Límite de fluencia $\sigma_{//}/\sigma_{\perp}$(-)	Límite de deformación $\varepsilon_{//}/\varepsilon_{\perp}$(-)	Módulo de Young $E_{//}/E_{\perp}$(-)	Ap. endurecimiento por deformación $n_{//}/n_{\perp}$(-)
30	1.20	24*	1.22*	1.08*	1.06*	1.09*
30	1:20	120	8.19	2.59	1.54	1.96
30	1:20	240	14.18	3.58	1.52	2.42

Ejemplo 3

Una premezcla de caseinato de Ca al 20% (que contenía por cada 100 g 72 g de agua desmineralizada que contenía benzoato de Na + 0.5 g de xantano + 7.5 g de solución de TGA + 20 g de caseinato de Ca) que contenía 0.5% de xantano (= muestra 1) se preparó al mezclar primero xantano y benzoato de Na al 1% en agua desmineralizada durante ~ 10 min a 30-40°C y subsecuentemente durante otros ~50 min a temperatura ambiente. Después se adicionó la solución de TGA al 20% (para obtener una relación final de enzima con respecto a proteína (E:P) de 1:20) a la solución de xantano y se mezclaron por poco tiempo antes de adicionar esta dispersión altamente viscosa, que contenía varias partículas no disueltas similares a un gel, a la proteína. Además, se preparó una premezcla de caseinato de Ca al 30% con una menor cantidad de TGA: (E:P = 1:40) y que excluyó benzoato de Na (= muestra 2). Todos los componentes se mezclaron en un mezclador de cocina a baja velocidad y a temperatura ambiente antes de transferir la premezcla a la célula de corte precalentada (50°C). Ambas mezclas se cizallaron de la siguiente manera: 4 min a 5 rpm, 1 min en donde las rpm aumentan de 5 a 50 rpm, y un periodo de tiempo establecido a 50 rpm, que fueron 34 min para la mezcla de caseinato de Ca al 20% y xantano y 15 min para la muestra de caseinato de Ca al 30%. Después de la cizalladura, las muestras se enfriaron durante 15 min hasta que se alcanzó una temperatura ~ 12°C. No se realizó el análisis de los materiales.

La cizalladura de caseinato de Ca al 20% y xantano (muestra 1) resultó en una macroestructura fibrosa (Fig. 22) con una textura firme. La cizalladura de caseinato de Ca al 20% (con TGA 1:10 y 1:20, y en la presencia de grasa) en la ausencia de xantano no condujo a materiales fibrosos.

La exclusión del componente menor de benzoato de Na y la disminución de TGA (muestra 2) produjo un material isotrópico que exhibió mayor sinéresis (~ 25% del peso inicial). El material es muy elástico. Debido al color amarillo, se asemeja al caseinato de Na después del procesamiento. Una concentración más alta de TGA (1:20) en ausencia de benzoato de Na resultó en una estructura similar.

Ejemplo 4

En analogía con el Ejemplo 1 mezclas de caseinato de Ca y caseinato de Na se someten a cizalla simple. Los resultados se presentan en la Tabla 8. La Tabla 8 proporciona una visión general de las mezclas de caseinato de Ca y caseinato de Na con benzoato de Na (I ~ 70 mM) como se analizó mediante el uso de reología y en la célula de corte. Para muestras exitosas, fibrosas, se presentan las relaciones de las propiedades de tracción.

Tabla 8

	Composición			***Reología***	***Célula de corte***					***Analizador de textura***			***Regla de escala***
	Tot. prot. (g)	**CA (g)**	**NA (g)**	**τ (s)**	**Velocidad de corte (rpm)**	**Velocidad de corte (s^{-1})**		**Tiempo (min)**	**Estructura**	**Relación de esfuerzo (-)**		**Relación de deformación (-)**	**Velocidad de corte predicha (s^{-1})**
Ref 30NA[a]	30	0	30	0.004 5	50	120		35	Iso		-		1.6E+04
CN-9	**30**	**28.5**	**1.5**	**8.00**	**50**	**120**		**20**	**Aniso**	**10.0**		**2.2**	**9**
CN-10	30	29	1	6.37			-				-		11
Ref 30CA	30	30	0	0.61	50	120		35	Aniso	9.2		2.6	
Ref 30CA nueva	30	30	0	0.18	50	120		35	Aniso	9.2		2.6	
CN-8/Ref 25CA	**25**	**25**	**0**	**0.72**	**50**	**120**		**20**	**Aniso**	**8.4**		**2.2**	**102**
Ref 20CA	20	20	0	0.19			-				-		382

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de estructuras alimenticias fibrosas jerárquicas, que comprende someter una suspensión de proteínas comestibles a flujo de cizalla simple y a reticulación enzimática durante la cizalladura.

2. El proceso de la reivindicación 1 en donde la proteína comestible es o se basa en caseínas, soya y otras proteínas vegetales que pueden derivarse de semillas oleaginosas, proteínas vegetales generalmente, concentrados de proteína de suero de leche, permeados de suero de leche, proteínas de la leche, proteínas de patata y/o ovoalbúminas.

3. El proceso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la proteína comestible está basada en caseína, y preferentemente es caseinato cálcico.

4. El proceso de la reivindicación 3, en donde la reticulación enzimática se lleva a cabo mediante el uso de transglutaminasa.

5. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la grasa está presente en la suspensión, preferentemente en una cantidad de hasta 30% en peso, con mayor preferencia hasta 20% en peso.

6. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende la adición de polisacáridos, y preferentemente un polisacárido seleccionado a partir del grupo que consiste de xantano, carragenina, galactomanana, goma de guar, goma tara, goma de algarrobo, goma arábiga, pectina, celulosa que incluye carboximetilcelulosa, metilcelulosa e hidroxipropilcelulosa, y almidones que incluyen almidones modificados, a la suspensión.

7. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la suspensión comprende además de 0.1 a 10% en peso, preferentemente de 0.1 a 4% en peso, de una sal seleccionada a partir de lactato sódico, citrato sódico, fosfato sódico, y otras sales que tienen una afinidad comparable para la unión con calcio.

8. El proceso de la reivindicación 7, en donde la sal se selecciona del grupo que consiste de benzoato sódico, D-lactato sódico, citrato sódico, y polifosfato trisódico.

9. Una estructura fibrosa jerárquica de proteína comestible obtenible por el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que tiene anisotropía a microescala y a macroescala.

10. Partículas fibrosas sueltas que tienen una forma de fibra anisotrópica a microescala, obtenibles por el proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

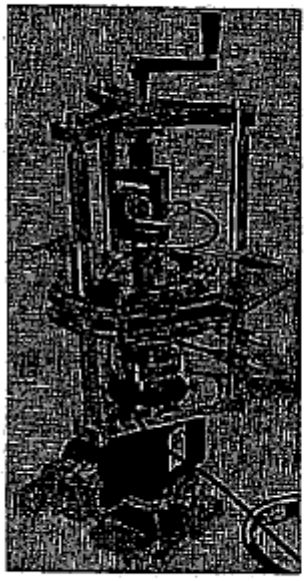
11. La estructura fibrosa de cualquiera de las reivindicaciones 9-10, basada en caseinato reticulado por transglutaminasa.

12. La estructura fibrosa de cualquiera de las reivindicaciones 9-11, que tiene una relación de límite de fluencia $\sigma_{paralelo}/\sigma_{perpendicular}$ de al menos 6, preferentemente al menos 7 y más

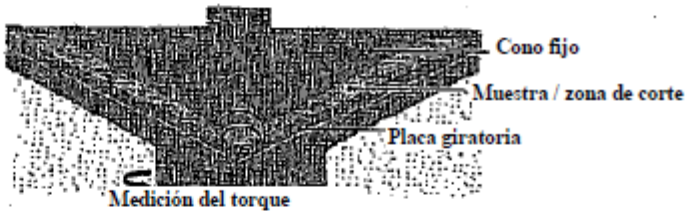
13. El uso de la estructura de cualquiera de las reivindicaciones 9-12 en la fabricación de alimentos, preferentemente para usar la estructura jerárquica para crear una estructura similar a carne o pescado.

14. Un uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde las partículas fibrosas sueltas se usan para ajustar la viscosidad y/o el comportamiento tixotrópico y/o de flujo del alimento.

Figura 1



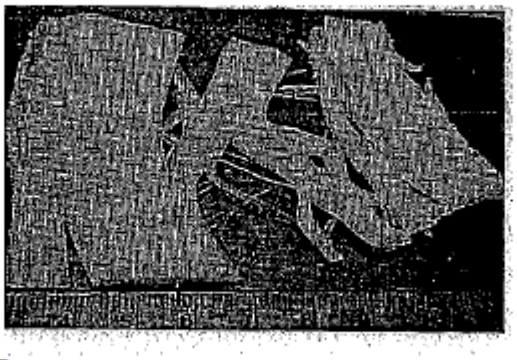
1a



1b

Figura 2

A.



B.

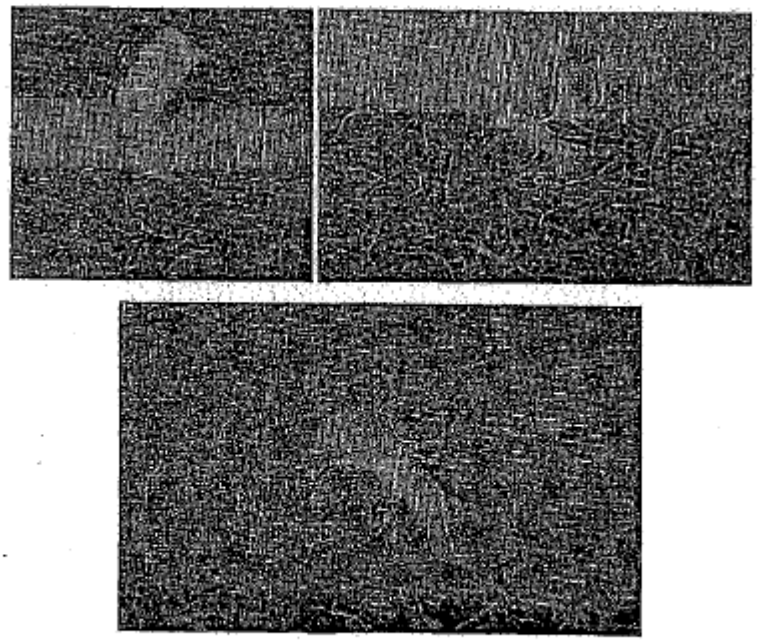


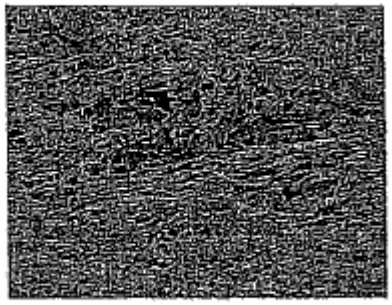
Figura 3

Caseinato de Ca + Tgasa - Cizalla

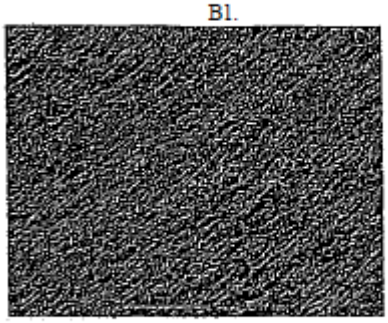
B.Paralelo al flujo de corte

A.Perpendicular al flujo de corte

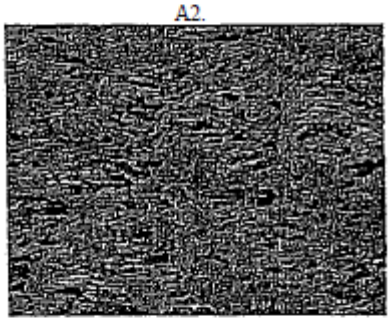
A1.



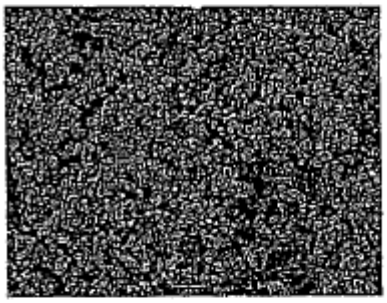
B1.



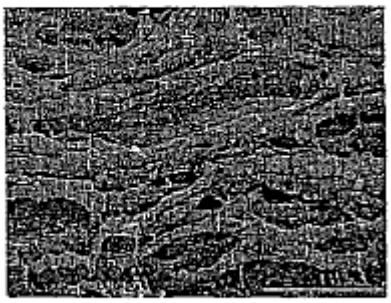
A2.



B2.



A3.



B3.

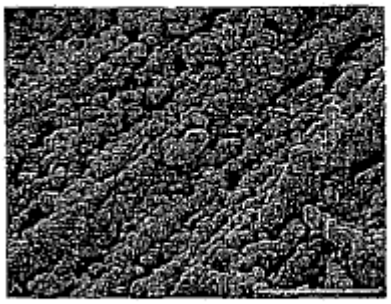


Figura 4

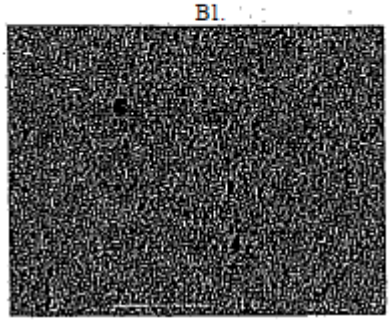
Caseinato de Ca - Cizalla

A.Paralelo al flujo de

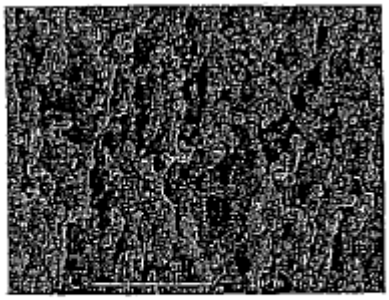
B. Perpendicular al flujo de corte

A1.

B1.



A2.



B2.

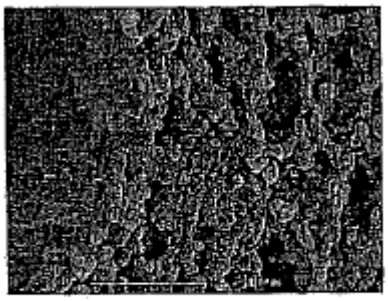
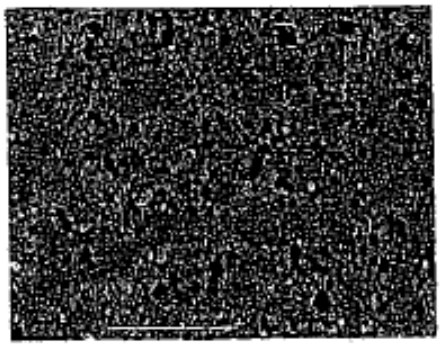


Figura 5

Caseinato de Ca + Tgasa – Inactividad

A. Paralelo al flujo de corte

B.Perpendicular al flujo de corte



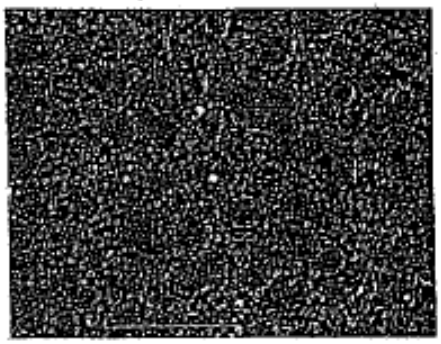


Figura 6

Caseinato de Ca + Tgasa - Mezcla

A. Paralelo al flujo de corte

B. Perpendicular al flujo de

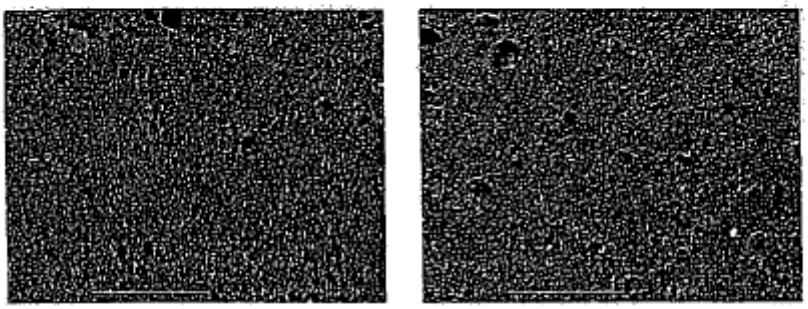


Figura 7

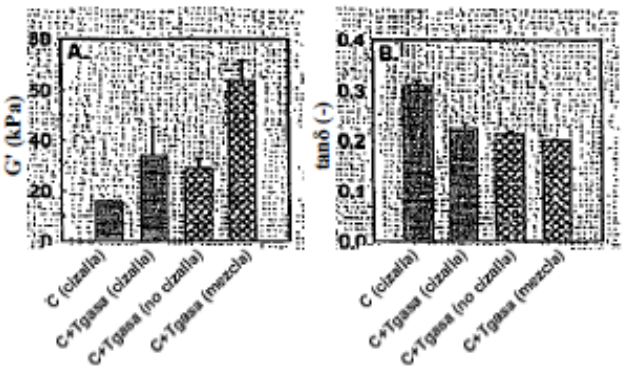


Figura 8

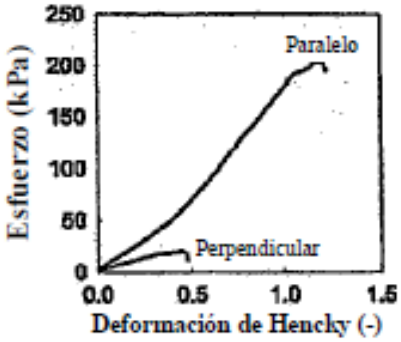

250
200
150
100
50
0
Esfuerzo (kPa)
Paralelo
Perpendicular
0.0
0.5
1.0
1.5
Deformación de Hencky (-)

Figura 9

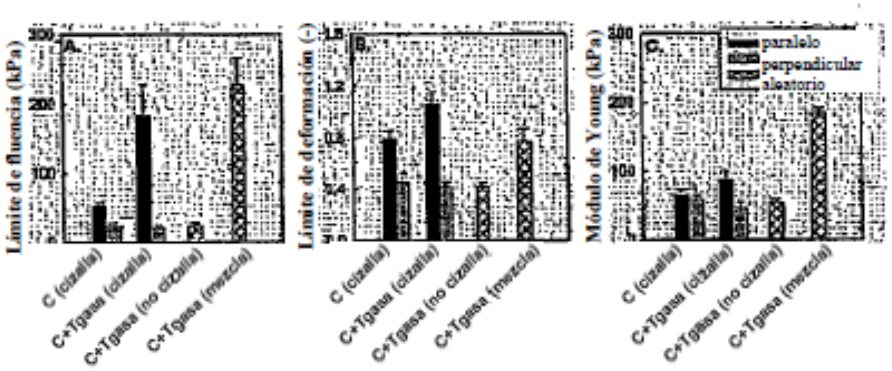

Límite de fluencia (kPa)
Límite de deformación (-)
Módulo de Young (kPa)
A.
B.
C.
paralelo
perpendicular
aleatorio
C (cizalla)
C+Tgasa (cizalla)
C+Tgasa (no cizalla)
C+Tgasa (mezcla)

Figura 10

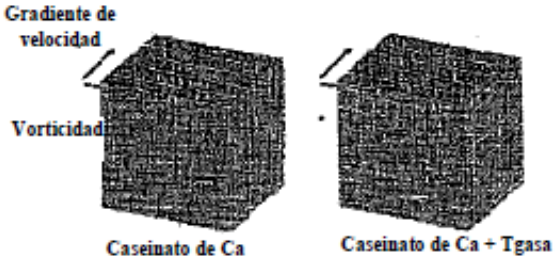
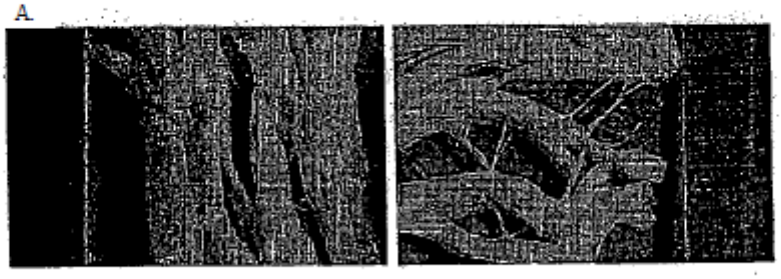

Gradiente de velocidad
Vorticidad
Caseinato de Ca
Caseinato de Ca + Tgasa

Figura 11

A.



B.

Figura 12

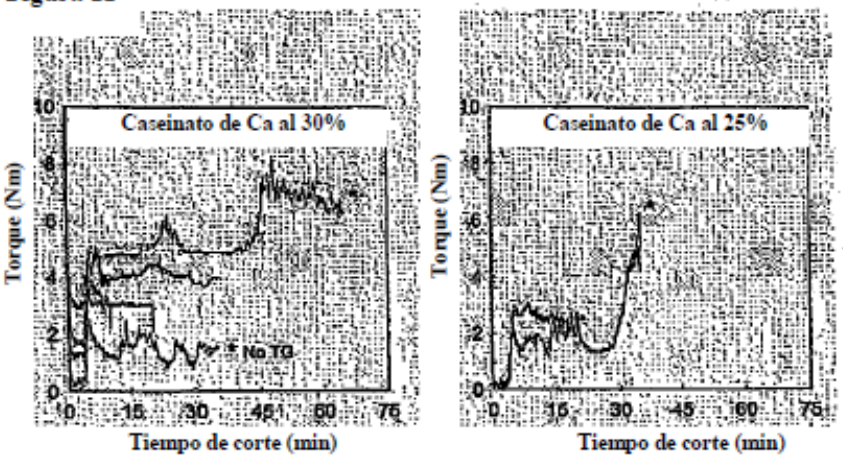

Caseinato de Ca al 30%
Torque (Nm)
No TG
Tiempo de corte (min)
Caseinato de Ca al 25%
Torque (Nm)
Tiempo de corte (min)

Figura 13

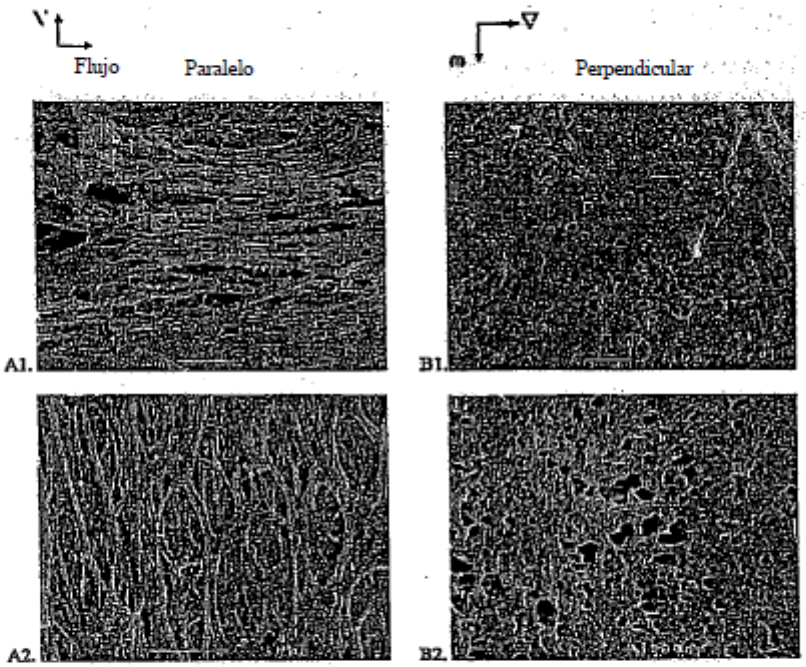


Figura 14

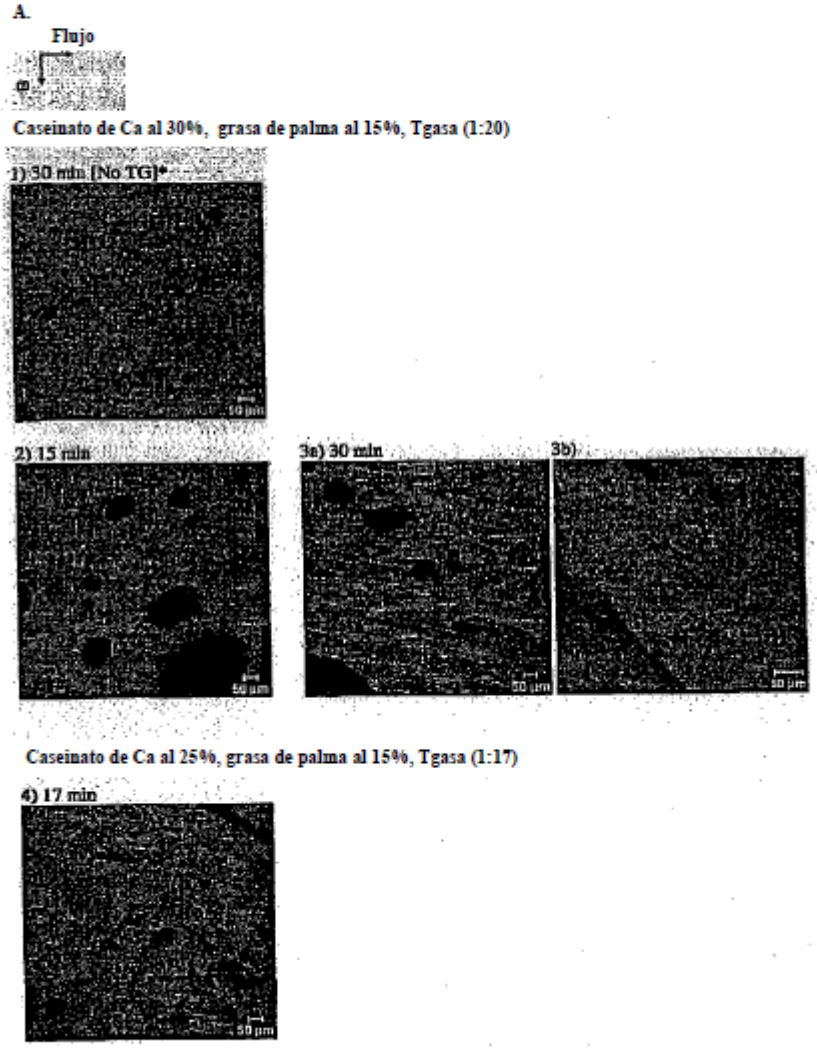

A.
Flujo
Caseinato de Ca al 30%, grasa de palma al 15%, Tgasa (1:20)
1) 30 min [No TG]*
2) 15 min
3a) 30 min
3b)
Caseinato de Ca al 25%, grasa de palma al 15%, Tgasa (1:17)
4) 17 min

Figura 14 (continuación)

B.

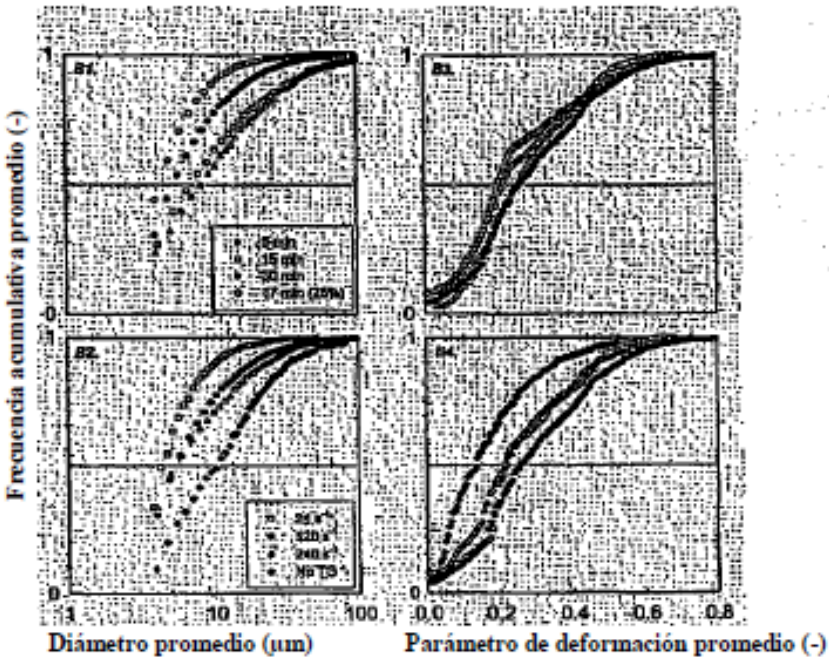


Figura 15

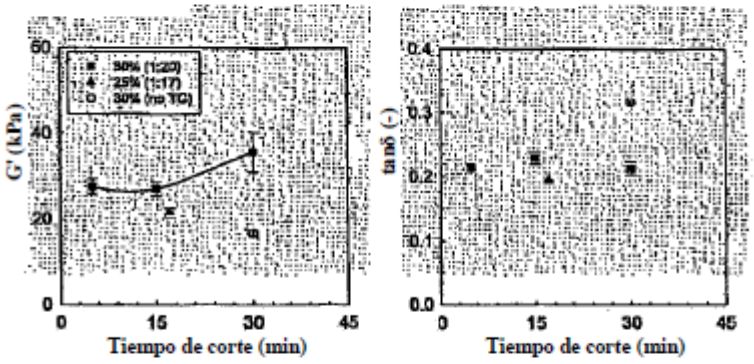

30% (1:20)
25% (1:17)
30% (no TG)
G' (kPa)
60
40
20
0
0
15
30
45
Tiempo de corte (min)
tan δ (-)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0
15
30
45
Tiempo de corte (min)

Figura 16

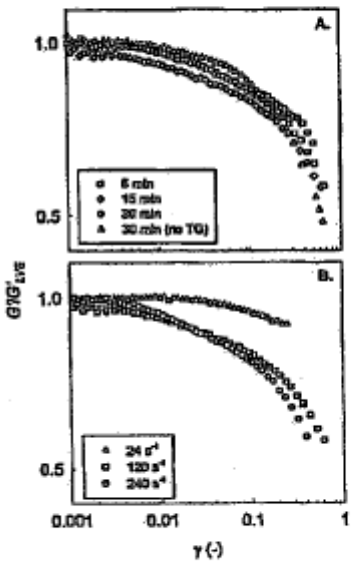

A.
1.0
0.5
5 min
15 min
30 min
30 min (no TG)
B.
1.0
0.5
24 s⁻¹
120 s⁻¹
240 s⁻¹
0.001
0.01
0.1
1
γ (-)

Figura 17

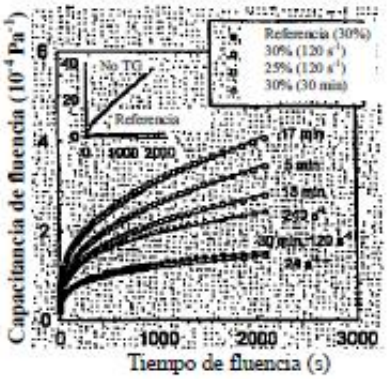

Referencia (30%)
30% (120 s⁻¹)
25% (120 s⁻¹)
30% (30 min)
No TG
Referencia
17 min
5 min
18 min
30 min
Capacitancia de fluencia (10⁻⁴ Pa⁻¹)
Tiempo de fluencia (s)
0
1000
2000
3000
2
4
6

Figura 18

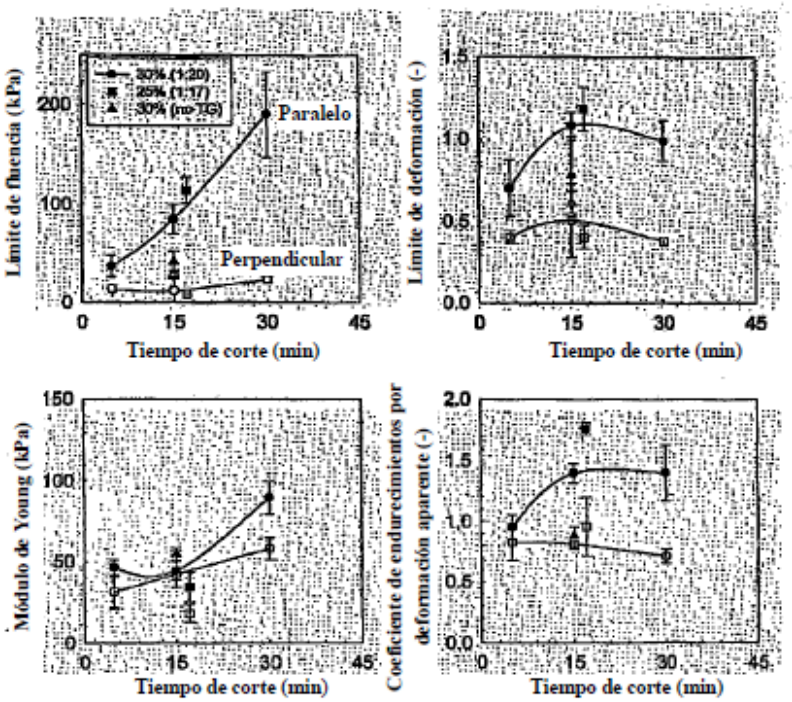

30% (1:20)
25% (1:17)
30% (no TG)
Paralelo
Perpendicular
Límite de fluencia (kPa)
Límite de deformación (-)
Módulo de Young (kPa)
Coeficiente de endurecimientos por deformación aparente (-)
Tiempo de corte (min)

Figura 19

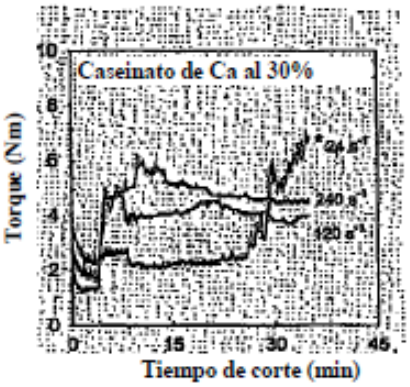

Caseinato de Ca al 30%
Torque (Nm)
Tiempo de corte (min)
0
2
4
6
8
10
15
30
45
240 s⁻¹
120 s⁻¹

Figura 20

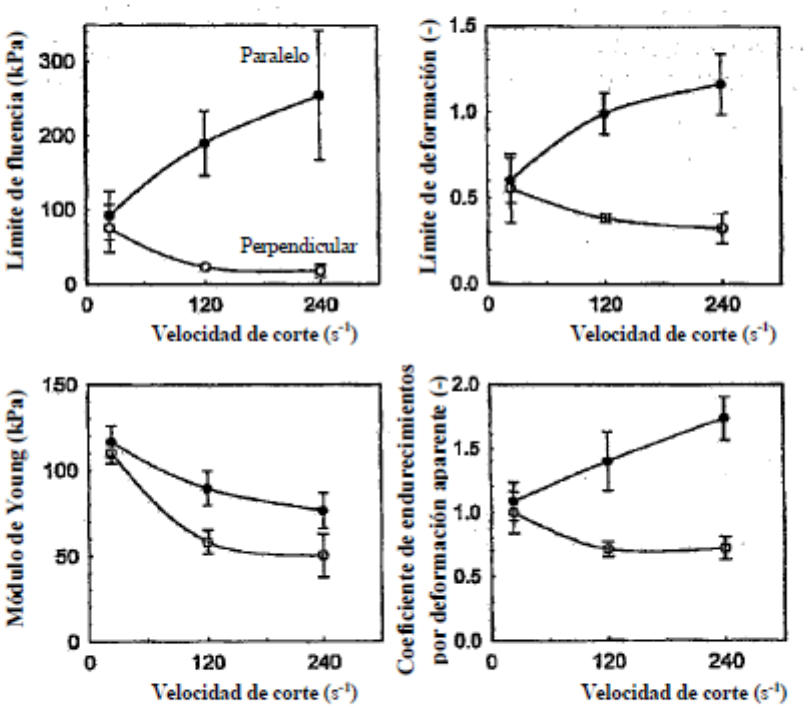
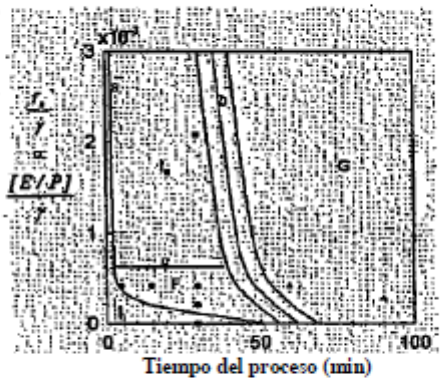

Límite de fluencia (kPa)
300
200
100
0
Paralelo
Perpendicular
0
120
240
Velocidad de corte (s-1)
Límite de deformación (-)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
120
240
Velocidad de corte (s-1)
Módulo de Young (kPa)
150
100
50
0
0
120
240
Velocidad de corte (s-1)
Coeficiente de endurecimientos por deformación aparente (-)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
120
240
Velocidad de corte (s-1)

Figura 21



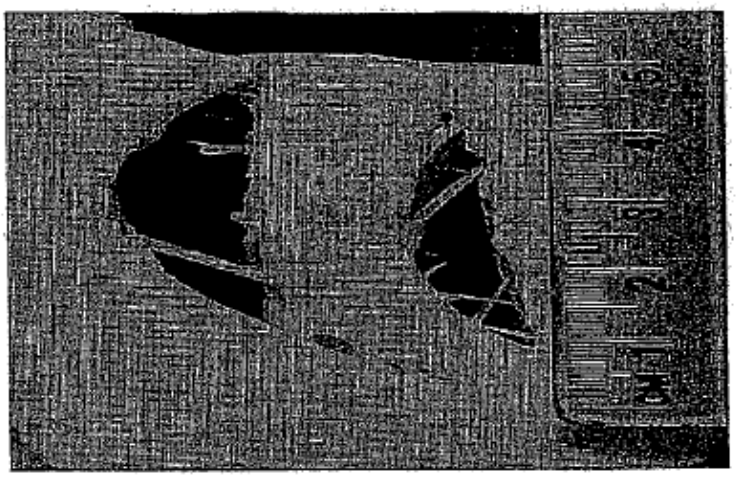


Figura 22. Caseinato de Ca al 20% cizallado y reticulado y xantano al 0.5% (Tgasa 1:20, 34 min a 50 rpm, 50°C)