

Efecto del pH y del procesado térmico sobre las propiedades viscoelásticas lineales de la yema de huevo acidulada con ácido clorhídrico

J.M. Aguilar*, M^aL. López-Castejón, F. Cordobés y A. Guerrero

Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Sevilla,
Escuela Politécnica Superior, Calle Virgen de África, 7, 41011 Sevilla (España)

Effect of pH and thermal processing on linear viscoelastic properties of egg yolk acidulated with hydrochloric acid

Efecte del pH i del processat tèrmic sobre les propietats viscoelàstiques lineals del rovell d'ou acidulat amb àcid clorhídric

RECEIVED: 19 FEBRUARY 2019; REVISED: 14 MARCH 2019; ACCEPTED: 22 MARCH 2019

SUMMARY

Egg yolk, natural or modified in egg products, is widely used as ingredient in the food industry due to its high nutritional value and the excellent functional properties that it provides to other foodstuffs. The aim of this research was to evaluate the effect of pH on the rheological properties and microstructure of chicken egg yolk, as well as on its thermal gelation process. Samples of technical yolk (45% solids content) with pH values between 2 and 6 were prepared, using hydrochloric acid as acidifier. Rheological tests showed an increase in viscoelastic properties as the pH value of the prepared systems decreased until a pH of 2, where a gel behaviour was observed. The formation of a heterogeneous gel from linear aggregates was confirmed by scanning electron microscopy. The heat treatment applied lead to a net structural reinforcement of the systems, which were strongly dependent on the pH value.

In the absence of electrostatic repulsions, three-dimensional aggregates leading to the formation of heterogeneous granulated gels are produced. However, as pH of the system departs from pH = 6 (close to the isoelectric point), the presence of positive surface charges, far from reinforcing the structure of the system, produces a net weakening of it.

Key words: Egg yolk, Gelation, Acidulant, Viscoelasticity, Scanning Electron Microscopy (SEM).

RESUMEN

La yema de huevo, natural o modificada en ovoproductos, es un ingrediente ampliamente usado en la industria alimentaria debido su alto valor nutricional y a las excelentes propiedades funcionales que confiere a diferentes preparados. El objetivo de esta investigación fue la evaluación del efecto del pH sobre las propiedades reológicas y la microestructura de la yema de huevo, así como sobre su proceso de gelificación térmica. Se prepararon muestras de yema técnica (45% de contenido en sólidos) con valores de pH entre 2 y 6, usando ácido clorhídrico como acidulante. Los ensayos reológicos realizados mostraron un incremento en las propiedades viscoelásticas a medida que disminuyó el pH de los sistemas preparados hasta producirse un entramado de tipo gel para pH=2. La formación de un gel heterogéneo a partir de agregados lineales fue confirmada mediante microscopía electrónica de barrido. La aplicación del tratamiento térmico produjo un reforzamiento estructural neto de los sistemas con una fuerte dependencia del pH. En ausencia de repulsiones electrostáticas, se producen agregados tridimensionales conducentes a la formación de geles granulados heterogéneos. Sin embargo, al alejarnos de pH=6 (próximo al punto isoeléctrico), la presencia de cargas positivas superficiales, lejos de reforzar la estructura del sistema, produce un debilitamiento neto de la misma.

*Corresponding autor: jmaguilar@us.es

Palabras clave: Yema de huevo, Gelificación, Acidulante, Viscoelasticidad, Microscopía electrónica de barrido (SEM).

RESUM

El rovell d'ou, natural o modificat en ovoproductes, és un ingredient àmpliament utilitzat en la indústria alimentària per el seu alt valor nutricional i per les excel·lents propietats funcionals que confereix a diferents preparats. L'objectiu d'aquesta investigació va ser l'avaluació de l'efecte del pH sobre les propietats reològiques i la microestructura del rovell d'ou, així com sobre el seu procés de gelificació tèrmica. Es van preparar mostres de rovell tècnic (45% de contingut en sòlids) amb valors de pH entre 2 i 6, usant àcid clorhídric com acidulant. Els assajos reològics realitzats van mostrar un increment en les propietats viscoelàstiques a mesura que va disminuir el pH dels sistemes preparats fins produir-se un entramat de tipus gel per $\text{pH} = 2$. La formació d'un gel heterogeni a partir d'agregats lineals va ser confirmada mitjançant microscòpia electrònica de rastreig. L'aplicació del tractament tèrmic va produir un reforçament estructural net dels sistemes amb una forta dependència del pH. En absència de repulsions electrostàtiques, es produeixen agregats tridimensionals conduents a la formació de gels granulats heterogenis. No obstant això, en allunyar-nos de $\text{pH} = 6$ (pròxim al punt isoelèctric), la presència de càrregues positives superficials, lluny de reforçar l'estructura del sistema, produeix un debilitament net de la mateixa.

Paraules clau: Rovell d'ou, gelificació, acidulant, viscoelasticitat, microscòpia electrònica de rastreig (SEM).

1. INTRODUCCIÓN

El uso de la yema de huevo en la industria alimentaria se encuentra muy extendido, sobre todo en la elaboración de una gran variedad de alimentos tales como salsas, postres, bollería o platos preparados¹⁻³. Muchos de estos productos alimentarios requieren condiciones de procesado que implican su gelificación. Es por ello que resulta de gran interés estudiar la evolución del comportamiento reológico de la yema nativa durante su gelificación en distintas condiciones de pH.

La yema de huevo en condiciones nativas es un fluido con un pH próximo a 6, aparentemente simple, pero con una compleja asociación supramolecular de lípidos (que suponen el 33 % p/p) y proteínas (17% p/p). Así, principalmente consta de una dispersión de partículas o gránulos suspendidos en una fase acuosa o plasma, con una proporción de materia seca próxima al 50 % p/p. Los gránulos y el plasma constituyen entre el 19-23 y 77-81 % p/p de la materia seca de la yema, respectivamente. Los gránulos, con diámetros comprendidos entre 1,0 y 1,3 mm, están compuestos fundamentalmente de proteínas, aunque también contienen lípidos y minerales. Otras partículas dispersas

menos abundantes son las esferas, de diámetro entre 4 y 150 nm, y las figuras de mielina, cuyos tamaños se encuentran entre 60 y 130 nm. La unidad estructural más abundante del plasma son las lipoproteínas de baja densidad (LDL), que suponen un 85 % del plasma y se asemejan a glóbulos grasos con un tamaño de 20 a 60 nm de diámetro y que están compuestas principalmente de lípidos cubiertos por membranas proteicas. El resto de la materia seca del plasma (15 % p/p) está constituido por proteína soluble, esencialmente livetinas^{1,2}.

Sin embargo, esta estructura supramolecular de la yema de huevo, que presenta una gran estabilidad en condiciones nativas, resulta bastante sensible a la incorporación de algunos aditivos (ej. agentes desnaturizantes o disgregantes) o a cambios en las condiciones del medio tales como pH, fuerza iónica, temperatura o incluso presión²⁻⁸. De todos estos factores externos, el que se sabe que induce una mayor transformación es el de la temperatura o la energía térmica, que a partir de cierto valor produce una transición sol-gel irreversible de la estructura de la yema de huevo conducente a la formación de geles viscoelásticos^{3,5}. El segundo factor en importancia, que puede condicionar el proceso de gelificación térmica, es el pH. A pesar de las características singulares de las asociaciones lipoproteicas presentes en la yema de huevo, la formación de geles térmicos responde a un mecanismo bastante similar al descrito para proteínas globulares. Este mecanismo comienza por un proceso de desnaturización parcial de la proteína de la yema. Esta desnaturización ocasiona la aparición en la superficie de las proteínas de grupos hidrofóbicos que en estado nativo se encontraban ocultos en el interior de las unidades estructurales proteicas (glóbulos, lipoproteínas, etc.), quedando así, expuestos al medio acuoso. Si bien, en la mayoría de las situaciones, el proceso de desnaturización es tan sólo parcial, este es suficiente para que los grupos hidrofóbicos expuestos actúen como puntos activos para la agregación de las proteínas desnaturizadas, mediante enlaces hidrofóbicos^{9,10}. Este proceso suele ir acompañado de cambios considerables en las propiedades reológicas y textura de la yema de huevo, conduciendo a la obtención de geles proteicos con un gran predominio del carácter elástico del sistema^{5,11,12}.

La importancia del pH radica en que, en función de su distancia al punto isoeléctrico, se puede utilizar como factor para modular dicho mecanismo, mediante la generación de cargas netas en las superficies proteicas, que pueden condicionar la importancia relativa de las interacciones hidrofóbicas y el proceso de agregación durante la gelificación^{4,13-17}.

El objetivo del presente estudio consiste en la evaluación del efecto del pH sobre las propiedades reológicas y la microestructura de la yema de huevo y sobre el proceso de gelificación térmica, usando ácido clorhídrico como acidulante. Para ello se han realizado ensayos viscoelásticos dinámicos mediante ensayos de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud (SAOS) y ensayos de microscopía electrónica de barrido (SEM).

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de las muestras de yema de huevo

La yema de huevo se obtuvo a partir de huevos de gallina frescos, envasados para Matines Ibérica, CDC, S.L. y comercializados con la clasificación de categoría A y clase L¹⁸. Se llevó a cabo la separación de la yema mediante el método desarrollado por Harrison y Cunningham¹⁹. Este proceso se repite con un mínimo de 6 huevos por lote, homogeneizando bien todas las yemas obtenidas mediante agitación manual.

Tras la obtención de la yema nativa se procedió a la determinación de su contenido en sólidos mediante cuantificación de las pérdidas de humedad por desecación de las muestras en una estufa a 105 °C durante 24 h²⁰. Todos los lotes analizados contenían una proporción de materia seca comprendida entre el 50 y el 52% en peso. Cada lote de yema nativa se reconstituyó con agua para preparar una yema técnica de referencia con una concentración fija del 45% (p/p) de sólidos, siendo el valor del pH igual a 6 para dicha solución proteica en ausencia de electrolitos.

La modificación del pH de las dispersiones de yema se realizó mediante la adición de acidulante a partir de disoluciones preparadas de los mismos con concentraciones 1M, 2M, 3M, y 5M. Dichas disoluciones se prepararon a partir de ácido clorhídrico comercial de grado analítico (37% PA, Fisher Scientific). El ácido clorhídrico se encuentra registrado como aditivo alimentario (E-507) según el Codex Alimentarius²¹.

Caracterización reológica

Las propiedades viscoelásticas lineales de las muestras de yema de huevo con un contenido de sólidos del 45 % p/p fueron determinadas mediante distintos ensayos realizados en un reómetro de esfuerzo controlado (AR 2000, TA Instruments, USA) usando un sensor rugoso con geometría placa-placa de 40 mm de diámetro construido en acero inoxidable (SST PP60mm) y acoplado a un sistema Peltier. Este equipo permite la obtención de datos viscoelásticos en cizalla oscilatoria en un amplio intervalo de valores de deformación, frecuencia y temperatura. La distancia entre las placas ("gap") fue 1mm y, al menos, se realizaron dos replicados de cada una de las medidas reológicas presentadas. Las muestras, almacenadas a $4 \pm 0,5^\circ\text{C}$ hasta el momento de la medida, fueron atemperadas, al menos durante 30 min en el laboratorio antes de colocarlas sobre el sistema sensor. Cada muestra fue sellada con aceite de vaselina de baja viscosidad para evitar problemas de desecación. Con objeto de imponer una misma historia termomecánica, los sistemas estudiados se mantuvieron en el sensor durante 20 min antes de comenzar cualquier ensayo. Se realizaron tres tipos de ensayos.

Ensayos de barrido del esfuerzo

Con el objetivo de establecer el esfuerzo o deformación crítica que puede soportar la muestra dentro del intervalo viscoelástico lineal a una temperatura dada, se realizaron barridos del esfuerzo para todos

los sistemas estudiados a las frecuencias constantes de 0,1; 1 y 10 Hz para las temperaturas de 20°C y 90°C. De esta forma se determinó su intervalo viscoelástico lineal entre 0,01-100 Pa a la frecuencia de 1 Hz. En el caso de los ensayos efectuados a 90°C se estableció un tiempo de espera de 30 min, en lugar de 20 min, con el fin de asegurar la formación del gel antes del comienzo del mismo.

Ensayos de barrido de frecuencia

Una vez establecido el intervalo viscoelástico lineal de cada muestra pueden determinarse las propiedades viscoelásticas lineales en función de la frecuencia, mediante ensayos de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud (SAOS), seleccionando un valor de amplitud del esfuerzo inferior al crítico, determinado mediante un ensayo de barrido del esfuerzo. Se han llevado ensayos SAOS con valores de frecuencia comprendidos entre 10^{-2} y 10^2 rad/s para obtener un espectro mecánico a una temperatura de 20 °C para cada uno de los sistemas estudiados, incluyendo tanto las muestras de yema a distintos valores de pH, como los geles obtenidos a partir de cada una de ellas, tras la aplicación de un ciclo térmico definido en el ensayo siguiente.

Ensayos de rampas de temperatura

En este tipo de ensayo se registra el cambio que sufren las propiedades viscoelásticas de las muestras con la temperatura a una frecuencia constante, que en este estudio se fijó a 1 Hz y una amplitud del esfuerzo siempre inferior al valor crítico. Teniendo en cuenta experiencias realizadas en estudios anteriores, se definieron tres etapas para cada ciclo térmico⁵. En la primera se calienta la muestra desde 20 hasta 90 °C, con una velocidad de calentamiento de 1,5 °C/min. La segunda etapa es isotérmica a 90°C, durante 30 min, aplicando a continuación una etapa de enfriamiento a una velocidad de -5 °C/min desde los 90 °C a los 20 °C iniciales.

Tras realizar este ciclo térmico sobre cada muestra ensayada, se mantuvo el gel formado en el sistema sensor durante un tiempo de espera de 20 min a 20°C y a continuación, se realizó un barrido de frecuencia de cada gel resultante. Con objeto de comparar estos barridos de frecuencia con los correspondientes a las dispersiones de yema de los sistemas estudiados, éstos se realizaron en un intervalo de frecuencia de 0,01-100 rad/s bajo un esfuerzo menor al esfuerzo crítico de viscoelasticidad lineal.

Microscopía Electrónica de Barrido

La microestructura de alguno de los sistemas estudiados fue observada mediante ensayos de microscopía electrónica de barrido (SEM) realizados en colaboración con el Servicio de Microscopía (CITIUS, Universidad de Sevilla). Para ello, se realizó una fijación primaria de las estructuras proteicas introduciendo las muestras analizadas en una disolución de glutaraldehído al 3% durante 72 h a temperatura ambiente (20 °C). Tras un lavado posterior de la muestra con agua destilada durante 10-20 min, se realizó una segunda fijación a 4 °C utilizando una disolución al 1% de tetraóxido de osmio durante 1-2 h. Después de una nueva etapa de lavado, se procedió a

la deshidratación de la muestra utilizando varias diluciones de etanol-agua en la que se incrementa la proporción de etanol entre el 50-100 % y su posterior secado mediante la técnica del punto crítico. Finalmente, las muestras se montaron en un soporte de cobre y se recubrieron con una aleación conductora de oro. Las muestras fueron conservadas en un desecador hasta el momento de ser observadas en un microscopio JEOL 6460LV (Tokyo, Japón).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Intervalo viscoelástico lineal de dispersiones y geles de yema de huevo

En la Figura 1 se presentan los valores de los módulos de almacenamiento (G') y pérdidas (G'') obtenidos a partir de ensayos de barrido del esfuerzo de la yema de huevo nativa con un contenido de sólidos del 45%. La Fig. 1A presenta los resultados obtenidos a distinta frecuencia (a pH 4), mientras que en la Fig. 1B se comparan los resultados obtenidos a 20°C y 90°C (a pH 3). Independientemente del pH y la frecuencia, todos los perfiles obtenidos a 20°C son similares, correspondiendo a un comportamiento fluido con un carácter predominantemente viscoso ($G'' > G'$). La única excepción que se obtuvo a 20°C corresponde a pH 2, cuyo comportamiento se asemeja al de los resultados obtenidos a 90°C. En este caso, como se observa en la Fig. 1B, existe un claro predominio de la componente elástica sobre la viscosa, típico de un comportamiento sólido.

En todos los casos, independientemente del pH, la frecuencia o la temperatura, se obtiene una zona a baja deformación en la que las funciones viscoelásticas se mantienen independientes de la deformación o el esfuerzo aplicado. Esta zona corresponde al intervalo viscoelástico lineal. En la Fig. 1A puede apreciarse que ambos módulos experimentan un considerable aumento con la frecuencia, si bien la componente elástica suele aproximarse a la viscosa al aumentar la frecuencia. También puede apreciarse que la deformación crítica para el intervalo viscoelástico lineal tiende a reducirse ligeramente al aumentar la frecuencia. Este efecto debe ser tenido en cuenta a la hora de seleccionar una deformación adecuada para la realización de los ensayos viscoelásticos lineales.

Como puede apreciarse en la figura 1B, los ensayos de barrido del esfuerzo realizados a 90°C, muestran un amplio intervalo viscoelástico lineal con valores de deformación crítica superiores a 0,01 y de esfuerzos críticos superiores a 100 Pa. En cuanto al efecto del pH, una reducción desde el pH nativo conduce a un incremento de valores de G' y G'' , así como del esfuerzo crítico para salida del intervalo viscoelástico lineal. La deformación crítica también presenta un ligero aumento al reducir el pH, tomando ésta valores superiores a 0,15 para cualquiera de los sistemas estudiados (resultados no mostrados).

Teniendo esto en cuenta, los ensayos de barrido de temperatura se realizaron utilizando varios tramos en distintos intervalos de temperaturas, fijando un valor

del esfuerzo inferior al crítico para cada tramo. De esta forma se asegura que las propiedades viscoelásticas se determinan siempre dentro del intervalo viscoelástico lineal.

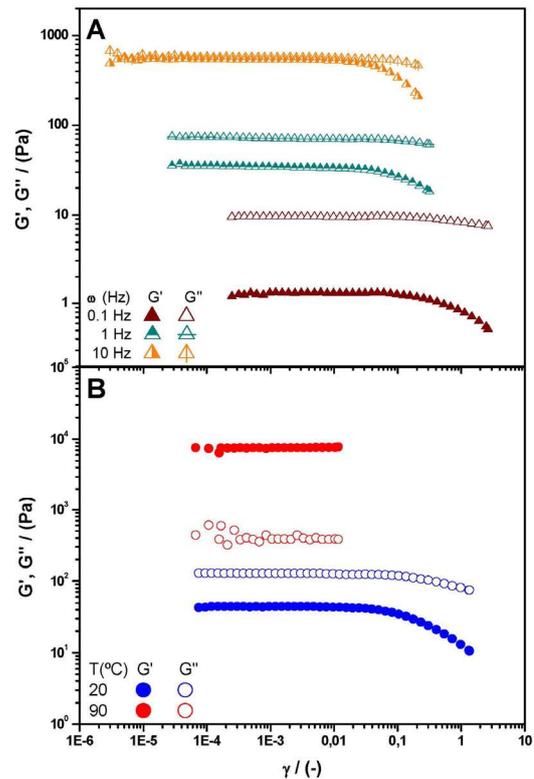


Figura 1. Intervalo viscoelástico lineal para la yema de huevo (45% en sólidos) acidulada con HCl: (A) En función de la frecuencia a 20°C y pH 4; (B) En función de la temperatura para una frecuencia de 1 Hz y pH 3.

Gelificación de la yema de huevo mediante aplicación de un tratamiento térmico

En la Figura 2 se muestra la evolución de las propiedades viscoelásticas lineales (G' , G'' y $\tan\delta$) de la yema de huevo nativa (45 % p/p a pH 6) obtenida a una frecuencia constante de 1 Hz, al aplicar el ciclo térmico descrito en la sección 2.2 e incluido en la figura. En esta figura pueden distinguirse cuatro zonas de comportamiento claramente diferente:

- (i) Una primera zona, correspondiente a un comportamiento fluido con valores de G'' superiores a G' , en la que se observa un descenso moderado de ambos módulos (40 min - 60°C), consecuencia de la relajación estructural producida por el aumento de agitación térmica. Este descenso de valores de G' y G'' a temperaturas moderadas e inferiores a la temperatura de desnaturalización de la proteína, es típico de una disolución de macromoléculas con aumento de movilidad y ruptura de puentes de hidrogeno.
- (ii) Una segunda zona, que comienza a partir del máximo de $\tan\delta$ y que a pH 6 corresponde al intervalo 40-59 min, correspondiente a unos valores de temperatura comprendidos entre 60

y 88°C aproximadamente, en la que se produce una transición sol-gel. Esta zona se inicia con un súbito incremento de ambos módulos viscoelásticos, que se cruzan, observándose a partir de entonces un claro predominio de la componente elástica sobre la viscosa. Así, el valor de G' se reduce en más de dos órdenes de magnitud. Como se mencionó anteriormente, algunos autores han utilizado el punto de cruce entre ambos módulos como criterio aproximado para establecer el punto de gelificación²²⁻²³. En la yema nativa estudiada, el punto de cruce se ha obtenido a una temperatura de $T_c = 73,6^\circ\text{C}$, correspondiéndole un valor del módulo G_c de 8,8 Pa. En un estudio anterior⁵ realizado sobre gelificación térmica de la yema de huevo nativa, a la misma concentración de sólidos, se obtuvieron valores similares de T_c (entre 67,5 y 73,5°C para velocidades de calentamiento entre 0,75 y 3°C/min) y algo superiores para el parámetro G_c (28 ± 6 Pa). En todo caso, esta evolución corresponde a la aparición de interacciones entre puntos activos de los distintos segmentos proteicos, que pueden originar entrecruzamientos mediante enlaces covalentes (principalmente puentes disulfuro), que conducen a la formación de un entramado tridimensional y al reforzamiento del gel elástico²⁴. Esta etapa finaliza con un descenso considerable del valor de la pendiente hasta alcanzar un valor máximo de G' o de G'' y mínimo de $\tan \delta$.

- (iii) La tercera zona (59-93 min), que incluye el final de la etapa de calentamiento y la etapa isotérmica a 90°C, parte de un valor máximo de G' o de G'' , alcanzando un valor prácticamente constante de ambos módulos, que corresponde al comportamiento del gel ya formado. Dicho resultado parece confirmar que se ha llegado a un periodo de estabilización del entramado estructural. Este comportamiento puede ser explicado en términos de los procesos involucrados en la gelificación de proteínas globulares. Según Clark⁹, dicho mecanismo puede dividirse en tres fases: a) Cambio en las proteínas desde el estado nativo a un estado desnaturalizado, al menos parcialmente, b) Agregación parcial de las proteínas, c) Asociación de los agregados proteicos para formar un entramado tridimensional. Este comportamiento resulta consistente con los resultados obtenidos a partir de los ensayos de barrido del esfuerzo a 90°C (Fig. 1B).
- (iv) La última etapa (a partir de los 93 min aprox.) corresponde a un periodo de reforzamiento del entramado con un aumento de ambos módulos viscoelásticos G' y G'' ; seguido de una marcada tendencia hacia un valor de equilibrio a temperatura ambiente. Este comportamiento es frecuente en sistemas proteicos, si bien resulta sensiblemente inferior al encontrado con proteínas de albúmina de huevo¹⁷. En esta etapa se produce la recuperación de interacciones de tipo físico, en especial

puentes de hidrogeno en el que pueden participar tanto la proteína como el medio acuoso.

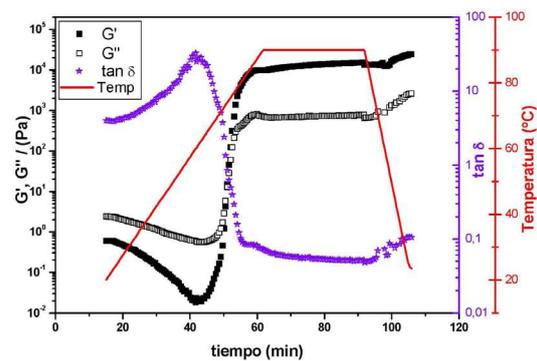


Figura 2. Evolución de los valores de G' , G'' y $\tan \delta$ obtenidos a frecuencia constante de 1 Hz durante el ciclo térmico aplicado para la yema de huevo (45%) a pH 6. La línea continua describe el perfil térmico aplicado.

En la Figura 3 se presentan los resultados obtenidos tras la aplicación del ciclo térmico a la yema nativa acidulada con ácido clorhídrico a distintos valores de pH, tanto para el módulo de almacenamiento o elástico (Fig. 3A) como para el de pérdidas o viscoso (Fig. 3B). Puede observarse que la reducción del pH de la yema de huevo desde su valor nativo (pH 6) ejerce una notable influencia sobre las propiedades viscoelásticas lineales del sistema, si bien pueden distinguirse las cuatro etapas descritas anteriormente. Así, se produce un considerable incremento de los valores iniciales de G' y G'' conforme se reduce el pH, así como una evolución de las distintas zonas definidas anteriormente para el ciclo térmico aplicado. Así, en primer lugar, al disminuir el pH puede apreciarse una progresiva reducción de la zona de predominio del carácter fluido hasta su desaparición para pH 2, en el que la componente elástica es superior a la viscosa a la frecuencia estudiada. Igualmente, se observa un descenso de la dependencia de G' y G'' con la temperatura. Como consecuencia, se produce una anticipación de la zona de transición sol-gel (etapa (ii)), a medida que se reduce el valor del pH, de forma que la temperatura a la que se produce el mínimo de G' se reduce desde 60°C a pH 6 hasta unos 40°C a pH 3. Igualmente, se produce un claro descenso de la temperatura a la que se produce el punto de cruce entre G' y G'' (T_c) y un aumento de los valores del módulo de cruce ($G_c = G'[T_c] = G''[T_c]$), obteniendo valores de T_c de 74°C, 68°C y 63°C; y G_c de 10 Pa, 160 Pa y 340 Pa para valores de pH de 6, 4 y 3, respectivamente. En todo caso, las pendientes de crecimiento de ambas funciones viscoelásticas de esta segunda etapa resultan ser menos acusadas. La excepción a este comportamiento corresponde al valor de pH 2 que, como se puso de manifiesto anteriormente, presenta un comportamiento tipo gel desde el comienzo del ensayo y, por tanto, no existe una delimitación precisa entre las etapas (i) y (ii) a pH 2.

En la etapa isotérmica (iii), que puede comenzar con un ligero descenso de valores de G' o de G'' , especial-

mente a pH alejado del punto isoeléctrico, se alcanzan valores asintóticos de ambas funciones viscoelásticas. En cuanto a la zona de enfriamiento (iv), se produce un comportamiento peculiar en los sistemas de menor pH en los que se aprecia un claro descenso de valores al bajar la temperatura en lugar de producirse un reforzamiento estructural tal como sucede con la yema a pH 4 y 6. Estos resultados sugieren que la mayor cantidad de cargas de las superficies proteicas correspondientes a los valores de pH más ácidos producen un debilitamiento estructural, que parece estar favorecido por el descenso de la temperatura. Así, parece que la mayor cantidad de interacciones electrostáticas produce un desplazamiento del balance de fuerzas mediante la inhibición de la formación de interacciones físicas, como es el caso de los puentes de hidrógeno, los cuales deberían estar favorecidos al descender la temperatura.

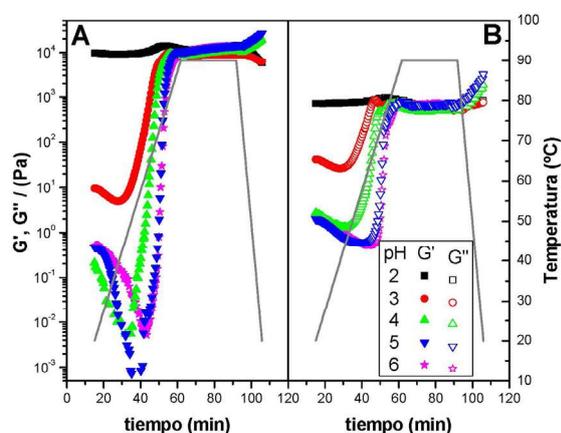


Figura 3. Evolución del módulo de almacenamiento (A) y el módulo de pérdidas (B) con la temperatura para la yema de huevo (45% p/p) en función del pH

Comparación entre las propiedades viscoelásticas lineales de dispersiones y de geles de yema de huevo

En la figura 4 se presentan los resultados de los ensayos de barrido de frecuencia obtenidos a 20°C, dentro del intervalo viscoelástico lineal, para cada una de las muestras de yema acidulada con ácido clorhídrico, antes y después de la aplicación del ciclo térmico. La figura 4A muestra los valores de la viscosidad compleja (η^*), mientras que la figura 4B se representan los valores de la tangente de pérdidas ($\tan\delta$), ambas variables en función de la frecuencia para distintos valores de pH, antes y después del ciclo térmico.

En la figura 4 pueden observarse dos tipos de comportamientos claramente diferenciados. En ausencia de tratamiento térmico, para pH 3 o superior, la yema de huevo presenta un comportamiento fluido caracterizado por valores superiores a la unidad ($G'' > G'$) y por valores de viscosidad compleja que tienden a un valor constante a baja frecuencia, seguido de un descenso moderado de ésta con la frecuencia. En cambio a pH 2, el comportamiento corresponde

al de un gel de elevada consistencia reológica, tal y como sucede para todos los sistemas ensayados tras la aplicación del ciclo térmico (entre pH 6 y 2). En estos casos, la $\tan\delta$ presenta valores muy inferiores a la unidad (0,08-0,5) en todo el intervalo de frecuencias y la viscosidad compleja presenta un descenso apreciable con la frecuencia, con pendientes próximas a la unidad. Esto significa que el módulo elástico es prácticamente independiente de la frecuencia, como corresponde a un comportamiento tipo gel sólido. En la tabla 1, que incluye los valores de G'_1 , G''_1 , a una frecuencia de 1 Hz, así como la pendiente de la caída de G' con la frecuencia, también puede apreciarse este diferente comportamiento.

Además, debe destacarse que el efecto del pH es también muy diferente si se trata de dispersiones, en ausencia de tratamiento térmico, o de geles térmicos. En el primer caso, se produce un aumento extraordinario de valores de viscosidad compleja (Fig. 4A) o de G'_1 , G''_1 (Tabla 1) al reducir el pH desde el valor nativo. Así, por ejemplo, el valor de G'_1 aumenta más de 5 órdenes de magnitud al reducir el pH desde 6 hasta 2 con ácido clorhídrico. Por el contrario, el gel más consistente (con mayores valores de G'_1 , G''_1) se obtuvo tras aplicar el tratamiento térmico a la yema nativa, sin añadir HCl (pH 6). La incorporación de acidulante para reducir el pH produce en este caso un debilitamiento del entramado elástico tipo gel, con descenso de los mencionados parámetros viscoelásticos. Por tanto, la consistencia del gel térmico se encuentra en relación directa con la proximidad al punto isoeléctrico.

Resulta interesante destacar el hecho de que la reducción del pH de la yema hasta un valor de 2 conlleva un mayor reforzamiento estructural en ausencia de tratamiento térmico que tras su aplicación, como puede apreciarse en la Figura 4A y en la Tabla 1.

Esta diferencia de comportamiento viene a resaltar la importancia de las interacciones predominantes entre las superficies de proteína de la yema de huevo. En ausencia de tratamiento térmico y acidulante, las proteínas de la yema se encuentran en las proximidades del punto isoeléctrico y por tanto la carga neta de las superficies proteicas es prácticamente nula, lo que conlleva una limitación importante de repulsiones electrostáticas. En ausencia de estas repulsiones, el proceso de agregación y formación del entramado proteico, mediante enlaces hidrofóbicos y puentes disulfuro, está favorecido por lo que el gel se desarrolla con más facilidad. La reducción del pH implica un aumento de la carga superficial neta de las proteínas, que conduce a un aumento de repulsiones electrostáticas. Estas repulsiones se superponen al resto de interacciones existentes en ausencia de tratamiento térmico para conducir a un aumento de consistencia reológica. Debe tenerse en cuenta que la reducción de pH, si este se encuentra suficientemente alejado del punto isoeléctrico, también puede inducir cierta desnaturación de la proteína presente²⁵. La combinación de ambos efectos, repulsiones electrostáticas e

interacciones entre grupos hidrofóbicos expuestos al medio tras la desnaturalización proteica, puede conducir a la formación de agregados y al desarrollo de un entramado tipo gel⁴, tal y como resulta patente al añadir HCl hasta pH 2. Por otro lado, las repulsiones electrostáticas parecen interferir negativamente en el proceso de agregación y desarrollo estructural inducido por el incremento de temperatura. De esta forma, el gel final resulta menos consistente mientras mayores son las repulsiones electrostáticas como consecuencia de la mayor carga superficial asociada a la reducción del pH.

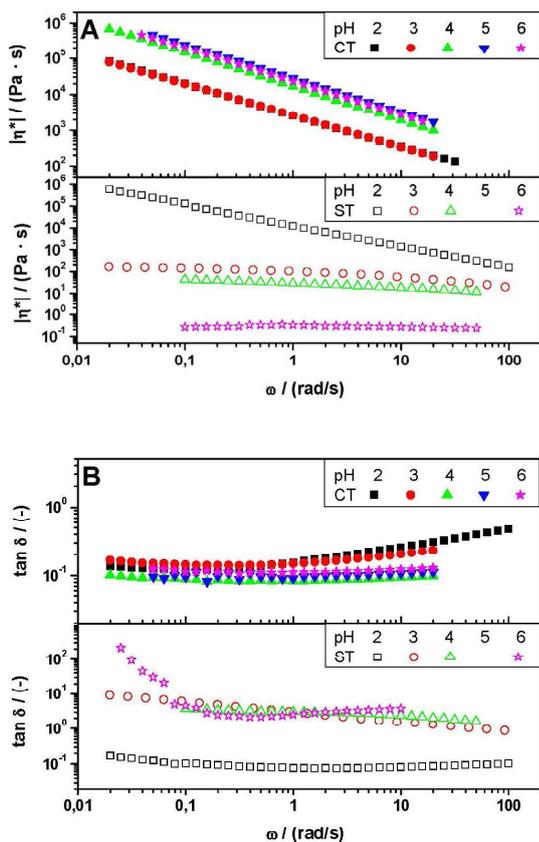


Figura 4. Propiedades viscoelásticas lineales en función de la frecuencia a 20°C antes y después de la aplicación del ciclo térmico para la yema de huevo (45% p/p) acidulada con ácido clorhídrico hasta distintos valores de pH: (A) Viscosidad compleja; (B) Tangente de pérdidas.

Microscopía electrónica de barrido de geles de yema de huevo

La figura 5 muestra las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido de tres geles de proteína de yema de huevo (45 % p/p): El primero de ellos formado a 20°C mediante acidificación con HCl a pH 2; El segundo y tercero son geles térmicos obtenidos mediante la aplicación del ciclo térmico descrito en la sección 2.2 sobre muestras de yema de huevo a pH 6 y pH 2, respectivamente.

Como puede observarse en la Fig. 5, independientemente del pH al que se aplique, el tratamiento térmico produce geles con microestructuras más densas que los que se obtienen mediante acidificación a temperatura ambiente hasta un pH suficientemente alejado del punto isoeléctrico. Esta diferencia ha sido observada por diversos autores para una gran variedad de proteínas en disolución, siendo atribuida a la diferente forma en que se produce la agregación proteica cuando se modifica el balance entre interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Cerca del punto isoeléctrico (Fig. 5C), en ausencia de repulsiones electrostáticas, las interacciones hidrofóbicas inducidas mediante procesamiento térmico son capaces de producir agregados relativamente grandes en todas direcciones, que conducen a la formación de geles granulados heterogéneos^{26,27}. Esta microestructura es la que corresponde a geles de mayor consistencia reológica. En el otro extremo, en ausencia de procesamiento térmico y para un pH suficientemente alejado del punto isoeléctrico (Fig. 5A), se produce desnaturalización proteica inducida por la acidificación que conduce a formación de agregados. En este caso, esta etapa de agregación está condicionada por las fuertes repulsiones electrostáticas presentes. Como resultado, se obtienen agregados lineales que conducen a entramados microestructurales que forman geles relativamente homogéneos^{28,29}. El procesamiento térmico de este gel obtenido a pH 2 genera una microestructura intermedia entre ambas situaciones que alterna zonas de gel granulado heterogéneo con zonas en las que el gel mantiene un entramado más homogéneo (Fig. 5B). Curiosamente, la menor consistencia reológica de los tres geles está asociada al gel que presenta esta estructura mixta.

Tabla 1. Valores del módulo elástico (G'), módulo viscoso (G'') y tangente de pérdidas ($\tan \delta$) a 1 rad/s para dispersiones de yema de huevo acidulada con ácido clorhídrico a diferentes valores de pH, antes y después de someterlos a un ciclo térmico.

	Parámetros dispersiones sin Tto. Térmico				Parámetros geles con Tto. Térmico			
	G'_1	G''_1	$tg\delta_1$	Pendiente (η^*)	G'_1	G''_1	$tg\delta_1$	Pendiente (η^*)
	Pa		-	-	Pa		-	-
pH 2	12329	947	0,0762	-0,97 ± 0,06	2516	386	0,1535	- 0,883 ± 0,004
pH 3	29,78	27,59	3,0662	-0,12 ± 0,01	2595	383	0,1475	- 0,880 ± 0,003
pH 4	8,99	27,59	3,0666	-0,189 ± 0,004	16895	1398	0,0827	- 0,9470 ± 0,0006
pH 5	-	-	-	-	28302	2562	0,0905	- 0,938 ± 0,001
pH 6	0,106	0,269	2,5273	-0,084 ± 0,005	28935	3186	0,1101	- 0,9300 ± 0,0005

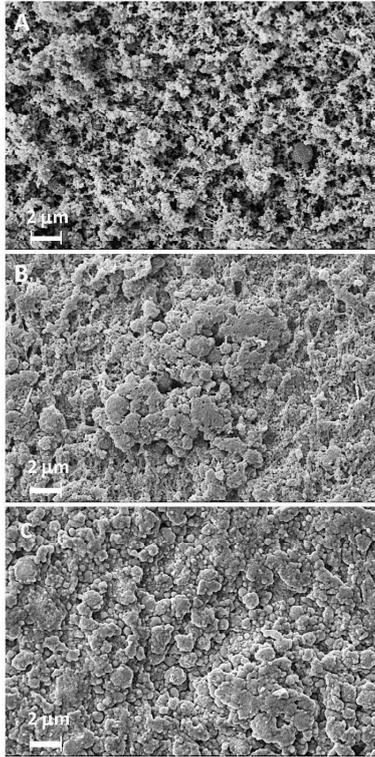


Figura 5. Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido de geles de yema de huevo (45% p/p): (A) Sin tratamiento térmico a pH 2; (B) Tras tratamiento térmico a pH 2; (C) Tras tratamiento térmico a pH 6.

CONCLUSIONES

La yema nativa a temperatura ambiente presenta un comportamiento reológico relativamente simple que corresponde al de un fluido de propiedades viscoelásticas moderadas con una leve desviación del comportamiento newtoniano. Al reducir el valor del pH de la yema de huevo nativa con ácido clorhídrico, en ausencia de procesamiento térmico, se produce en todos los casos estudiados un aumento de propiedades viscoelásticas que depende del valor del pH alcanzado. A medida que el pH se aleja del valor nativo (pH 6), próximo al punto isoelectrico, la carga superficial neta de las proteínas de la yema aumenta, produciendo un claro aumento de interacciones electrostáticas que se conduce a dicho aumento de propiedades viscoelásticas. A un valor de pH suficientemente alejado del punto isoelectrico (ej. pH 2) se produce la formación de un entramado tipo gel. Esta formación del gel proteico, en ausencia de procesamiento térmico puede atribuirse a un proceso de desnaturalización inducido por la acidificación, que en combinación con las repulsiones electrostáticas presentes conduce a la formación de agregados lineales y de un gel heterogéneo. Los resultados obtenidos a partir de los ensayos viscoelásticos lineales y de microscopía electrónica de barrido confirman la formación de este gel proteico.

La aplicación del tratamiento térmico produce generalmente un reforzamiento estructural neto que presenta una fuerte dependencia del pH. A pH nativo, cercano al punto isoelectrico, el tratamiento térmico produce inicialmente un descenso de propiedades viscoelásticas que puede explicarse en términos de una relajación estructural relacionado con la disminución de interacciones físicas. Esta evolución es seguida de un efecto muy claro de crecimiento de propiedades viscoelásticas que puede asociarse a fenómenos físicos, como la formación de agregados, y a la formación de enlaces químicos, mediante entrecruzamientos de segmentos proteicos. En ausencia de repulsiones electrostáticas, las interacciones hidrofóbicas inducidas mediante procesamiento térmico son capaces de producir agregados relativamente grandes en todas direcciones, que conducen a la formación de geles granulados heterogéneos.

A pH ácido, suficientemente alejado del punto isoelectrico, la presencia de cargas positivas superficiales puede ocasionar alteraciones más o menos importantes durante el tratamiento térmico, tanto en la formación de agregados como en la generación de entrecruzamientos. Así el tratamiento térmico, lejos de reforzar la estructura del sistema, produce un debilitamiento neto de la misma.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (España) la financiación de este trabajo a través del proyecto de investigación TEP-6134.

Los autores agradecen al Servicio de Microscopía del CITIUS (Universidad de Sevilla) por permitir el acceso y ofrecer la asistencia técnica necesaria para la obtención de las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM).

BIBLIOGRAFÍA

1. Li-Chan, E.C.Y.; Powrie, W.D.; Nakai, S. The chemistry of eggs and egg products. In *Egg science and technology*; Stadelman, W.J.; Cotterill, O.J., Eds.; Haworth Press, New York, 1985; pp. 105-175.
2. Anton, M. Egg yolk: structures, functionalities and processes. *J. Sci. Food Agric.* **2013**, *93*(12), 2871-2880.
3. Kiosseoglou, V. Egg yolk protein gels and emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **2003**, *8*, 365-370.
4. Guerrero, A.; Carmona, J.A.; Martínez, I.; Corobés, F.; Partal, P. Effect of pH and added electrolyte on the thermal-induced transitions of egg yolk. *Rheol. Acta*, **2004**, *43*, 539-549.
5. Corobés, F.; Partal, P.; Guerrero, A. Rheology and microstructure of heat-induced egg yolk gels. *Rheol. Acta*, **2004**, *43*, 184-195.

6. Aguilar, J.M.; Cordobés, F.; Jerez, A.; Guerrero, A. Influence of high pressure processing on the linear viscoelastic properties of egg yolk dispersions. *Rheol. Acta*, **2007**, *46*, 731-740.
7. Raikos, V.; Campbell, L.; Euston, S.R. Rheology and texture of hen's egg protein heat-set gels as affected by pH and the addition of sugar and/or salt. *Food Hydrocolloids*, **2007**, *21*, 237-244.
8. Aguilar, J.M.; Cordobés, F.; Bengoechea, C.; Guerrero, A. Heat-induced gelation of egg yolk as a function of pH. Does the acid anion make any difference? *Food Hydrocolloids*, **2019**, *87*, 142-148.
9. Clark, A.H. Gelation of globular proteins. In *Functional properties of macromolecules (2nd Ed.)*; Hill, S.E.; Ledward, D.A.; Mitchell, J.R., Eds.; Aspen Publishers, Inc: Maryland, 1998; pp. 77-142.
10. Aguilera, J.M.; Rademacher, B. Protein gels. In *Proteins in food processing*; Yada, R.Y., Ed.; Woodhead Publishing Limited & CRC Press: Cambridge, 2004; pp. 468-482.
11. Aguilar, J.M.; Batista, A.P.; Nunes, M.C.; Cordobés, F.; Raymundo, A.; Guerrero, A. From egg yolk/ κ -Carrageenan dispersions to gel systems: Linear viscoelasticity and texture analysis. *Food Hydrocolloids*, **2011**, *25(4)*, 654-658.
12. Aguilar, Cordobés, F.; Raymundo, A.; Guerrero, A. Thermal gelation of mixed egg yolk/ κ -carrageenan dispersions. *Carbohydrate Polymers*, **2017**, *161*, 172-180.
13. Hegg, P. O. Conditions for the formation of heat-induced gels of some globular food proteins. *Journal of Food Science*, **1982**, *47*, 1241-1244.
14. Clark, A. H.; Kavanagh, G. M.; Ross-Murphy, S. B. Globular protein gelation - theory and experiment. *Food Hydrocolloids*, **2001**, *15*, 383-400.
15. Resch, J.J.; Daubert, C.R.; Foegeding, E.A. The effects of acidulant type on the rheological properties of beta-lactoglobulin gels and powders derived from these gels. *Food Hydrocolloids*, **2005**, *19*, 851-860.
16. Kiosseoglou, V.; Paaskevopoulou, A. Molecular interactions in gels prepared with egg yolk and its fractions. *Food Hydrocolloids*, **2005**, *19*, 527-532.
17. Aguilar, J.M.; Jaramillo, A.; Cordobés, F.; Guerrero, A. Influencia del procesado térmico sobre la reología de geles de albumen de huevo. *Afinidad*, **2010**, *545*, 1-6.
18. Reglamento CE 2295/2003 por el que se establecen las disposiciones de aplicación del Reglamento (CEE) n° 1907/90 del Consejo relativo a determinadas normas de comercialización de los huevos. *Diario Oficial de la Unión Europea* (24-12-2003).
19. Harrison, L.J.; Cunningham, F.E. Influence of salt on properties of liquid yolk and functionality in mayonnaise. *Poultry Sci.*, **1986**, *65*, 915-921.
20. Miranda, J.; Partal, P.; Cordobés, F.; Guerrero, A. Rheological characterization of egg yolk processed by spray-drying and lipid-cholesterol extraction with carbon dioxide. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **2002**, *79(2)*, 183-190.
21. Codex Alimentarius. General Standards for Food Additives (GSFA), FAO/WHO (2017). <http://www.fao.org/gsfaonline/additives/details.html?id=178&lang=en>. accessed May 24, 2018).
22. Sanchez, A. C.; Burgos, J. Gelation of sunflower globulin hydrolysates: Rheological and calorimetric studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1997**, *45(7)*, 2407-2412.
23. Pilosof, A.M.R.. Gelation. En *Caracterización estructural y funcional de proteínas*. Pilosof, A.M.R.; Bartholomai, G.B., Eds.; Cytod-Eudeba: Buenos Aires, 2000; pp. 75-95.
24. Weijers, M.; Sagis, L.M.C.; Veerman, C.; Sperber, B.; van der Linden, E. Rheology and structure of ovoalbumin gels at low pH and low ionic strength. *Food Hydrocolloids*, **2002**, *16(3)*, 269-276.
25. Boye, J.I.; Ma, C.Y.; Harwalkar, V.R. In *Food proteins and their applications*; Damodaran, S.; Paraf, A., Eds; Marcel Dekker: New York, 1997; pp 25-56.
26. Boye J.I.; Ma, C.Y.; Ismail, A.; Harwalkar, V.R.; Kalab, M. Molecular and microstructural studies of thermal denaturation and gelation of β -lactoglobulins, A and B. *J. Agr. Food Chemistry*, **1997**, *45*, 1608-1618.
27. Verheul, M.; Roefs, S.P.F.M. Structure of particulate whey protein gels: Effect of NaCl concentration, pH, heating temperature, and protein composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1998**, *46(12)*, 4909-4916.
28. Aymard, P.; Nicolai, T.; Durand, D.; Clark, A. Static and dynamic scattering of β -lactoglobulin aggregates formed after heat-induced denaturation at pH 2. *Macromolecules* **1999**, *32*, 2542-2552.
29. Nishinari, K.; Zhang, H.B.; Ikeda, S. Hydrocolloid gels of polysaccharides and proteins. *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.* **2000**, *5*, 195-201.