

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**OPTIMIZACIÓN DE LA FORMULACIÓN DE UNA SALSA  
APTA PARA CALENTAR EN MICROONDAS: ESTUDIO  
QUÍMICO Y MICROESTRUCTURAL**

**TESIS DOCTORAL**

PRESENTADA POR:

**Luis Miguel Guardeño Expósito**

DIRECTORAS:

**Dra. Isabel Hernando Hernando**

**Dra. Amparo Quiles Chuliá**

*Valencia, Abril 2012*





ISABEL HERNANDO HERNANDO, CATEDRÁTICA DE UNIVERSIDAD, Y AMPARO QUILES CHULIÁ, TITULAR DE UNIVERSIDAD, AMBAS DEL DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA,

CONSIDERAMOS: que la memoria titulada **Optimización de la formulación de una salsa apta para calentar en microondas: estudio químico y microestructural**, que presenta Don Luis Miguel Guardado Expósito, para aspirar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia, y que ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Grupo de Investigación de Microestructura y Química de Alimentos de la Universidad Politécnica de Valencia, reúne las condiciones adecuadas para constituir su tesis doctoral, por lo que

AUTORIZAMOS al interesado su presentación

Valencia, España, a 5 de febrero de 2012

Isabel Hernando Hernando

Amparo Quiles Chuliá

Directora de tesis

Directora de tesis





## **AGRADECIMIENTOS**

Los que me conocen bien saben que podría emplear un volumen de hojas equivalente al del manuscrito de la tesis únicamente escribiendo los agradecimientos. No sólo por la cantidad de gente que ha hecho posible este trabajo o que ha sido parte importante de mi vida durante este tiempo, sino también por la capacidad que tengo de enrollarme como las persianas. Así que perdonadme si me extiendo demasiado, pero es vuestra culpa por haberme dado la oportunidad de llegar hasta aquí.

El inicio de este viaje se remonta, indirectamente, a hace diez años cuando apenas cinco centésimas me separaron de comenzar a estudiar Fisioterapia en la Universitat de València. En ese momento maldije mi pereza durante mi año sabático de COU, pero hoy considero que fue lo mejor que me pudo pasar en la vida.

Esa dichosa distancia me “obligó” a escoger mi segunda opción en la lista de carreras universitarias, “Nutrición Humana y Dietética”. Al poco de comenzar me di cuenta de que me encantaba lo que estaba estudiando y pese a que el futuro laboral de una carrera con tan poco recorrido no estaba nada asegurado, aparecieron unos factores determinantes que me convencieron de haber escogido el mejor de los caminos, esos factores son “mis ángeles de Charlie”, Lorena, Silvia, Juani, Bea y Ángela. Cada una me habéis aportado algo y el conjunto es un todo inmejorable. Gracias a vosotras pasé una de las mejores etapas de mi vida y lo mejor de todo es que estoy convencido de que, lejos de acabar, esa etapa no ha hecho más que comenzar. Sois una parte esencial de mí y como tal lo seréis para siempre. Os quiero.

En el tercer año de carrera llegó la hora de escoger el lugar para realizar las prácticas externas y no dudé ni un momento en hacerlas en el Hospital Clínico Universitario de Valencia, no sólo porque consideraba que era el lugar más idóneo para desarrollar lo aprendido durante la diplomatura, sino porque iba a ser supervisado por Pepa Gabaldón que fue una de las profesoras que más se implicaron por esta incipiente carrera. Pepa, muchas gracias por ser la primera

que me metió en la cabeza la idea de hacer la tesis doctoral. Contigo aprendí cómo se ha de tratar a un paciente de manera integral en una consulta dietética y como llevar una sonrisa puesta todo el día. Ojalá existieran más personas que se vuelquen tanto en esa tarea como tú lo haces. Gracias por ser la chispa que encendió este fuego.

Al acabar la diplomatura me encontré ante la primera crisis existencial. Como se presentía en un principio, la falta de previsión a la hora de ofertar plazas en el Sistema Nacional de Salud para diplomados en Nutrición Humana y Dietética abocó a mi promoción a elegir entre la consulta dietética privada o la nada. Ante esa disyuntiva elegí —y como yo unos cuantos más— una tercera vía: continuar con un segundo ciclo para completar la licenciatura de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Entre seguir en la Universitat de València o trasladarme a la Politècnica no dude ni un segundo en escoger la segunda opción, necesitaba un cambio de aires y allí encontré una buena brisa de mar cargada de términos ingenieriles. Esta vez, fue la doctora Susana Fiszman la que me dio la oportunidad de hacer las prácticas externas en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) bajo su supervisión. Gracias Susana por tu confianza.

En esta segunda etapa conocí a mis tecnólogas favoritas: mi “mol” Virginia, Laura y Silvia. Con vosotras un “aceto” como yo ha aprendido a vivir experiencias tan importantes como “querer en la distancia” y “arriesgarse por lo que quieres”.

Al finalizar la licenciatura, llegó la segunda crisis existencial acompañando a la otra crisis, la económica, que empezaba a dar señales de vida. Ante ese contexto, me acordé de las palabras de Pepa y gracias a la idea de Lorena me planté en el despacho de Isabel Hernando con la mente puesta en realizar la tesis doctoral. Isabel, te doy las gracias por primera vez simplemente por darme la oportunidad de trabajar contigo. En este punto también quiero agradecer a la Universitat Politècnica de València (UPV) por haberme concedido una beca de excelencia para desarrollar mi tesina de máster en el Grupo de Microestructura y Química de Alimentos (MIQUALI) del Departamento de Tecnología de Alimentos y por supuesto al Ministerio de Ciencia e Innovación por concederme posteriormente

una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) que ha sido la fuente de financiación sin la que todo este trabajo no hubiera llegado a buen puerto.

Durante los siguientes cuatro años de esta etapa de mi viaje, he trabajado con una serie de personas a las que quiero agradecer de manera especial.

A los doctores Pedro J. Plaza y José M. Catalá del Instituto de Aplicaciones de las Tecnologías de la Información (ITACA) de la UPV por ayudarme con las particularidades del calentamiento en microondas y facilitarme la determinación de las propiedades dieléctricas.

Al doctor José Miguel Carot del Departamento de Estadística e Investigación Operativa Aplicadas y Calidad de la UPV por su inestimable ayuda en el análisis estadístico de los datos. Los diseños centrales compuestos rotables ortogonales y yo te estaremos infinitamente agradecidos.

A las doctoras Susana Fiszman, Ana Salvador y Teresa Sanz del IATA por enseñarme los fundamentos de la reología, ayudarme ante cualquier duda y estar siempre disponibles para lo que necesitara. Sin vosotras una gran parte de esta tesis doctoral no hubiera podido realizarse. Asimismo, agradecer al resto de su equipo por hacer que cada visita al IATA fuera como estar en mi propio laboratorio: Amparo, Ángela, Laura, Paula, Raquel y Sandra, muchísimas gracias.

Al doctor Pepe Pertusa, porque si existieran más profesores como él, el fracaso estudiantil en España sería una mera anécdota. Tu manera de transmitir y el entusiasmo con que lo haces son auténticos dones. Pero lo realmente importante es tu calidad humana. Gracias por dedicar tanto tiempo a enseñarme que un píxel es mucho más que un cuadradito de la pantalla.

A mis directoras Isabel Hernando y Amparo Quiles. A ti Isabel por haberme enseñado a investigar, a hacer frente a los problemas de una manera práctica y a ser mucho más eficiente de lo que de un tiquismiquis como yo cabría esperar. Pero sobre todo gracias por haber confiado en mí siempre, haber soportado mis malos momentos aconsejándome como la mejor de las amigas, por tu paciencia cuando no lo he hecho bien y tus ánimos cuando todo ha ido sobre ruedas.

Contigo he crecido como persona, me has hecho “mayor”. A ti Amparo, porque tus clases de “propiedades químicas” eran la mejor manera de convencer a alguien de entrar en el grupo. Gracias por estar siempre disponible cuando he necesitado tu ayuda y por tu encantadora manera de ser. Te diría aquello de “no se puede ser tan buena persona porque luego se aprovechan de ti” pero entonces dejarías de ser tú y el resto no nos aprovecharíamos, así que déjalo estar.

Las dos sabéis que no os he considerado nunca mis directoras de tesis porque no os merecéis otra cosa que ser consideradas parte de mi familia.

A Isabel Pérez, porque las buenas personas no se definen por todo lo que son capaces de llenar, sino por el vacío que dejan en su ausencia y el que nos dejaste es inabarcable. Estés donde estés, gracias.

A toda mi gente de MIQUALI por convertir un grupo de trabajo en una familia. No sabéis hasta que punto me siento afortunado por haber compartido este tiempo con vosotros. A Ana Puig por ser el corazón, a Empar Llorca por ser el alma y a Virginia Larrea por ser el pulmón sin el que este grupo no hubiera funcionado tan bien como lo ha hecho.

A María Hernández porque mi tesis es tu tesis, no hubiera conseguido nada sin ti. Gracias por ser mi compañera de trabajo, de piso y sobre todo mi amiga, por haber sido un pañuelo en los peores momentos, regañarme cuando mi capacidad de despiste superaba los límites tolerables y reírte conmigo como lo haces. Marido y mujer en versión laboratorio. Sé que las veces que me ha tocado dormir en el “sofá” son merecidas y me has enseñado que lo “importante” es un término subjetivo y por tanto hay que ceder hasta llegar a un consenso. “En el punto medio está la virtud”, gracias por haber sido mi Aristóteles particular.

A José Luis, por ser especial en el sentido más amplio de la palabra. Eres especialmente trabajador, especialmente inteligente y especialmente genial. Eres de ese tipo de personas que no se callan nada y gracias a esas personas el mundo funciona todavía y digo todavía porque, desgraciadamente, no existen muchas personas como tú para que siga funcionando por mucho más tiempo. Empezamos juntos este camino y lo vamos a acabar juntos también. Sé que tu

futuro está lejos, pero no porque te “toque” irte fuera, sino porque está tan lejos como una mente como la tuya desee imaginar.

A “Jules” por haberle dado una vida especial al laboratorio, porque un culo inquieto como tú puede mover la más oxidada de las ruedas dentadas. Todavía no me explico cómo cabe tanto espíritu en un cuerpo tan pequeño. Eres el archivo “zip” de la constancia y cuando te descomprimas lo alcanzarás todo. Te deseo lo mejor en la nueva etapa que estás a punto de empezar, disfruta de cada instante porque luego los echarás todos de menos.

A todos con los que he compartido laboratorio durante la tesis: Juanvi, Laura, Raquel, Indira, Vero, Stefano, Cristian, Elisabetta, Lilia y Annamaria. El mayor o menor tiempo que he pasado con vosotros ha acabado con el mismo resultado: llevaros siempre conmigo. A los últimos en aparecer por allí, Pere y Olga, os deseo lo mejor con todas mis fuerzas.

A los pesados del laboratorio de arriba que a pesar de que sólo saben robar agua destilada, gorronear el liofilizador y atormentarnos con los ultrasonidos, son geniales. Carmina, Edith, Julián, César, Jaime, Marga y Jader, ha sido un placer compartir este tiempo con vosotros.

A “IATA women” Mari Pau y Virginia, por los buenos momentos durante el máster.

A todo el personal del Departamento de Tecnología de Alimentos y del Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo de la UPV que en algún momento me ha ayudado en mi trabajo. En especial a Juan, Amparo y Merche por vuestra eficiencia y simpatía y a María Benlloch por facilitarme la medida de la temperatura en el microondas.

I want to thank Dr. David Everett for giving me the opportunity of staying at the University of Otago in New Zealand during the last months of my thesis. Thank you very much for your kindness, expertise and help every time I have needed them. I also want to thank Dr. Pat Silcock for his help regarding PTR-MS analyses, Michelle and Ian for their technical support, and Jo and Sarah for their smile. And

of course I want to thank Pankaj, Shaeri, Mohammad, Haotiang, Shahin, Mario, Kalpana, Ali, Claudia, Sze, Jun and Raseetha for all your help and friendship during my short stay. It was a pleasure to meet you. As the song from "Crowded House" says: "I will take the weather with me".

Dicen que el tiempo pasa más rápido cuando disfrutas del viaje y a mí llegar hasta esta estación se me ha pasado volando porque he estado muy bien acompañado durante todo el trayecto. Algunos de mis acompañantes ya subieron al tren desde el origen, otros han ido subiendo en cada parada, pero quiero que todos estén conmigo cuando llegue a mi destino final.

En un vagón está mi "comunidad del anillo" que ha conseguido que nuestra "comarca" particular sea un lugar paradisiaco. María, todas las sonrisas y llantos en nuestros innumerables cafés me avisan del paso de los años, como lo hacen los preciosos rizos de Sara o lo lejano de aquellas palabras que le dije a Wate frente del "Mundidulce". Momentos inolvidables junto a Willy, Marcos y Rambla. Vosotros sois la constante en mi ecuación, siempre a mi lado, pasara lo que pasara y pase lo que pase. Tanto tiempo juntos nos ha hecho eternos. Gracias a vosotros han subido Marta, Maite y Juan y sé que no bajaran en la próxima parada.

A otro vagón subieron "mis ángeles de Charlie" en la parada de Nutrición y Dietética y en el siguiente encontramos a Reyes, María, Sara, Lidia, Noelia y Gemma. Ellas subieron porque Ángela, actuando de interventora, les dio paso y luego me encargué de colocarlas en primera clase, al fin y al cabo ellas me pagan una tarifa muy especial con su manera de ser.

En el vagón de logística están Fran, Sisco, Javi, Ana, Edd, Edu, Marcos, Marcelo y Laura con tantos buenos momentos en la pista de volley. Ahora que nos la han "privatizado" nos veremos en la playa, o mejor, en el chalet de Ana. Me comprometo a hacer las paellas si vosotros ponéis la mejor de las compañías. En un asiento de este vagón, Alessandro acaba de empezar a tocar la guitarra.

Avanzando por el pasillo de comunicación, dentro de un vagón enorme están Shey, Estrella, Estefanía, María, Carlos y Sara que subieron en la parada anterior.

También están Silvia, José Antonio y Jorge que recogí en la parada del Centro de Lenguas. Violeta viaja con su pequeña Marina cogida en brazos. Amada, Rosana, Cris, María Valero y Amparo subieron en la parada de Yecla donde habían quedado con José Luis y María. Todos subieron para hacerme la vida más feliz. Félix, Nadia y Alba Sanchis no paran de aconsejarme sobre cómo mejorar las vías del tren antes de llegar al final del viaje.

Los miembros de mi familia compraron el billete para todas las zonas y me acompañan desde el principio. Como no podía ser de otra manera, están armando jaleo en su vagón. Mi hermano Juanjo ha sido una barra donde agarrarme durante el viaje y mi hermana Mari un ejemplo de constancia. Gracias a vosotros he conseguido apreciar las cosas importantes de la vida, madurar a base de multitud de experiencias y consolidar mis valores. Un reconocimiento especial para Sandra y Juanjo por haber conseguido soportarlos a diario —sin morir en el intento— y hacerlos felices como lo hacéis. Os quiero a todos.

En la sala de máquinas está mi madre. Ella es el motor de mi vida, es mi principio y mi final. La persona que me ha dado todo y a la que todo se lo debo y sin embargo no me pedirá jamás que se lo devuelva. Te quiero mamá. Gracias Tomás por hacerla feliz.

Por último quiero dar las gracias a Alba por subirse un día al tren y entre tanto hueco libre sentarse a mi lado, mirarme a los ojos y decirme todo lo que necesitaba para ser el hombre más feliz del mundo, cogerme de la mano y hacerlo realidad. Gracias por hacer de mi viaje nuestro viaje. Te quiero tanto...





## RESUMEN

En los últimos años se han producido cambios en los hábitos de consumo alimentario causados principalmente por un menor tiempo disponible para la preparación de las comidas y la reducción del número de personas por unidad familiar. El sector de los platos preparados se ha consolidado en el mercado, ofreciendo al consumidor productos de fácil y rápida preparación. En este contexto, el horno microondas se ha convertido en un electrodoméstico indispensable en cada hogar por su facilidad de uso y rapidez en la preparación de este tipo de productos. Las peculiaridades del calentamiento por microondas, donde la composición del propio alimento influye de manera crucial, dificulta la predicción generalizada del patrón de calentamiento en alimentos y hace necesario un estudio individualizado para cada caso en particular. Por tanto, la tendencia actual consiste en diseñar alimentos que sean aptos para el calentamiento en microondas desde la propia formulación de los mismos.

En la presente tesis doctoral se estudiaron sistemas modelo tipo salsa bechamel como ejemplo de producto elaborado que se comercializa por sí solo o formando parte de platos preparados. Inicialmente, se analizó el impacto de la formulación de sistemas modelo elaborados con sal, agua y distintos hidrocoloides (almidones y carragenatos) en las propiedades intrínsecas del calentamiento en microondas (propiedades dieléctricas) y en las propiedades reológicas y microestructurales. A continuación, se analizaron las propiedades microestructurales y reológicas de salsas elaboradas con diversos almidones (nativos y modificados) con el fin de observar el comportamiento frente al calentamiento en horno microondas. Además, se analizó la estabilidad química y microestructural de salsas formuladas con diferentes proteínas (láctea o de soja) frente a un proceso de congelación-descongelación en horno microondas o convencional. Por último, se analizaron la microestructura y las propiedades dieléctricas de salsas elaboradas con diferentes grasas (mantequilla y aceites de oliva, girasol y soja) preparadas a diferentes velocidades de agitación.

Los resultados indicaron un efecto significativamente negativo ( $P < 0.05$ ) de los almidones frente al calentamiento en microondas. Por lo que se propuso una

sustitución parcial de éstos mediante el uso de carragenato como base hidrocarbonada para la elaboración de las salsas. Por otro lado, se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en los parámetros reológicos analizados en función del tipo de almidón empleado en la elaboración de las salsas, aunque se observó una estabilidad generalizada en estos parámetros frente al proceso de calentamiento en microondas. La microestructura se vio afectada en relación al tamaño de los glóbulos de grasa y la agregación de proteínas, en especial en las salsas elaboradas con almidones modificados y sometidas a tiempos prolongados de calentamiento. Con respecto al efecto de los procesos de descongelación en la estabilidad química y microestructural, se observaron diferentes resultados en función del tipo de proteína utilizado en la elaboración de la salsa, no obstante la descongelación en horno microondas afectó en menor medida a los parámetros analizados en comparación al horno convencional. Por último, se comprobó que un aumento en la velocidad de agitación durante la preparación provocaba una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) en el tamaño de los glóbulos de grasa, independientemente del tipo de grasa empleado, mientras que la descongelación no afectaba al tamaño ni la forma de los glóbulos de grasa en este tipo de salsas.

La elaboración de salsas aptas para el calentamiento en microondas pudo lograrse mediante mezclas de almidón y carragenato. Asimismo, las fuentes de proteínas utilizadas en la formulación (leche desnatada en polvo y aislado de proteína de soja) resultaron ser adecuadas para la obtención de salsas estables a los procesos de almacenamiento en frío y posterior calentamiento. En este contexto, el empleo de derivados de soja (tanto proteína como aceite) puede resultar útil en el desarrollo de alternativas a los derivados lácteos en este tipo de productos.

## RESUM

En els últims anys s'han produït canvis en els hàbits de consum alimentari causats principalment per un menor temps disponible per a la preparació dels menjars i la reducció del nombre de persones per unitat familiar. El sector dels plats preparats s'ha consolidat en el mercat, oferint al consumidor productes de fàcil i ràpida preparació. En aquest context, el forn microones s'ha convertit en un electrodomèstic indispensable en cada llar per la seua facilitat d'ús i rapidesa en la preparació d'aquest tipus de productes. Les peculiaritats del calfament per microones, on la composició del propi aliment influïx de manera crucial, dificulta la predicció generalitzada del patró de calfament en aliments i fa necessari un estudi individualitzat per a cada cas en particular. Per tant, la tendència actual consistix a dissenyar aliments que siguen aptes per al calfament en microones des de la pròpia formulació dels mateixos.

En la present tesi doctoral es van estudiar sistemes model tipus salsa beixamel com a exemple de producte elaborat que es comercialitza de manera individual o formant part de plats preparats. Inicialment, es va analitzar l'impacte de la formulació de sistemes model elaborats amb sal, aigua i distints hidrocoloides (midons i carragenines) en les propietats intrínseques del calfament en microones (propietats dielèctriques) i en les propietats reològiques i microestructurals. A continuació, es van analitzar les propietats microestructurals i reològiques de salses elaborades amb diversos midons (nadius i modificats) a fi d'observar el comportament enfront del calfament en forn microones. A més, es va analitzar l'estabilitat química i microestructural de salses formulades amb diferents proteïnes (làctia o de soia) sotmeses a un procés de congelació-descongelació en forn microones o convencional. Finalment, es van analitzar la microestructura i les propietats dielèctriques de salses elaborades amb diferents greixos (mantega i olis d'oliva, gira-sol i soia) preparades a diferents velocitats d'agitació.

Els resultats van indicar un efecte significativament negatiu ( $P < 0.05$ ) dels midons contra el calfament en microones. Per això, es va proposar una substitució parcial d'estos per mitjà de l'ús de carragenina com a base hidrocarbonada per a l'elaboració de les salses. D'altra banda, es van trobar diferències significatives

( $P < 0.05$ ) en els paràmetres reològics estudiats en funció del tipus de midó empleat en l'elaboració de les salses, encara que es va observar una estabilitat generalitzada en aquests paràmetres al analitzar el procés de calfament en microones. La microestructura es va veure afectada en relació a la grandària dels glòbuls de greix i l'agregació de proteïnes, en especial en les salses elaborades amb midons modificats i sotmeses a temps prolongats de calfament. Respecte a l'efecte dels processos de descongelació en l'estabilitat química i microestructural, es van observar diferents resultats en funció del tipus de proteïna utilitzat en l'elaboració de la salsa, no obstant això, la descongelació en forn microones va afectar en menor grau als paràmetres analitzats en comparació amb el forn convencional. Finalment, es va comprovar que un augment en la velocitat d'agitació durant la preparació provocava una disminució significativa ( $P < 0.05$ ) en la grandària dels glòbuls de greix, independentment del tipus de greix empleat, mentre que la descongelació no afectava la grandària ni la forma dels glòbuls de greix en aquest tipus de salses.

L'elaboració de salses aptes per al calfament en microones va poder aconseguir-se per mitjà de mescles de midó i carragenina. Així mateix, les fonts de proteïnes utilitzades en la formulació (llet desnatada en pols i aïllat de proteïna de soia) van resultar adequades per a l'obtenció de salses estables als processos d'emmagatzemament en fred i posterior calfament. En aquest context, l'ús de derivats de soia (tant proteïna com oli) pot resultar útil en el desenvolupament d'alternatives als derivats lactis en aquest tipus de productes.

## SUMMARY

Food consumption habits have recently changed due to the lack of time to cook and a decrease in the number of household members. The ready-to-eat meals sector has consolidated its position in the food market by offering products that are easily prepared. In this context, the microwave oven has become an essential appliance in every home because it is a quick and easy way to prepare such products. The peculiarities of microwave heating, where the own food formulation has a crucial impact, make it difficult to achieve a general prediction of microwave heating pattern in foodstuff and so it is necessary to study each particular case. Therefore, the current trend is to design microwaveable food starting with the formulation itself.

In the present dissertation, model bechamel sauce systems were studied as an example of a marketed product which is also used in other ready-to-eat products. Initially, the effect of formulation of different model systems made with salt, water and different hydrocolloids (starches and carrageenans) on the essential microwave heating properties (dielectric properties), rheology and microstructure was analysed. Then, the microstructural and rheological properties of sauces made with different starches (native and modified) were studied in order to assess their behaviour under microwave heating. Moreover, the chemical and microstructural stability of sauces made with different proteins (milk and soy protein isolate) subjected to a freeze-thaw process in a microwave or conventional oven were also analysed. Finally, the microstructure and dielectric properties of sauces made with different fats (butter, and olive, sunflower and soy oils) and prepared at different agitation speeds were studied.

The results showed a significant negative effect ( $P < 0.05$ ) of starch on microwave heating. Therefore, a partial substitution of starch with carrageenan as the carbohydrate base of the sauces was proposed. On the other hand, there were significant differences ( $P < 0.05$ ) in the rheological parameters values depending on the type of starch used, however these values remained generally stable when sauces were subjected to microwave heating. There were changes in the microstructure regarding fat globules size and protein aggregation when sauces

were subjected to microwaves especially during prolonged heating. The chemical and microstructural stability of samples subjected to a freeze-thaw process depended on the type of protein used in the system, however, thawing in microwave oven has a lower impact in the parameters analysed in comparison with conventional oven. Finally, an increase in the agitation speed caused a significant decrease ( $P < 0.05$ ) on the fat globule size regardless the type of fat used in the formulation, whilst the thawing method did not significantly affect the morphology and size of fat globules in this type of sauces.

The preparation of microwavable sauces was possible using a mixture of starch and carrageenan. Moreover, the protein sources used in the formulation (skimmed milk powder and soy protein isolate) proved to be appropriate to obtain sauces stable to cold storage and reheating processes. In this context, the use of soy products (both protein and oil) could be appropriate to develop alternatives to dairy products in this type of foodstuff.

**ÍNDICE GENERAL**

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>I.1. CONSUMO DE PLATOS PREPARADOS Y SALSAS .....</b>	<b>3</b>
<b>I.2. LA SALSA BLANCA. COMPOSICIÓN .....</b>	<b>4</b>
I.2.1. HIDRATOS DE CARBONO .....	5
I.2.2. PROTEÍNAS .....	7
I.2.3. GRASAS .....	8
<b>I.3. CALENTAMIENTO EN MICROONDAS .....</b>	<b>8</b>
I.3.1. LAS MICROONDAS .....	8
I.3.2. EL HORNO MICROONDAS .....	8
I.3.3. CALENTAMIENTO EN MICROONDAS .....	9
<b>I.4. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES DIELÉCTRICAS EN SISTEMAS CON HIDROCOLOIDES .....</b>	<b>11</b>
<b>I.5. CAMBIOS QUÍMICOS EN SISTEMAS ALIMENTARIOS TRATADOS POR MICROONDAS .....</b>	<b>13</b>
<b>I.6. REOLOGÍA. APLICACIONES EN EL ESTUDIO DE SISTEMAS ALIMENTARIOS. ....</b>	<b>15</b>
I.6.1. ENSAYOS REOLÓGICOS .....	15
I.6.2. ESTUDIOS REOLÓGICOS EN SISTEMAS ALIMENTARIOS CON HIDROCOLOIDES .....	16
<b>I.7. MICROESTRUCTURA Y ANÁLISIS DE IMAGEN .....</b>	<b>18</b>
I.7.1. CONCEPTOS PREVIOS DE ANÁLISIS DE IMAGEN DIGITAL .....	18
I.7.2. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES. MICROSCOPIA DE BARRIDO ....	20
I.7.3. DIGITALIZACIÓN DE LA IMAGEN .....	23
I.7.4. PROCESADO Y ANÁLISIS DE IMAGEN .....	23
I.7.5. ESTUDIO DE LA MICROESTRUCTURA DE SISTEMAS ALIMENTARIOS CON HIDROCOLOIDES .....	24

<b>I.8. ESTUDIOS REOLÓGICOS Y MICROESTRUCTURALES COMBINADOS .....</b>	<b>25</b>
<b>II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....</b>	<b>29</b>
<b>II.1. OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
II.1.1. OBJETIVO GENERAL .....	31
II.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>II.2. PLAN DE TRABAJO.....</b>	<b>31</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
<b>III.1. INGREDIENTES.....</b>	<b>35</b>
<b>III.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS .....</b>	<b>36</b>
III.2.1. PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS MODELO.....	36
III.2.2. PREPARACIÓN DE LAS SALSAS BECHAMEL .....	37
<b>III.3. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS .....</b>	<b>38</b>
<b>III.4. DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DURANTE EL CALENTAMIENTO .....</b>	<b>39</b>
III.4.1 HORNO MICROONDAS.....	39
III.4.2 HORNO CONVENCIONAL.....	40
<b>III.5. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES DIELECTRICAS .....</b>	<b>40</b>
<b>III.6. ANÁLISIS QUÍMICOS.....</b>	<b>41</b>
III.6.1. HUMEDAD .....	41
III.6.2. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN DE PROTEÍNAS .....	41
III.6.2.1. NITRÓGENO TOTAL Y SOLUBLE .....	41
III.6.2.2. ELECTROFORESIS SDS-PAGE .....	42
III.6.3. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN DE LÍPIDOS .....	43
III.6.4. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO ....	43



<b>III.7. SINÉRESIS .....</b>	<b>43</b>
<b>III.8. ANÁLISIS REOLÓGICOS.....</b>	<b>44</b>
III.8.1. ENSAYOS DE FLUJO VISCOSO .....	44
III.8.2. ENSAYOS DINÁMICOS OSCILATORIOS .....	45
<b>III.9. ANÁLISIS MICROESTRUCTURAL .....</b>	<b>46</b>
III.9.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO A BAJAS TEMPERATURAS (CRYO-SEM).....	46
III.9.2. MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL DE BARRIDO(CLSM) .....	46
III.9.3. PROCESADO Y ANÁLISIS DE IMAGEN .....	48
III.9.3.1. OPERACIONES SOBRE LA IMAGEN EN ESCALA DE GRISES .....	48
III.9.3.2. SEGMENTACIÓN .....	52
III.9.3.3. OPERACIONES SOBRE IMÁGENES BINARIAS.....	53
III.9.3.4. ANÁLISIS DE IMAGEN .....	55
<b>III.10. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>58</b>
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>61</b>
<b>IV.1.                  PROPIEDADES                  DIELÉCTRICAS, MICROESTRUCTURALES Y DE FLUJO DE SISTEMAS MODELO ELABORADOS CON DISTINTOS HIDROCOLOIDES Y SAL.....</b>	<b>63</b>
IV.1.1. PROPIEDADES DIELÉCTRICAS .....	63
IV.1.1.1. FACTOR DE PÉRDIDAS .....	63
IV.1.1.2. PROFUNDIDAD DE PENETRACIÓN.....	67
IV.1.2. MICROESTRUCTURA .....	70
IV.1.3. PROPIEDADES DE FLUJO.....	72
<b>IV.2.                  CARACTERIZACIÓN                  REOLÓGICA                  Y MICROESTRUCTURAL                  DE                  SALSAS                  BECHAMEL</b>	

<b>ELABORADAS CON DISTINTOS TIPOS DE ALMIDÓN Y CALENTADAS AL MICROONDAS.....</b>	<b>78</b>
<b>IV.2.1. ESPECTROS MECÁNICOS.....</b>	<b>78</b>
IV.2.1.1 INFLUENCIA DEL TIPO DE ALMIDÓN. MUESTRAS RECIÉN ELABORADAS.....	79
IV.2.1.2. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE RECALENTAMIENTO .....	82
<b>IV.2.2. MICROSCOPIA LASER CONFOCAL DE BARRIDO (CLSM) Y ANÁLISIS DE IMAGEN .....</b>	<b>84</b>
<b>IV.3. ESTABILIDAD FÍSICOQUÍMICA Y MICROESTRUCTURAL DE SALSAS ELABORADAS CON DISTINTAS PROTEÍNAS FRENTE AL PROCESO DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN.....</b>	<b>90</b>
<b>IV.3.1. ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD FÍSICOQUÍMICA .....</b>	<b>90</b>
IV.3.1.1. ANÁLISIS PROTEICO .....	90
IV.3.1.2. ANÁLISIS LIPÍDICO.....	97
IV.3.1.3. ANÁLISIS DE LOS HIDRATOS DE CARBONO.....	98
IV.3.1.4. SINÉRESIS .....	99
<b>IV.3.2. MICROESTRUCTURA .....</b>	<b>100</b>
<b>IV.4. ESTABILIDAD MICROESTRUCTURAL DE SALSAS ELABORADAS A DISTINTAS VELOCIDADES DE AGITACIÓN Y CON DISTINTOS TIPOS DE GRASA FRENTE AL PROCESO DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN.....</b>	<b>103</b>
<b>IV.4.1. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS RECIÉN PREPARADAS .....</b>	<b>103</b>
IV.4.1.1. MICROSCOPIA LASER CONFOCAL DE BARRIDO (CLSM)103	
IV.4.1.2. ANÁLISIS DE IMAGEN.....	104
IV.4.1.3. PROPIEDADES DIELECTRICAS .....	106
<b>IV.4.2. MUESTRAS SOMETIDAS AL CICLO DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN .....</b>	<b>110</b>
IV.4.2.1. MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL DE BARRIDO (CLSM)110	
IV4.2.2. ANÁLISIS DE IMAGEN.....	112

IV.4.3. COMPARACIÓN ENTRE LAS MUESTRAS RECIÉN ELABORADAS Y LAS SOMETIDAS AL CICLO DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN .....	114
<b>V. CONCLUSIONS .....</b>	<b>119</b>
<b>VI. REFERENCIAS .....</b>	<b>123</b>
<b>VII. ABREVIATURAS .....</b>	<b>133</b>
<b>VIII. PUBLICACIONES .....</b>	<b>137</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.1.</b> Distribución del volumen de consumo (millones de kg) y gasto (millones de euros) del sector de salsas en España (Mercasa 2011). .....	4
<b>Tabla III.1.</b> Composición de los diferentes sistemas modelo analizados. ....	36
<b>Tabla III.2.</b> Composición de las salsas bechamel en función de la base proteica utilizada.....	38
<b>Tabla IV.1.</b> Ecuaciones de predicción para el factor de pérdidas ( $\epsilon''$ ) a 2.45 GHz y 20 °C o 40 °C. ....	66
<b>Tabla IV.2.</b> Ecuaciones de predicción para la profundidad de penetración ( $d$ ) a 2.45 GHz y 20 °C o 40 °C. ....	69
<b>Tabla IV.3.</b> Ecuaciones de predicción para el índice de consistencia ( $k$ ) a velocidades de cizalla comprendidas entre 0.01 y 100 s <sup>-1</sup> durante 600 s a 20 °C. ....	77
<b>Tabla IV.4.</b> Ecuaciones de predicción para el índice de flujo ( $n$ ) a velocidades de cizalla comprendidas entre 0.01 y 100 s <sup>-1</sup> durante 600 s a 20 °C.....	77
<b>Tabla IV.5.</b> Valores medios de $G'$ , $G''$ , y $\tan \delta$ a 1 Hz y 20°C para las diferentes salsas y tiempos de recalentamiento en MO.....	81
<b>Tabla IV.6.</b> Contenido en humedad (%) de las salsas a diferentes tiempos de recalentamiento. ....	82
<b>Tabla IV.7.</b> Valores medios del percentil 80 del <i>área</i> de los glóbulos de grasa ( $\mu\text{m}^2$ ) de las muestras recién preparadas y las descongeladas en microondas durante 480 s.....	87
<b>Tabla IV.8.</b> Medias de los parámetros fisicoquímicos analizados en las salsas elaboradas con leche desnatada en polvo (LDP). R: salsas recién elaboradas; HMO: salsas descongeladas en horno microondas; HCO: salsas descongeladas en horno convencional.....	92

**Tabla IV.9.** Medias de los parámetros fisicoquímicos analizados en las salsas elaboradas con aislado de proteína de soja (ASP). R: salsas recién elaboradas; HMO: salsas descongeladas en horno microondas; HCO: salsas descongeladas en horno convencional..... 92

**Tabla IV.10.** Sinéresis en función del tiempo de almacenamiento en congelación (-18 °C). ..... 100

**Tabla IV.11.** Valores medios del percentil 80 del *área* ( $\mu\text{m}^2$ ) y la *circularidad* de los glóbulos de grasa de las muestras recién preparadas y las descongeladas en microondas durante 480 s. .... 102

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura I.1.</b> Volumen y distribución del consumo de platos preparados y salsas en los últimos años en España (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente 2010). .....	3
<b>Figura I.2.</b> Estructura química de la amilosa (A) y amilopectina (B). .....	5
<b>Figura I.3.</b> Estructura química del $\kappa$ -carragenato (A), $\iota$ -carragenato (B) y $\lambda$ -carragenato (A). .....	7
<b>Figura I.4.</b> Esquema de un horno microondas. ....	9
<b>Figura I.5.</b> De la imagen analógica a la digital. ....	20
<b>Figura III.1.</b> Robot de cocina (Thermomix TM 31). .....	37
<b>Figura III.2.</b> Sistema de medición de propiedades dieléctricas HP 85070M. ....	40
<b>Figura III.3.</b> Reómetro RheoStress 1. ....	44
<b>Figura III.4.</b> Cryo-Trans CT1x500C de Oxford Instruments acoplado a un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 5410 (cryo-SEM). .....	46
<b>Figura III.5.</b> Microscopio confocal de barrido Nikon C1 acoplado a un microscopio Nikon Eclipse E800. ....	47
<b>Figura III.6.</b> A: micrografía CLSM de una muestra de salsa mostrando los canales RGB (rojo, verde y azul) combinados; B: separación del canal rojo; C: separación del canal verde; D: separación del canal azul. ....	48
<b>Figura III.7.</b> "Photobleaching" o decaimiento de la intensidad de señal en micrografías de salsas captadas mediante CLSM. A: micrografía tomada a tiempo = 0; B: mismo campo tras 5 s de barrido láser. Nótese como la intensidad del fluoróforo que marca los glóbulos de grasa (en verde) resulta fuertemente afectada. ....	49

<b>Figura III.8.</b> Cálculo del valor del píxel central al aplicar un filtro de la media y de la mediana sobre los 9 píxeles adyacentes (filtro 3x3). .....	49
<b>Figura III.9.</b> Aplicación de diversos filtros sobre el ruido de fondo de una imagen de CLSM. A: imagen original; B: filtro de la media 3x3; C: filtro de la mediana 3x3. ....	50
<b>Figura III.10.</b> Corrección de la iluminación mediante el complemento <i>posteriori shading correction</i> . A: imagen original. Nótese que el borde inferior derecho está más iluminado que el superior izquierdo; B: patrón de iluminación generado por el complemento. C: imagen corregida.....	51
<b>Figura III.11.</b> Micrografía obtenida por cryo-SEM y su correspondiente histograma de nivel de gris.....	51
<b>Figura III.12.</b> Efecto de diversas manipulaciones del histograma de nivel gris sobre el contraste de la imagen de CLSM. A: imagen original y su correspondiente histograma; B: imagen tras la normalización; C: imagen tras la ecualización; D: imagen tras la inversión.....	52
<b>Figura III.13.</b> Segmentación de una micrografía de cryo-SEM. A: imagen procesada y lista para la segmentación; B: histograma de grises de la imagen, nótese la distribución bimodal; C: segmentación de la imagen eligiendo el valor mínimo situado en el valle entre los dos picos de la distribución (nivel de gris = 129); D: imagen binarizada. Todos los píxeles que presentaban niveles de gris por debajo de 129 pasan a ser negros (valor 0), mientras que los píxeles que presentaban valores superiores a 129 pasan a ser blancos (valor 1). .....	53
<b>Figura III.14.</b> Diversos procedimientos de tratamiento de una imagen binaria. A: 3 dilataciones sucesivas; B: 3 erosiones sucesivas; C: apertura; D: cierre; E: combinación de apertura y “watershed” o <i>separador de objetos</i> . Nótese que con este último procedimiento se elimina el ruido de fondo y se consigue separar los objetos en dos pasos.....	55
<b>Figura III.15.</b> Proceso de análisis de una imagen de CLSM. A: imagen original. B: separación de canales y mejora de la imagen en escala de grises. C: imagen	

## Índice

binaria tras la segmentación y operaciones de mejora; D: imagen con los objetos numerados para su identificación en la tabla de datos; E: tabla de datos generada.

..... 57

**Figura III.16.** Diferentes visualizaciones en 3D de la microestructura de una salsa preparada con almidón nativo. A: Ángulo de rotación de 135° con respecto al eje x y 45° con respecto al eje z. B: misma muestra vista desde un ángulo de 110° con respecto al eje x y 45° con respecto al eje z, visualización de un corte transversal. C: mismo ángulo que en A con visualización de un corte transversal.

..... 58

**Figura IV.1.** Gráficos de superficie de respuesta de la variable factor de pérdidas ( $\epsilon''$ ) en relación con la cantidad de sal e hidrocoloide. A y F: sistema con AN; B y G: sistema con AHAF; C y H: sistema con  $\iota$ -C; D e I: sistema con  $\lambda$ -C; E y J: sistema con  $\kappa$ -C. AN: almidón nativo; AHAF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento;  $\iota$ -C:  $\iota$ -carragenato;  $\lambda$ -C:  $\lambda$ -carragenato;  $\kappa$ -C:  $\kappa$ -carragenato. Las medidas se realizaron a 20 °C (A, B, C, D, E) y a 40 °C (F, G, H, I, J). .....

65

**Figura IV.2.** Gráficos de superficie de respuesta de la variable profundidad de penetración ( $d$ ) en relación con la cantidad de sal e hidrocoloide. A y F: sistema con AN; B y G: sistema con AHAF; C y H: sistema con  $\iota$ -C; D e I: sistema con  $\lambda$ -C; E y J: sistema con  $\kappa$ -C. AN: almidón nativo; AHAF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento;  $\iota$ -C:  $\iota$ -carragenato;  $\lambda$ -C:  $\lambda$ -carragenato;  $\kappa$ -C:  $\kappa$ -carragenato. Las medidas se realizaron a 20 °C (A, B, C, D, E) y a 40 °C (F, G, H, I, J). .....

68

**Figura IV.3.** Micrografías de cryo-SEM. A, B y C: sistema elaborado con 4 g de sal y 1 (A), 3.5 (B) y 6 (C) g de almidón nativo (AN). D, E y F: sistema elaborado con 4 g de sal y 1 (D), 3.5 (E) y 6 (F) g de fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento (AHAF). Escala: 30  $\mu$ m.....

70

**Figura IV.4.** Área media e intervalos LSD para las muestras con almidón nativo (AN) y almidón modificado (AHAF). .....

71



**Figura IV.5.** Micrografías de cryo-SEM. A, B y C: sistema elaborado con 4 g de sal y 0.3 (A), 0.55 (B) y 0.8 (C) g de  $\iota$ -carragenato ( $\iota$ -C); D, E y F: sistema elaborado con 4 g de sal y 0.8 (D), 1.2 (E) y 1.6 (F) g de  $\lambda$ -carragenato ( $\lambda$ -C); G, H e I: sistema elaborado con 4 g de sal y 0.3 (G), 0.55 (H) y 0.8 (I) g de  $\kappa$ -carragenato ( $\kappa$ -C). Escala: 30  $\mu$ m. .... 72

**Figura IV.6.** Gráficos de superficie de respuesta de la variable índice de consistencia ( $k$ ) en relación con la cantidad de sal e hidrocoloide. A: sistema con AN; B: sistema con AHAF; C: sistema con  $\iota$ -C; D: sistema con  $\lambda$ -C; AN: almidón nativo; AHAF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento;  $\iota$ -C:  $\iota$ -carragenato;  $\lambda$ -C:  $\lambda$ -carragenato. .... 73

**Figura IV.7.** Gráficos de superficie de respuesta de la variable índice de flujo ( $n$ ) en relación con la cantidad de sal e hidrocoloide. A: sistema con AN; B: sistema con AHAF; C: sistema con  $\iota$ -C; D: sistema con  $\lambda$ -C; AN: almidón nativo; AHAF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento;  $\iota$ -C:  $\iota$ -carragenato;  $\lambda$ -C:  $\lambda$ -carragenato. .... 75

**Figura IV.8.** Espectro mecánico de las salsas elaboradas con diferentes almidones de maíz. A: muestras recién elaboradas. B: muestras tras 120 s de recalentamiento en microondas. AN: almidón nativo; ANC: almidón nativo céreo; AAA: adipato de dialmidón acetilado entrecruzado; AHF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado entrecruzado, AHAF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento. .... 79

**Figura IV.9.** Perfiles tiempo-temperatura de salsas elaboradas con diferentes almidones de maíz (3.5% p/p) sometidas a calentamiento en microondas. AN: almidón nativo; ANC: almidón nativo céreo; AAA: adipato de dialmidón acetilado entrecruzado; AHF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado entrecruzado, AHAF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento. .... 83

**Figura IV.10.** Microscopía láser confocal (CLSM) de las salsas elaboradas con diferentes almidones de maíz después de diferentes tiempos de calentamiento. En columnas, las salsas con diferentes almidones: AN: almidón nativo; ANC: almidón

## Índice

nativo céreo; AAA: adipato de dialmidón acetilado entrecruzado; AHF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado entrecruzado, AHAF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento. En filas, diferentes tiempos de calentamiento (en segundos). R: recién elaborada; g: glóbulo de grasa; a: gránulo de almidón. Escala: 50  $\mu\text{m}$ . ..... 85

**Figura IV.11.** Reconstrucciones en 3D de salsas elaboradas con diferentes almidones de maíz. A y B: almidón nativo (AN); C y D: almidón nativo céreo (ANC); E y F: adipato de dialmidón acetilado entrecruzado (AAA); G y H: fosfato de dialmidón hidroxipropilado entrecruzado (AHF); I y J: fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento (AHAF). A, C, E, G, I: muestras recién elaboradas; B, D, F, H, J: muestras recalentadas en microondas durante 300 s. g: glóbulo de grasa; a: gránulo de almidón. Dimensiones de cada reconstrucción: 100X100X20  $\mu\text{m}$ . ..... 89

**Figura IV.12.** Perfil tiempo-temperatura de salsas elaboradas con leche desnatada en polvo (LDP) y aislado de proteína de soja (APS). A: descongelación en horno convencional. B: descongelación en horno microondas. .... 93

**Figura IV.13.** Perfiles electroforéticos (SDS-PAGE) de salsas preparadas con leche desnatada en polvo (A y B) y aislado de proteína de soja (C y D). A y C, electroforesis en condiciones reductoras. B y D; electroforesis en condiciones no reductoras. R: salsas recién elaboradas; HMO: salsas descongeladas en horno microondas; HCO: salsas descongeladas en horno convencional. P: patrón de pesos moleculares.  $\alpha_s$ -CN:  $\alpha_s$ -caseína;  $\beta$ -CN:  $\beta$ -caseína;  $\kappa$ -CN:  $\kappa$ -caseína;  $\alpha$ -La:  $\alpha$ -Lactoalbúmina;  $\beta$ -Lg:  $\beta$ -lactoglobulina.  $\beta$ -CG:  $\beta$ -conglucina; G: glicina;  $\alpha'$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ : subunidades de la  $\beta$ -CG; A, B: cadenas polipeptídicas de la glicina. CO: congregado. .... 94

**Figura IV.14.** Perfiles electroforéticos (SDS-PAGE) de las materias primas empleadas como fuente de proteínas en las salsas: leche desnatada en polvo (LDP) y aislado de proteína de soja (APS). Electroforesis en condiciones reductoras (LDP+, APS+) y no reductoras (LDP, APS). P: patrón de pesos moleculares.  $\alpha_s$ -CN:  $\alpha_s$ -caseína;  $\beta$ -CN:  $\beta$ -caseína;  $\kappa$ -CN:  $\kappa$ -caseína;  $\alpha$ -La:  $\alpha$ -

Lactoalbúmina;  $\beta$ -Lg:  $\beta$ -lactoglobulina.  $\beta$ -CG:  $\beta$ -conglucina; G: glicina;  $\alpha'$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ : subunidades de la  $\beta$ -CG; A, B: cadenas polipeptídicas de la glicina. CO: congregado..... 97

**Figura IV.15.** Microscopía láser confocal (CLSM) de salsas elaboradas con leche desnatada en polvo (A, B y C) o aislado de proteína de soja (D, E y F). Salsas recién elaboradas (A y D), descongeladas en horno microondas (B y E) o en horno convencional (C y F). a: almidón; g: grasa. Escala: 50  $\mu$ m..... 101

**Figura IV.16.** Microscopía láser confocal (CLSM). Muestras recién elaboradas preparadas con aceite de girasol, oliva, soja y mantequilla a velocidades de 350, 1100 y 3250 rpm. Escala: 50  $\mu$ m..... 104

**Figura IV.17.** Gráficos de medias y de interacciones con intervalos LSD. A y B: medias para la variable respuesta *área* en función de la velocidad de agitación y tipo de grasa, respectivamente; C y D: interacción entre velocidad de agitación y tipo de grasa para las variables respuesta densidad de glóbulos de grasa por campo (*dg*) y *circularidad*, respectivamente..... 105

**Figura IV.18.** Gráficos de interacciones con intervalos LSD. A, B y C: interacción entre velocidad de agitación y tipo de grasa para las variables respuesta constante dieléctrica ( $\epsilon'$ ), factor de pérdidas ( $\epsilon''$ ) y profundidad de penetración (*d*), respectivamente..... 108

**Figura IV.19.** Microscopía láser confocal (CLSM). Muestras descongeladas en horno convencional (HCO) y horno microondas (HMO) elaboradas con aceite de girasol, oliva, soja y mantequilla a velocidades de 350, 1100 y 3250 rpm. Escala: 50  $\mu$ m..... 111

**Figura IV.20.** Gráficos de interacciones y de medias con intervalos LSD. A, C y E: interacción entre velocidad de agitación y tipo de grasa para las variables respuesta *área*, densidad de glóbulos de grasa (*dg*) y *circularidad*, respectivamente. B, D y F: medias según tratamiento de descongelación para las variables respuesta *área*, densidad de glóbulos de grasa (*dg*) y *circularidad*, respectivamente. .... 112

*Índice*

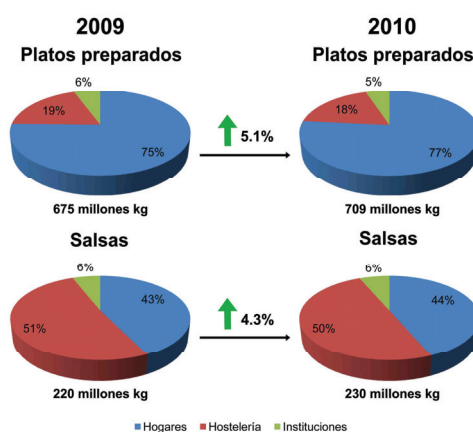
**Figura IV.21.** Gráficos de interacciones con intervalos LSD. A: interacción entre velocidad de agitación y tipo de grasa para la variable respuesta dif\_área. B: interacción entre velocidad de agitación y tratamiento de descongelación para la variable respuesta dif\_área. C: interacción entre velocidad de agitación y tipo de grasa para la variable respuesta dif\_dg. .... 115

# **I. INTRODUCCIÓN**



## I.1. CONSUMO DE PLATOS PREPARADOS Y SALSAS

El actual ritmo de vida, así como la disminución en el número de miembros de la unidad familiar son algunos de los motivos que han propiciado el auge del sector de los platos preparados. Pese a representar tan sólo el 1.7% del volumen total de alimentos consumido en España en el año 2009, la tendencia al alza en el consumo de este tipo de productos en el año 2010 —con un aumento del 5.1%— destaca la fortaleza del sector a pesar de la vigente crisis económica. Además, el consumo de salsas —que *per se* forman parte de muchos de estos platos preparados— también ha experimentado un aumento del 4.3% entre el año 2009 y 2010 (figura I.1).



**Figura I.1.** Volumen y distribución del consumo de platos preparados y salsas en los últimos años en España (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente 2010).

La tabla I.1 muestra el estado del sector de las salsas en España en el año 2010. Dentro de las salsas que se comercializan a temperatura ambiente, el tomate frito es la principal oferta, ya que representa el 60.6% de todo ese mercado en volumen y el 37.7% en valor. A continuación aparecen la mayonesa, con porcentajes respectivos del 21.2% y del 28.2%, el ketchup (8.6% y 9.8%), las salsas frías (6% y 15.3%) y la mostaza (1.1% y 2.2%). Todas las otras ofertas representan los restantes 2.5% en volumen y 6.8% en valor. Entre las salsas frías, que constituyen uno de los segmentos más dinámicos, las más vendidas son las

## Introducción

de alioli/ajo (26.2% del total en volumen), barbacoas (19.1%), mexicanas (14.6%), picantes/curry (13.8%) y agridulces (3.9%).

**Tabla I.1.** Distribución del volumen de consumo (millones de kg) y gasto (millones de euros) del sector de salsas en España (Mercasa 2011).

	Hogares		Restauración comercial		Restauración colectiva y social		Total	
	Consumo	Gasto	Consumo	Gasto	Consumo	Gasto	Consumo	Gasto
<b>Todas las salsas</b>	<b>99.99</b>	<b>337.61</b>	<b>114.58</b>	<b>297.94</b>	<b>14.90</b>	<b>25.92</b>	<b>229.47</b>	<b>661.47</b>
Ketchup	21.60	51.65	24.55	48.89	1.80	3.71	47.95	104.25
Mayonesa	50.69	143.94	23.84	46.45	2.33	4.84	76.89	195.23
Resto de salsas	27.70	142.02	66.16	202.60	10.77	17.37	104.63	361.99

Por lo que hace referencia a las salsas para cocinar, las más populares son las boloñesas (29.3% del total en volumen), seguidas por las italianas (20.2%) y las napolitanas (14.7%). Un segmento todavía pequeño, pero que muestra un importante dinamismo es el de las salsas refrigeradas, con 3500 toneladas comercializadas por un valor de 23.5 millones de euros (Mercasa, 2011). En este sentido, el desarrollo de salsas tipo bechamel comercializadas en frío podría encontrar un hueco en este sector.

## I.2. LA SALSA BLANCA. COMPOSICIÓN

La salsa bechamel o salsa blanca es una salsa compuesta tradicionalmente por leche, harina de trigo, mantequilla y especias (Heyman et al. 2010). Es parte esencial de algunas recetas, como las croquetas y se emplea en numerosos platos, como en la lasaña, aportando textura y sabor. Se trata de una emulsión de grasa en agua que contiene hidratos de carbono complejos (aportados en la harina) y proteínas (leche).



Las salsas blancas comerciales varían la composición tradicional utilizando diferentes ingredientes con el objetivo de facilitar la elaboración de la misma durante el procesado industrial y mejorar su estabilidad a lo largo de los procesos de congelación o refrigeración a las que son sometidas durante su vida útil.

### I.2.1. HIDRATOS DE CARBONO

La base de hidratos de carbono de la salsa tradicionalmente es la harina. Para conseguir los fines tecnológicos necesarios se puede sustituir la harina o se complementa ésta con el uso de almidones y otros hidrocoloides (como el carragenato) debido a su capacidad para ajustar la textura y el cuerpo en este tipo de productos (Sikora et al. 2008).

El almidón es el polisacárido de reserva de cereales, tubérculos y algunas frutas, encontrándose en las células del endospermo formando complejas estructuras denominadas gránulos. Las principales fuentes de almidón de uso alimentario son el maíz, el trigo, el arroz y la patata. Químicamente está formado por dos polímeros: amilosa y amilopectina (figura I.2). Ambos consisten en cadenas de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), no obstante, mientras la amilosa es esencialmente lineal la amilopectina se ramifica mediante enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) cada 20-25 monómeros de glucosa (Parker y Ring 2001).

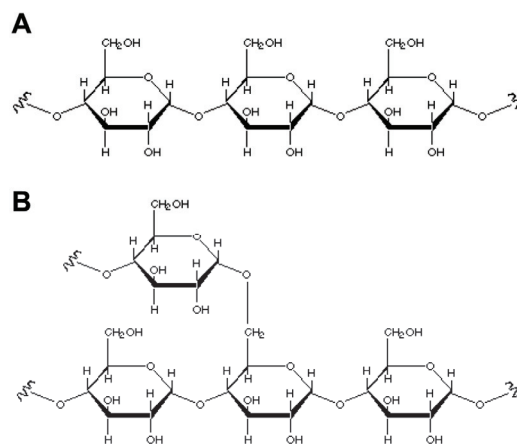


Figura I.2. Estructura química de la amilosa (A) y amilopectina (B).

## *Introducción*

Los gránulos de almidón al calentarse en presencia de agua rompen su estructura cristalina y comienzan a hincharse en un proceso denominado gelatinización. Cuando el agua penetra en los gránulos los polímeros de almidón se disuelven en el medio, el aumento de volumen de los gránulos es el responsable del aumento de viscosidad que imparten en el medio. Finalmente, cuando la mezcla se enfría, los polímeros disueltos (principalmente la amilosa) pueden agruparse de nuevo formando estructuras cristalinas en el proceso denominado retrogradación (Parker y Ring 2001). En los procesos de congelación-descongelación la retrogradación produce separación del agua (sinéresis) y cambios de textura que pueden deteriorar la calidad de los productos que contengan almidón (Rahman 1999).

La industria ha desarrollado procesos para modificar los almidones y conseguir ventajas tecnológicas que no poseen los almidones nativos. En este sentido, el desarrollo de los almidones céreos (sin amilosa) limita la retrogradación. Por otro lado, la introducción de modificaciones químicas permite mejorar la utilidad de los almidones tanto en el procesado como en el almacenamiento. Dos ejemplos de modificaciones son el entrecruzamiento y la sustitución.

El entrecruzamiento consiste en la introducción de reactivos bifuncionales (utilizando agentes como el trimetafosfato de sodio para obtener fosfato de almidón o el anhídrido adípico para obtener adipato de almidón) que refuerzan la estructura del gránulo mediante la unión de grupos hidroxilo de polímeros adyacentes mediante enlaces covalentes. Este tipo de modificación permite aumentar la resistencia del gránulo a condiciones extremas de acidez, agitación y calor, además de mejorar el comportamiento frente a los procesos de congelación-descongelación. La sustitución, por su parte, consiste en la adición de sustituyentes (utilizando reactivos como el anhídrido acético para obtener almidón acetilado o el óxido de propileno para obtener almidón hidroxipropilado) a los grupos hidroxilos del almidón. Éstos interrumpen estéricamente la asociación de cadenas de polímeros de almidón limitando la retrogradación (Mason 2009).

Los carragenatos son polisacáridos sulfatados que provienen de la pared celular de las algas marinas rojas —Chondrus, Solieriaceae, Gigartinaceae,

Phyllophoraceae, Hypnaceae, y Rhodophyllidaceae (Badui 2006)—. Su estructura química consiste en unidades de D-galactosa unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$ - (1→3) y  $\beta$ -(1→4) alternos. Los distintos tipos de carragenato se diferencian por la concentración de azúcares anhidros (3,6-anhidro-D-galactosa) que contengan, y por la posición en que se encuentren los grupos sulfato, así como por la cantidad de éstos últimos en la molécula de D-galactosa. La configuración química les aporta diferentes funcionalidades. Por un lado están los carragenatos  $\kappa$  e  $\iota$  (figura 1.3 A y B) que son capaces de formar geles. Los de  $\iota$ -carragenato son elásticos y no producen sinéresis, mientras que los  $\kappa$ -carragenato son capaces de formar geles fuertes y quebradizos. Por otro lado se encuentra el  $\lambda$ -carragenato con propiedades espesantes pero sin capacidad de formar geles debido a la repulsión electrostática generada entre sus cadenas poliméricas debido a sus tres grupos sulfato (figura 1.3 C).

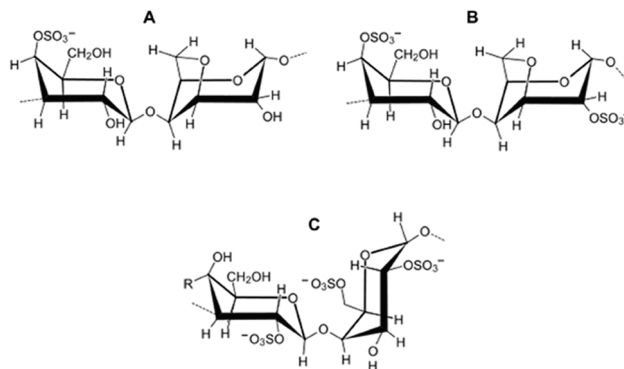


Figura 1.3. Estructura química del  $\kappa$ -carragenato (A),  $\iota$ -carragenato (B) y  $\lambda$ -carragenato (A).

## 1.2.2. PROTEÍNAS

La base proteica de la salsa blanca la confiere la leche de vaca. Las caseínas y proteínas del lactosuero desempeñan un papel clave en las emulsiones, estabilizando los glóbulos de grasa y aportando cuerpo. No obstante, los consumidores demandan productos innovadores que sean saludables y mantengan un nivel organoléptico adecuado. En este sentido, los productos de soja han surgido como una buena alternativa a los productos lácteos al

### *Introducción*

considerarse una buena fuente vegetal de aminoácidos esenciales a bajo precio (Lim y Narsimhan 2006; van Vliet et al. 2002). Además, existe un grupo de población que reclama productos cuyo origen sea exclusivamente vegetal, por lo que el uso de proteína de soja en la elaboración de salsas blancas puede resultar interesante.

### **I.2.3. GRASAS**

En la actualidad, el interés creciente de los consumidores por seguir una alimentación sana ha promovido el desarrollo de productos de bajo contenido graso y perfil lipídico más cardiosaludable. En este contexto, la utilización de leche desnatada y la sustitución de la mantequilla por aceites vegetales (oliva, girasol, y soja) con elevado contenido de ácidos grasos insaturados (AGI) y sin colesterol es necesaria para alcanzar las expectativas de los nuevos consumidores.

## **I.3. CALENTAMIENTO EN MICROONDAS**

### **I.3.1. LAS MICROONDAS**

Las microondas (MO) pertenecen a la zona del espectro electromagnético con una longitud de onda entre 1 mm y 1 m que se corresponde con frecuencias comprendidas entre los 300 MHz y los 300 GHz. Dentro de este intervalo están las frecuencias usadas para telefonía móvil, radar y televisión vía satélite. Para calentamiento en microondas, las dos frecuencias más comúnmente utilizadas son 0.915 y 2.45 GHz (Thostenson y Chou 1999).

### **I.3.2. EL HORNO MICROONDAS**

El aumento de los alimentos preparados ha fomentado el uso del horno microondas (HMO) que se ha convertido en un elemento indispensable en cada hogar. Es un electrodoméstico que permite cocinar, descongelar o recalentar la comida de una manera rápida con respecto a otros como el horno convencional (HCO). Su funcionamiento es simple: la fuente de energía alimenta de energía eléctrica al magnetrón. En él, esta energía es transformada en un campo

electromagnético alterno. La guía de ondas dirige las MO generadas en el magnetrón hacia el agitador de ondas que finalmente las distribuye por la cavidad de cocinado donde finalmente se produce la interacción entre las MO y el alimento (Figura I.4).

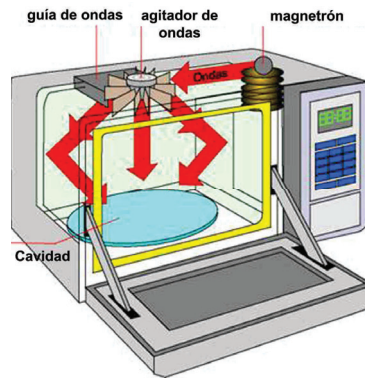


Figura I.4. Esquema de un horno microondas.

### I.3.3. CALENTAMIENTO EN MICROONDAS

La interacción de las microondas con los materiales se rige por el siguiente mecanismo. Cuando las MO inciden en un material, parte de esta energía es transmitida, parte reflejada y parte absorbida en el material donde se disipa en forma de calor. El calentamiento se produce debido a la fricción molecular de los dipolos permanentes dentro del material cuando intentan reorientarse por sí mismos debido a la radiación electromagnética de las MO (Meda et al. 2005).

El comportamiento de los materiales frente a las MO depende principalmente de las propiedades dieléctricas de los mismos —constante dieléctrica ( $\epsilon'$ ) y factor de pérdidas ( $\epsilon''$ )—. La  $\epsilon'$  da una medida de la capacidad que tiene un material para almacenar energía magnética o eléctrica y polarizarla cuando es sometido a un campo eléctrico (Datta 2001). El parámetro  $\epsilon''$  está relacionado con la capacidad de un material para disipar la energía en forma de calor. A partir de estas propiedades se puede cuantificar la profundidad de penetración ( $d$ ) que indica la profundidad a la cual la radiación de MO penetra en el material antes de reducirse a  $1/e$  de la intensidad de campo eléctrico en la superficie del mismo (Miller et al.,

### *Introducción*

1991). Según Meda et al. (2005), el calentamiento por MO se ve favorecido en materiales gruesos (considerando que  $d$  es mucho mayor al grosor del material), con un valor elevado de  $\epsilon''$ , conductividades térmicas bajas y donde se generen gradientes de temperatura mínimos.

En el calentamiento convencional (CO), la energía es transferida al material a través de convección, conducción y radiación de calor desde las superficies del material. Por el contrario, la energía de MO se transfiere directamente en el material a través de la interacción con el campo electromagnético. En la transferencia de calor, la energía se transporta debido a gradientes de temperatura, pero en el calentamiento en MO lo que se produce es una transformación de energía electromagnética en térmica más que una transferencia de calor. Puesto que las microondas pueden penetrar los materiales y depositar su energía en el interior el calor se genera a través del volumen del material. La transferencia de energía no depende de la difusión de calor desde la superficie por lo que es posible alcanzar un calentamiento rápido y uniforme en materiales con cierto espesor (Thostenson y Chou 1999).

El calentamiento por MO en los alimentos se produce porque la frecuencia de las MO es similar a la frecuencia de resonancia de las moléculas de agua, por tanto su energía es fácilmente absorbida por las moléculas de agua en el alimento. La oscilación de las moléculas genera una fricción mecánica que resulta en la generación de calor (Decareau 1985). Las propiedades dieléctricas varían dependiendo de diversos factores. En materiales higroscópicos como los alimentos, la cantidad de agua es generalmente el factor dominante, pero la frecuencia, temperatura, densidad y estructura del alimento son también cruciales.

Con respecto a la composición química el factor más importante es la presencia de iones móviles y los momentos dipolares asociados con el agua y otras moléculas. La presencia de hidrocoloides afecta a la distribución del agua en el alimento pudiendo afectar al calentamiento por MO (Miller et al. 1991). Las proteínas hidratadas, los hidrolizados o los polipéptidos son activos frente a las MO, dependiendo de su carga neta a determinado valor de pH y su distribución de cargas superficiales, mientras que los aminoácidos libres son muy activos. Es de

importancia su naturaleza coloidal y la posibilidad de redistribuir el agua presente (Shukla 1998). En cuanto a la influencia de los ingredientes de tipo lipídico en el calentamiento con MO, (Zhang y Datta 2001) observaron que a volúmenes pequeños, el agua absorbe mucha más potencia en microondas que las materias grasas como el aceite, aunque a volúmenes mayores, esta diferencia se acorta; sin embargo, cabe resaltar que la temperatura del aceite puede aumentar más rápidamente que la del agua debido a sus bajos valores de densidad y calor específico.

No obstante, es muy difícil predecir el comportamiento de un alimento frente a las MO basándose en su composición (Calay et al. 1995; Sun et al. 1995). Hay que considerar que cada tipo de alimento posee un único y complejo patrón de calentamiento (Hegenbart 1992). Como resultado, la tendencia actual ya no es adaptar las formulaciones existentes sino diseñar específicamente alimentos adecuados para el calentamiento en MO (Meda et al. 2005).

#### **I.4. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES DIELECTRICAS EN SISTEMAS CON HIDROCOLOIDES**

La influencia del contenido en agua sobre las propiedades dieléctricas de los alimentos depende en gran medida de la manera en la que se encuentra (libre o ligada) o de la restricción de su movilidad impuesta por otros componentes. Los hidrocoloides polisacarídicos se emplean en la formulación de las salsas especialmente para aportar viscosidad. Sus propiedades se basan en su gran avidez por las moléculas de agua que pueden llegar a afectar las propiedades dieléctricas de un alimento porque son capaces de cambiar sus propiedades de hidratación (Miller et al. 1991)

Los principales estudios que analizan las propiedades dieléctricas en sistemas con hidrocoloides se centran en el estudio de almidones. Ryyänen et al. (1996) determinaron las propiedades dieléctricas de disoluciones de almidones nativos con concentraciones del 5 al 30% en el intervalo de temperaturas de 3 °C a 95 °C a una frecuencia de 2.75 GHz. Constataron que la  $\epsilon'$  y el  $\epsilon''$  decrecían con el

### *Introducción*

aumento en la temperatura y la concentración de almidón. Por otro lado, Ndife et al. (1998) estudiaron las propiedades dieléctricas a una frecuencia de 2.45 GHz para diferentes almidones en forma granular y en disolución a temperaturas comprendidas entre 30 y 95 °C, concluyendo que las propiedades dieléctricas dependían de la temperatura, contenido en humedad y tipo de almidón. Bircan y Barringer (1998) demostraron en disoluciones de almidón hidroxipropilado (a concentraciones del 0 al 25% p/p) y sal (3% p/p), la existencia de interacciones entre ambos que afectaban a las propiedades dieléctricas y la viscosidad y observaron una disminución en la  $\epsilon'$  y un aumento en el  $\epsilon''$  debido a la adición de sal. Por otro lado, las propiedades dieléctricas de disoluciones de almidón de maíz (1 a 4% p/p), en el intervalo de temperaturas de 20 a 80 °C a frecuencias de 10, 20 y 30 MHz fueron determinadas por Piyasena et al. (2003). Estos autores estudiaron el efecto de la adición de sal (0.2 y 0.5% p/p) en relación a los cambios producidos en la  $\epsilon'$ ,  $\epsilon''$  y  $d$ . El  $\epsilon''$  aumentó conforme lo hacía la temperatura y el contenido en sal; la  $d$  de las muestras con sal fue menor que la de las muestras sin sal. Además, atribuyeron el efecto que ejercían la temperatura, frecuencia, concentración de almidón y contenido en sal sobre las propiedades dieléctricas de las disoluciones de almidón a la compleja interacción entre conductividad, densidad, contenido en humedad y propiedades reológicas del almidón. Motwani et al. (2007) estudiaron las propiedades dieléctricas de disoluciones de almidón de maíz con concentraciones entre el 10 y el 50% (p/p), en un intervalo de temperaturas de 40 a 90 °C y un intervalo de frecuencias de 15 MHz a 3 GHz. La  $\epsilon'$  decreció, mientras que el  $\epsilon''$  aumentó con la concentración de almidón.

Sin embargo, existe muy poca información sobre el comportamiento de sistemas donde se utilicen carragenatos en relación con su capacidad para deprimir la movilidad del agua libre y sus consecuencias sobre el comportamiento dieléctrico de los mismos. Prakash et al. (1992) estudiaron las propiedades dieléctricas de cinco hidrocoloides en polvo (entre ellos el carragenato) a distintos contenidos de humedad y determinaron que tanto la  $\epsilon'$  como el  $\epsilon''$  disminuían con el aumento de carga de los hidrocoloides. Keskin et al. (2007) estudiaron el efecto de diferentes hidrocoloides sobre las propiedades dieléctricas y la calidad de



panes cocinados en un horno que combina infrarrojos y microondas indicando que la presencia de carragenato disminuía ambas propiedades dieléctricas.

## **I.5. CAMBIOS QUÍMICOS EN SISTEMAS ALIMENTARIOS TRATADOS POR MICROONDAS**

La diferencia en el patrón de calentamiento en HMO con respecto al calentamiento en HCO ha conllevado una amplia bibliografía donde se analiza la influencia del calentamiento sobre diversos alimentos. Alajaji y El-Adawy (2006) estudiaron el efecto del cocinado en MO sobre la composición nutricional de garbanzos comparándolo con otros tipos de cocinado convencionales (hervido y autoclavado). Mandala (2005) y Mandala y Sotirakoglou (2005) analizaron el efecto de la congelación y descongelación en MO sobre la calidad del pan con hidrocoloides adicionados. Valero et al (2000) analizaron los cambios químicos en leches pasteurizadas a 80 y 92 °C durante 15 s en MO o en intercambiador de calor convencional sin encontrar diferencias significativas entre ambos tratamientos.

En la literatura, no existen trabajos dedicados al análisis químico del efecto del calentamiento sobre la fracción proteica de mezclas complejas con hidrocoloides que contengan proteína láctea o de soja. No obstante, la leche ha sido objeto de numerosos estudios que investigan los cambios ocasionados en las proteínas lácteas —principalmente desnaturalización de proteínas séricas y agregación con caseínas— tras el calentamiento CO (Corredig y Dalgleish 1996; Jang y Swaisgood 1990; Jovanovic et al. 2005; Jovanovic et al. 2007; Parris et al. 1990; Singh 1994). Sin embargo, el estudio del efecto del calentamiento por MO sobre este tipo de cambios en las proteínas es más escaso. Sieber et al. (1996) realizaron una extensa revisión sobre trabajos que investigaban el efecto del calentamiento de la leche por MO. En ella aparecen diversos autores que declaraban no encontrar diferencias en la proteína tratada por MO y sin tratar, sin embargo otros afirmaban una disminución en el contenido de proteína del lactosuero. En esta revisión, también se especulaba sobre la formación de compuestos tóxicos derivados de las proteínas tras el calentamiento por MO, concluyéndose que la energía asociada a

## *Introducción*

las MO en condiciones domésticas es más baja de la necesaria para crear tales compuestos. Por otro lado, Villamiel et al (1996) sí detectaron un aumento en la velocidad de algunas reacciones de deterioro (entre ellas la desnaturalización de proteínas del lactosuero) en la leche y lo atribuyeron a un calentamiento no homogéneo al emplear el HMO.

En cuanto a las grasas, existen numerosos estudios que comparan el calentamiento CO con el de MO (Albi et al. 1997) o investigan directamente el efecto del calentamiento en microondas (Cerretani et al. 2009; Hassanein et al. 2003; Malheiro et al. 2009). Albi et al. (1997) estudiaron el efecto del calentamiento CO en parámetros químicos de grasas comestibles (oliva, girasol y manteca de cerdo) encontrando una mayor formación de compuestos de oxidación cuando las muestras eran tratadas por MO. Malheiro et al. (2009) afirmaron que el calentamiento por MO producía pérdidas en la calidad de los aceites analizados, siendo el tiempo de tratamiento el factor determinante en el deterioro. Hassannein et al (2003) indicaron que el grado de oxidación de los aceites depende del contenido en ácidos grasos poliinsaturados y comprobaron que los parámetros de deterioro (índice de peróxidos, acidez libre y disminución del contenido en tocoferol) eran función del tiempo de calentamiento. Por su parte, Cerretani et al. (2009) analizaron la estabilidad de diferentes aceites de oliva observando alteraciones oxidativas durante el calentamiento en MO. Además, observaron que la lipólisis era significativa únicamente a tiempos de tratamiento prolongados.

En cuanto al efecto del calentamiento por MO sobre cambios físico-químicos en los hidratos de carbono de alimentos elaborados con almidones y otros hidrocoloides, los principales estudios se centran en el proceso de gelatinización de sistemas modelo de almidón en agua sometidos al calentamiento CO y por MO (Bilbao-Sáinz et al. 2007; Palav y Seetharaman 2006, 2007). En un estudio reciente, Cocci et al. (2008) evaluaron el efecto del cocinado mediante microondas en espagueti analizando el grado de gelatinización del almidón. No obstante, existe escasa información acerca del efecto de las MO sobre los polímeros de almidón. En este sentido, Rasheed Khan et al. (1979) observaron un aumento en el contenido en azúcares reductores debido a la degradación de la amilosa y amilopectina bajo la acción de las MO sobre suspensiones de almidón.

En definitiva, los estudios sobre los posibles cambios químicos provocados por el calentamiento en MO se centran en analizar alimentos sencillos o ingredientes aislados en sistemas modelo simples. Falta información sobre los posibles cambios químicos en los distintos compuestos cuando forman parte de sistemas alimenticios más complejos como es el caso de salsas.

## **I.6. REOLOGÍA. APLICACIONES EN EL ESTUDIO DE SISTEMAS ALIMENTARIOS.**

La reología es la ciencia que estudia la manera en la que los materiales se deforman frente a un esfuerzo aplicado sobre ellos. Esta ciencia es de interés especial en relación con la tecnología de alimentos. Por un lado, el conocimiento del comportamiento reológico es esencial para optimizar las condiciones de elaboración, procesado y almacenamiento. Por otro lado, desde un punto de vista nutricional y organoléptico, cuando un alimento es introducido en la boca se somete a una serie de fuerzas que transforman su estructura inicial para hacerla más adecuada al proceso de ingestión y digestión posterior y que influye en la aceptabilidad del mismo por parte del consumidor. A la hora de diseñar nuevos productos donde se utilizan ingredientes espesantes y gelificantes, el conocimiento de la reología es crítico para optimizar los esfuerzos de producción, la metodología de procesado y la calidad del producto final (Steffee 1996).

### **I.6.1. ENSAYOS REOLÓGICOS**

Existen diversas técnicas reológicas en función de la información que se desea obtener y el tipo de alimento objeto de estudio. La información obtenida mediante ensayos de flujo puede ser útil para el diseño de procesos, mientras que el uso de ensayos de cizalla oscilatorios es adecuado para la caracterización de fluidos viscoelásticos (Dolz et al. 2006).

Los ensayos de flujo permiten analizar la resistencia al flujo que presenta un alimento, es decir analizar el comportamiento viscoso del mismo. Para ello se somete al alimento a velocidades de cizalla crecientes y se determina el esfuerzo correspondiente. En los fluidos newtonianos la relación entre ambos parámetros

### *Introducción*

es constante y se denomina viscosidad. Sin embargo, la mayoría de alimentos se caracterizan por tener un comportamiento no newtoniano y su viscosidad varía en función del esfuerzo o la velocidad de cizalla. Para caracterizar esta dependencia se realizan las curvas de flujo que nos permiten conocer la viscosidad aparente y aplicar modelos matemáticos para conocer sus propiedades viscosas.

Por otro lado, los ensayos oscilatorios constituyen una de las herramientas fundamentales y de creciente uso para la caracterización de las propiedades viscoelásticas de los alimentos. Esta técnica no destructiva posibilita la medida sin provocar un daño estructural a la muestra, lo que permite relacionar los parámetros reológicos obtenidos con la estructura molecular en un estado de equilibrio próximo a una situación de reposo (Gunasekaran y Ak 2000) y por tanto, relacionar el comportamiento reológico con la microestructura del alimento.

### **I.6.2. ESTUDIOS REOLÓGICOS EN SISTEMAS ALIMENTARIOS CON HIDROCOLOIDES**

En la literatura existen numerosos ejemplos de estudios de las propiedades reológicas de alimentos con hidrocoloides en su formulación. El comportamiento reológico de diferentes mezclas con proteínas de soja y almidones fueron investigadas por Lim y Narsimhan (2006) con el objetivo de desarrollar pudines basados en proteína de soja. La influencia del almidón y el  $\kappa$ -carragenato sobre las propiedades reológicas de postres lácteos fue analizada por González-Tomás et al. (2008). Lai et al. (1999), investigaron las propiedades reológicas de sistemas con 1 o 2% de agarosa,  $\kappa$ - e  $\iota$ -carragenato en presencia de almidón en concentraciones desde 0 al 2%, con el objetivo de comprender los cambios en estas propiedades con el grado de gelatinización, concentración, hinchamiento y solubilidad de los gránulos de almidón. Concluyeron que la interferencia de los polímeros de almidón disueltos, el efecto de exclusión provocado por los gránulos de almidón hinchados y la incompatibilidad molecular influenciaban las propiedades de gelificación de estas mezclas.

Los sistemas alimentarios tipo salsa blanca también han sido investigados desde el punto de vista reológico en diversos estudios. Thebaudin et al. (1998)

analizaron las propiedades espesantes de cuatro tipos de almidón: maíz (nativo y céreo modificado químicamente), trigo (nativo) y arroz (nativo céreo), con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento térmico en las características texturales de sistemas modelos de salsas bechamel. En general, las diferencias encontradas en las propiedades viscoelásticas de los diferentes almidones en agua fueron igualmente encontradas en las salsas elaboradas con ellos. No obstante, remarcaron que la presencia de otros compuestos como lípidos y proteínas lácteas influía en dichas propiedades.

Más recientemente Arocas et al. (2009a, b, c) llevaron a cabo una serie de interesantes estudios acerca de la estabilidad de salsas blancas elaboradas con diferentes polisacáridos frente a procesos de calentamiento, congelación y descongelación. En el primero de ellos (Arocas et al. 2009a) se analizaron salsas preparadas con diferentes almidones (dos modificados y dos nativos) y observaron que las propiedades reológicas elaboradas con almidones modificados no se veían afectadas con el ciclo de congelación-descongelación. En el segundo estudio (Arocas et al. 2009b) se analizaron las propiedades viscoelásticas y la sinéresis de salsas recién preparadas (a diferentes velocidades de agitación), congeladas y descongeladas a temperatura ambiente. Para ello se emplearon almidones nativos de diversos orígenes —maíz (nativo y nativo céreo), patata y arroz—. Se comprobó que el ciclo de congelación-descongelación afectaba significativamente a los parámetros reológicos de las muestras preparadas con almidones de maíz nativo y patata, pero no ocurría así con las preparadas con maíz céreo y arroz. En el último estudio (Arocas et al. 2009c), estos autores analizaron cómo la adición de goma xantana y goma garrofín a bajas concentraciones (0.15%) mejoraba la estabilidad al ciclo de congelación-descongelación de las salsas blancas elaboradas con almidones nativos de distinto origen (maíz y maíz céreo, patata y arroz).

Por último, Heyman et al (2010) investigaron cómo afectaba la sustitución parcial de almidón modificado por hidrocoloides distintos del almidón (goma guar, goma xantana y carboximetilcelulosa) en las propiedades fisicoquímicas y la estabilidad de salsas bechamel después de su refrigeración. Esta sustitución alteró

### *Introducción*

diversos parámetros reológicos y en algunos casos mejoró la estabilidad de las salsas frente a la refrigeración.

## **I.7. MICROESTRUCTURA Y ANÁLISIS DE IMAGEN**

La microestructura de un alimento muestra la organización de sus componentes y la interacción entre ellos a nivel microscópico. Durante el procesado y almacenamiento de un alimento, su microestructura puede verse modificada en función de las condiciones a las que se vea sometido. Así, los alimentos pueden tener similar composición química y manifestar comportamientos totalmente diferentes dependiendo de la forma en la que se hayan organizado sus componentes durante el procesado (Aguilera y Stanley 1999). Esta interacción entre los distintos componentes del alimento se puede visualizar por distintas técnicas microscópicas que relacionan la estructura de los alimentos con otras propiedades, permitiendo entender los mecanismos básicos de los cambios fisicoquímicos (Aguilera 2005).

El paso limitante que condiciona el análisis microestructural de los alimentos es la adquisición de micrografías digitales de gran calidad, donde se consiga el máximo contraste posible entre los objetos de interés (glóbulos de grasa, gránulos de almidón, celdas de polímeros, etc.) y el fondo de la imagen. Para ello, es necesario el conocimiento previo de conceptos básicos de análisis de imagen digital, además de conocer el funcionamiento del sistema de captación de imágenes para ajustar las condiciones óptimas de muestreo.

### **I.7.1. CONCEPTOS PREVIOS DE ANÁLISIS DE IMAGEN DIGITAL**

A continuación se definen algunos de los conceptos sobre procesado y análisis de imagen (Pertusa 2003; Russ 2006). La figura I.5 muestra un esquema que representa algunos de ellos.

*Píxel*: las imágenes digitales se crean formando una matriz bidimensional cuya anchura y altura viene definida por un número de puntos en x (columnas) y en y

(filas) correspondientes a la información recogida en cada punto de la muestra mediante un dispositivo de captación de imágenes. Cada uno de estos puntos se denomina pixel (contracción del inglés “picture element”) y representa la unidad más pequeña en la que se divide la imagen.

*Nivel de gris:* se define como el valor de intensidad lumínica en cada píxel que es proporcional al que tiene el punto correspondiente en la imagen real.

*Imagen analógica:* se define como una función continua  $f(x, y)$ , donde las coordenadas  $x, y$  son variables espaciales y la función valor de  $f$  es la intensidad luminosa en cada punto.

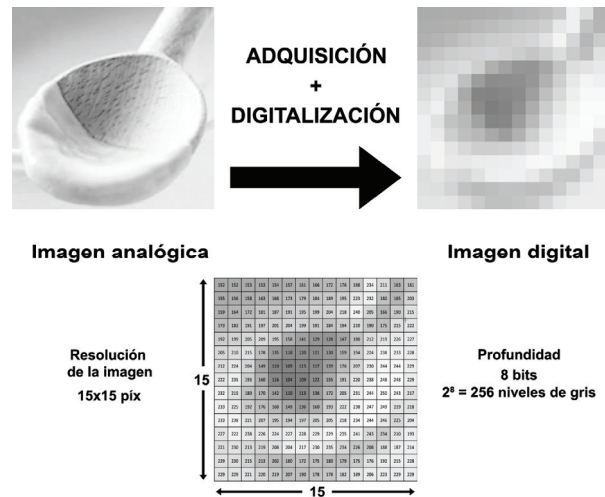
*Imagen digital:* se define como una función discreta  $f(x, y)$  determinada a partir de la función continua (imagen analógica) correspondiente. El proceso de transformación de una imagen analógica a una digital se denomina *digitalización* y se compone de dos fases: *muestreo* y *cuantificación*. El *muestreo* es el proceso de conversión de los valores continuos  $x, y$  en valores discretos que definen la posición de los píxeles en la matriz generada mientras que la *cuantificación* es el proceso análogo para los valores de  $f$  que define el nivel de gris de cada píxel.

*Resolución espacial:* se define como el número de puntos o píxeles por área. Conviene diferenciar la resolución espacial del equipo de captación de la señal (microscopios) y la resolución espacial de la imagen digital. La primera hace referencia a la capacidad que tiene el equipo (determinado a su vez por las lentes y el tipo de sensor empleado) de captar información distinguible y separable entre dos puntos. Así si un microscopio es capaz de hacer barridos a mayor resolución, significa que es capaz de detectar información de más puntos por unidad de área en la muestra. La segunda hace referencia a la cantidad de píxeles que contiene la imagen digital generada tras el muestreo de la imagen analógica. La resolución espacial real de la imagen digital no podrá ser superior a la resolución espacial máxima del dispositivo de captación de la imagen. Por ello es fundamental que el proceso de adquisición de la imagen se haga a una resolución suficiente para su posterior análisis.

## Introducción

**Resolución radiométrica:** se define como la capacidad de un dispositivo digitalizador de convertir la intensidad luminosa de la señal analógica recibida en saltos discretos, que se corresponden con los niveles de gris obtenidos tras el proceso de *cuantificación*.

**Objeto:** elemento de la imagen distinguible e independiente que destaca sobre el fondo que lo engloba.





En la técnica de cryo-SEM la muestra es congelada rápidamente en nitrógeno nieve (-210 °C) y mantenida a baja temperatura durante la visualización lo que permite observar la estructura original del material sin necesidad de mayor preparación (Sriamornsak et al. 2008). La muestra una vez congelada, puede ser fracturada permitiendo la visualización de la estructura interna en el corte realizado, tras una sublimación controlada del agua superficial, lo que la hace ideal para la observación de la microestructura de componentes muy hidratados (Ong et al. 2011). La muestra es excitada por un haz de electrones primario que barre la superficie de la misma —previamente cubierta con una capa de material conductor como el oro— lo que produce la emisión de electrones secundarios y otro tipo de radiaciones que son captadas por diferentes detectores para generar la imagen correspondiente (Pertusa 2003; Russ 2006). La técnica de cryo-SEM ha sido empleada con éxito, por ejemplo, en el estudio de la microestructura de componentes de la leche y el queso (Knudsen y Skibsted 2010; Ong et al. 2011) y mayonesa (Langton et al. 1999).

Por su parte, la técnica de CLSM permite observar a distintas profundidades el interior de la muestra mediante un corte óptico de la misma. La CLSM mejora la resolución a lo largo del eje de observación debido a la eliminación de las zonas difusas habitualmente encontradas en microscopía óptica que son provocadas por la luz detectada fuera del plano focal. La preparación de la muestra carece de laboriosos tratamientos por lo que la alteración de la estructura original es mínima (Ferrando y Spiess 2000). Además, esta técnica permite visualizar estructuras tridimensionales (3D) que dan una información más precisa de la microestructura (Gunasekaran y Ding 1999). La CLSM se fundamenta en la excitación de las muestras mediante láseres de diferente longitud de onda. Las muestras son previamente marcadas con agentes fluorescentes (fluoróforos) que son afines a diferentes componentes (grasas, proteínas, polímeros de almidón). Los fluoróforos son capaces de absorber la energía de una longitud de onda concreta (o rango de longitudes muy próximas) y emitir luz con una longitud de onda distinta que puede ser filtrada y recogida por un detector (fotomultiplicador). Este dispositivo es el encargado de transformar la energía recibida en una imagen digital. En la última década, la técnica de CLSM se ha utilizado ampliamente en el estudio de

## *Introducción*

diferentes sistemas alimentarios, desde productos lácteos (Auty et al. 2001), hasta boniato, masa panaria (Dürrenberger et al. 2001) y fideos (Chewangkul et al. 2001).

Uno de los parámetros clave a especificar en los microscopios de barrido y que controla la calidad de la imagen es la velocidad de escaneo. El microscopio confocal utiliza unos espejos dicróicos para dirigir el rayo láser de excitación, mientras que el SEM utiliza campos magnéticos para dirigir el haz de electrones hacia la muestra (Russ 2005). La velocidad de barrido depende principalmente de la cantidad de puntos que se escanean en la muestra —lo que se puede prefijar indicando la resolución espacial deseada— o del tiempo que se mantiene el haz incidente sobre cada punto del barrido.

Con una velocidad de escaneo rápida, se consigue un monitoreo rápido de la muestra lo que ayuda a la localización y enfoque del lugar de interés en la misma, sin embargo obtenemos una imagen con elevado ruido de fondo. Disminuyendo la velocidad de escaneo se obtienen mayores señales lo que limita el ruido de fondo. No obstante un escaneo muy lento no solo dificulta el posicionamiento de la muestra y el enfoque, sino que permite que la carga del rayo se acumule en partes de la imagen produciendo una serie de efectos indeseados, desde zonas brillantes y oscuras donde la carga generada altera la emisión o la recogida de electrones, hasta distorsiones donde la carga generada desvía el haz de electrones. Esta carga se minimiza utilizando una capa muy fina del material conductor y el uso de bajos voltajes en el haz de electrones primarios. En el caso de CLSM un barrido rápido de la muestra produce un efecto similar a SEM. En este caso, los fotones emitidos por los fluoróforos serán menores y se incrementará el ruido de fondo. Pero si el barrido es muy lento, se puede producir el fenómeno conocido como “photobleaching” o decaimiento de la intensidad de la señal emitida. Para limitar este efecto, se puede reducir la intensidad del láser incidente en la muestra mediante el empleo de reguladores de potencia o filtros y paralelamente aumentar la ganancia del fotodetector, es decir la amplificación de la señal del mismo. De esta manera se pueden emplear velocidades de barrido superiores minimizando la pérdida de calidad de la imagen resultante.

### I.7.3. DIGITALIZACIÓN DE LA IMAGEN

Los detectores de los microscopios se encargan de recibir la señal analógica (continua) en forma de electrones secundarios en cryo-SEM o fotones en CLSM desde cada punto de la muestra. Estos dispositivos transforman esta señal en impulsos eléctricos en función de la intensidad de la misma. Cada dispositivo tiene un umbral por debajo del cual el detector no envía señal o por encima del cual se satura y deja de generar una corriente eléctrica de mayor intensidad -son los denominados umbrales de sensibilidad y saturación que dependen de cada tipo de detector- (Pertusa 2003). El impulso eléctrico generado llega a un convertidor analógico-digital (ADC) que transforma la señal eléctrica correspondiente a cada punto del barrido en incrementos discretos, codificando consecutivamente cada uno de los estados crecientes de intensidad mediante números binarios (proceso de *digitalización*). Los números binarios contienen diferentes dígitos (bits) que únicamente pueden tomar dos valores, 0 o 1. Así por ejemplo si el ADC codifica la señal mediante un número binario de un 1 bit, sólo podrá representar dos estados de información (0 o 1), si tuviera 2 bits podría representar  $2^2$  (4) estados y así sucesivamente. En general los estados que se pueden definir serán  $2^b$ , siendo b el número de bits que se utilizan para codificar la señal. El número de bits representa la *profundidad* de la imagen digital resultante. Normalmente se emplean 8 bits lo que se corresponde con  $2^8$  (256) niveles diferentes de nivel de gris. A mayor *profundidad* mayor información podrá albergar la imagen digital aproximándose de este modo a la imagen real.

### I.7.4. PROCESADO Y ANÁLISIS DE IMAGEN

Pese a que la adquisición de las imágenes se haya llevado a cabo con las máximas precauciones posibles, es habitual encontrarse con problemas asociados a iluminación desigual, ruido de fondo o falta de contraste entre los objetos y el fondo de las imágenes. El *procesado de imagen* consiste precisamente en solucionar este tipo de defectos en las imágenes originales y se lleva a cabo mediante diversos programas de procesado de imagen asistido por ordenador.

### *Introducción*

La secuencia lógica de trabajo consiste en corregir primero el ruido de fondo y defectos en la iluminación, así como en la mejora del contraste mediante el uso de operaciones sobre las imágenes en nivel de gris. A continuación se realiza el proceso de segmentación que consiste en analizar el nivel de gris que presentan los píxeles de los objetos y el fondo y elegir un valor umbral a partir del cual se puedan separar ambos. La nueva imagen obtenida se denomina binaria y representa los píxeles con dos únicos niveles de gris posibles (0 o 1) en función de si pertenecen al objeto o al fondo. Finalmente, se trata la imagen binaria obtenida con el objetivo de eliminar errores en el proceso de segmentación y prepararla para el análisis.

Una vez que las imágenes han sido procesadas y muestran de manera individualizada los objetos que deseamos cuantificar, se procede a su identificación y medida. El *análisis de imagen* tiene como objetivo el análisis cuantitativo de los parámetros morfométricos como el tamaño y forma de los objetos presentes, así como su distribución a lo largo del alimento analizando el número de objetos por campo.

### I.7.5. ESTUDIO DE LA MICROESTRUCTURA DE SISTEMAS ALIMENTARIOS CON HIDROCOLOIDES

En la literatura existen numerosos estudios que aplican técnicas microscópicas (entre ellas cryo-SEM y CLSM) para investigar la microestructura de sistemas alimentarios que incluyen almidones y otros hidrocoloides o tienen ingredientes similares a los utilizados en la salsa blanca. van de Velde et al. (2002) destacaron que la visualización de los gránulos de almidón era importante para entender el comportamiento de los geles formados a partir de éstos y que la CLSM era una herramienta de fácil empleo para monitorizar su proceso de gelatinización. La visualización de la distribución de diversos biopolímeros (gelatina, dextrano, goma gelana, goma arábiga, carragenato, almidón y proteínas del lactosuero) en mezclas ha sido también realizada mediante técnicas de tinción covalente y no covalente para CLSM (Tromp et al. 2001). Auty et al (2001) también identificaron la grasa y la proteína en diversos productos lácteos mediante CLSM, realizando una tinción fluorescente doble que les permitió la visualización simultánea de grasa y

proteína. De este modo analizaron el desarrollo de la microestructura de queso mozzarella durante su procesado y maduración y la distribución de grasa y proteína en chocolate con leche. O'Mahony et al. (2005) utilizaron CLSM y técnicas de análisis de imagen para comprobar que el tamaño de los glóbulos de grasa en quesos cheddar disminuye significativamente cuando el tamaño de los glóbulos de grasa de la leche de partida era menor. Gunasekaran y Ding (1999) analizaron la microestructura de quesos cheddar con diferente contenido en grasa mediante CLSM. Empleando técnicas de análisis de imagen determinaron el número, tamaño y forma de los glóbulos de grasa y evaluaron la estructura 3D del queso. Finalmente, Herbert et al. (1999) analizaron la estructura de la leche coagulada mediante CLSM utilizando una triple tinción fluorescente específica para proteínas, lípidos y suero de leche.

## **I.8. ESTUDIOS REOLÓGICOS Y MICROESTRUCTURALES COMBINADOS**

El estudio complementario de la reología y microestructura ayuda a caracterizar de una manera más completa el comportamiento fisicoquímico del alimento. Es por ello que un gran número de investigaciones incorporan ambos tipos de análisis en su metodología. En salsas blancas, los cambios fisicoquímicos principales incluyen aquellos relacionados con la gelatinización del almidón, agregación de proteínas y distribución de grasa, además de las interacciones entre los hidrocoloides y la fase acuosa. Estos cambios dependen de la propia composición de la salsa, así como del tiempo y temperatura de cocinado.

Algunos estudios previos han investigado los procesos de gelatinización desde un punto de vista reológico y microestructural. Lewandowicz et al. (1997; 2000) sometieron diferentes almidones en disolución a distintas concentraciones a un tratamiento con MO y hallaron diferencias en el proceso de gelatinización debido a este tipo de calentamiento. Tan et al. (2008) monitorizaron el proceso de gelatinización de algunos almidones (maíz con distintos niveles de amilosa, trigo y cebada) e indicaron la importancia del tamaño y distribución de los gránulos de almidón en la respuesta reológica. En sistemas más complejos, Vélez-Ruiz et al.

### *Introducción*

(2006) estudiaron la estructura y reología de diferentes sistemas modelos de natillas preparados con diferentes fases dispersas (agua y leche). Estos autores concluyeron que pese a que las características microestructurales y reológicas dependían principalmente del almidón modificado utilizado, otros ingredientes (como el azúcar) y el uso de una fase dispersa u otra modificaban estas características.

Otros estudios analizan el efecto de las proteínas y la interacción entre éstas y diversos hidrocoloides sobre las propiedades reológicas y microestructurales. Bhattacharya et al. (2007) plantearon un mecanismo de formación de gel en dispersiones de harina de soja sometidas a diferente tiempo de calentamiento por MO. Liu et al (2011), estudiaron el efecto del tipo de calentamiento (CO y por MO) sobre las propiedades viscoelásticas y microestructurales de aislado de proteína de soja (APS) y determinaron que la formación del gel dependía del tipo de método de calentamiento. Jeng Yune Li et al (2007) por su parte, investigaron combinaciones entre almidón de maíz y APS observando la formación de una red tridimensional entre ambos que se debilitaba a medida que aumentaba la proporción de almidón en la mezcla. Artloft et al (2007a) estudiaron las propiedades gelificantes de diversos tipos de carragenato en mezclas con leche desnatada utilizando parámetros reológicos y CLSM.

Los estudios relacionados con la distribución de la grasa son especialmente importantes en alimentos que sufren procesos de congelación-descongelación. Las salsas son emulsiones y como tales son termodinámicamente inestables y pueden colapsar debido a diversos procesos fisicoquímicos (Thanasukarn et al. 2004). Los cinco principales mecanismos que contribuyen a la desestabilización de las emulsiones son: cremado, floculación, maduración de Ostwald, coalescencia e inversión de fases. La velocidad a la que la emulsión se desestabiliza está fuertemente influenciada por la composición, las condiciones externas (temperatura, pH, etc.) y las condiciones de procesado (Rousseau 2000). La estabilidad de las emulsiones durante el proceso y almacenamiento en congelación está influenciada por el polimorfismo y el grado de cristalinidad de los lípidos que la forman y el comportamiento de la fase acuosa. Cuando las emulsiones se congelan, los glóbulos de grasa se concentran progresivamente en

la fase crioconcentrada y por tanto entran en contacto unos con otros en las zonas todavía no congeladas. La acumulación de estos glóbulos en estas zonas promueven los fenómenos de agregación, floculación y/o coalescencia durante el posterior proceso de descongelación (Thanasukarn et al. 2004). En este sentido la CLSM también se ha empleado para caracterizar emulsiones de aceite en agua Moschakis et al (2005; 2010).

En sistemas tipo salsa blanca existen muy pocos estudios que combinen estudios reológicos y microestructurales. Mandala et al (2004) analizaron el efecto de la adición de goma xantana y garrofín a sistemas modelo de salsa blanca elaborados con almidón de maíz, caseína y aceite de oliva. Las muestras se refrigeraron y se realizaron estudios reológicos dinámicos y estáticos durante el almacenamiento. Además se investigó la microestructura mediante microscopía óptica. La adición de gomas reducía la viscosidad de las salsas en relación con la salsa control (sin adición) y se observaron agregados de las gomas concentrados en la fase continua formada por los polímeros de almidón. Arocas et al. (2010) realizaron estudios sobre el efecto de la formulación y el tiempo de cocinado de la salsa en el grado de gelatinización del almidón (maíz, maíz céreo, arroz, patata y distintos tipos de almidón de maíz modificado). Para ello evaluaron las propiedades reológicas y microestructurales de los almidones en agua y junto con el resto de ingredientes de las salsas (leche desnatada, aceite de girasol y sal), concluyendo que los almidones de maíz céreo y de patata eran los menos resistentes al cocinado. Además, comprobaron que la adición del resto de ingredientes de la salsa disminuía el efecto del cocinado sobre el proceso de gelatinización con respecto a los sistemas almidón-agua correspondientes. Estos mismos autores (Arocas et al. 2011) compararon los efectos de la descongelación por MO y en baño de agua sobre salsas blancas elaboradas con dos tipos de almidón nativo (maíz y patata) y uno de maíz céreo modificado. Comprobaron que las características reológicas y microestructurales de las salsas preparadas con almidones nativos se veían fuertemente afectadas debido al fenómeno de retrogradación. No obstante, comprobaron que estos efectos eran menos apreciables en las salsas descongeladas por microondas. Este hecho lo atribuyeron por un lado, a un menor tiempo de descongelación cuando se usa el

### *Introducción*

HMO que reduciría el grado de retrogradación y por otro, a que la mayor temperatura alcanzada en ciertos puntos deshiciera el almidón retrogradado. Por otro lado la salsa preparada con almidón modificado no se vio afectada por el ciclo de congelación-descongelación.

En definitiva, a pesar de la literatura existente sobre sistemas alimentarios con hidrocoloides, no existe mucha información acerca del comportamiento de sistemas más complejos —con mezclas de hidrocoloides, proteínas y grasas— ante procesos de calentamiento, refrigeración y congelación-descongelación. En cualquier caso, ninguna investigación ha sido diseñada para elaborar alimentos tipo salsa optimizados para su calentamiento en MO.



## **II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**



## **II.1. OBJETIVOS**

### **II.1.1. OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general del presente trabajo es optimizar la formulación de un sistema alimentario semisólido tipo salsa, estable al almacenamiento en frío y apto para el calentamiento en microondas.

### **II.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

— Analizar las propiedades dieléctricas de sistemas modelo con diferentes hidrocoloides.

— Estudiar el efecto del calentamiento en microondas tras el almacenamiento en refrigeración sobre la reología y la microestructura de salsas con diferentes almidones en su composición.

— Investigar los posibles cambios químicos y microestructurales producidos en las proteínas, grasas e hidratos de carbono de salsas elaboradas con distinto tipo de proteína y descongeladas en horno microondas y convencional.

— Analizar la influencia de la velocidad de agitación y el tipo de aceite utilizado en la elaboración de las salsas sobre las propiedades dieléctricas y la microestructura de la fracción lipídica. Estudiar el efecto de la descongelación por horno microondas y convencional en la microestructura de la emulsión.

## **II.2. Plan de trabajo.**

1. Búsqueda y estudio bibliográfico de manera sistemática durante la realización de la tesis. Estudio de la normativa y protocolos a seguir en la parte experimental.

2. Diseño de experimentos.

### *Objetivos y plan de trabajo*

3. Elaboración de sistemas modelo con distintos hidrocoloides y sal a diferentes concentraciones. Medida de las propiedades dieléctricas (sonda coaxial conectada a un analizador vectorial de redes) y microestructurales (cryo-SEM y análisis de imagen) de los sistemas elaborados. Estudio reológico (ensayos de fluencia).

4. Elaboración de salsas con diferente tipo de almidón. Almacenamiento en refrigeración y análisis reológicos (ensayos dinámicos oscilatorios) y microestructurales (CLSM y análisis de imagen) tras el calentamiento en horno microondas.

5. Elaboración de salsas que incluyan además de hidrocoloides y sal, distintos tipos de proteína (láctea o de soja) y aceite (girasol). Análisis químico (electroforesis SDS-PAGE, N-soluble, índice de acidez, grado de oxidación primaria y secundaria de la grasa, contenido en azúcares reductores, sinéresis) y microestructural (CLSM y análisis de imagen) de las salsas tras congelación y posterior descongelación en horno microondas y convencional.

6. Elaboración de salsas con hidrocoloides y proteína láctea a los que se adiciona diferentes tipos de grasas. Medida de las propiedades dieléctricas (sonda coaxial conectada a un analizador vectorial de redes). Análisis microestructural de la fracción grasa (CLSM y análisis de imagen) tras su elaboración y tras descongelación por horno microondas y convencional.

7. Análisis de resultados, redacción de informes y divulgación científica.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



### III.1. INGREDIENTES

En el estudio del comportamiento de sistemas modelo elaborados con distintos hidrocoloides frente al calentamiento en MO (sección IV.1) se emplearon los siguientes ingredientes: almidón de maíz nativo (AN) —C Gel 03401<sup>®</sup>— y almidón de maíz céreo modificado —fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento (AHAF), C Polar Tex 06748<sup>®</sup>— de Cargill, Inc. Minneapolis, EEUU; ι-carragenato (ι-C) —Secovis IS<sup>®</sup>— y λ-carragenato (λ-C) —Secolacta BR<sup>®</sup>— de Hispanagar, Burgos, España; κ-carragenato (κ-C) —Satiagel RPI 740<sup>®</sup>— de Degussa, Essen, Alemania; cloruro sódico de Panreac Química SAU, Barcelona, España y agua destilada.

En la caracterización reológica y microestructural de salsas bechamel elaboradas con distintos tipos de almidón y calentadas en HMO (sección IV.2) los ingredientes utilizados fueron: leche desnatada en polvo (LDP) —Central Lechera Asturiana, Asturias, España—; ι-carragenato (ι-C), cloruro sódico y agua destilada. Además, se emplearon diferentes tipos de almidón de maíz: AN y almidón nativo céreo (ANC) —C Gel 04201<sup>®</sup>—, adipato de dialmidón acetilado entrecruzado (AAA) —C Tex 06205<sup>®</sup>—, fosfato de dialmidón hidroxipropilado entrecruzado (AHF) —C Polar Tex 06741<sup>®</sup>— y AHAF; todos ellos suministrados por Cargill, Inc. Minneapolis, EEUU. La selección de los almidones se realizó con el objetivo de comparar almidones nativos normales y céreos así como almidones con diferente tipo de modificación química: sustitución (acetilación e hidroxipropilación) y entrecruzamiento (adipato y fosfato) a diferentes niveles.

En el estudio de la estabilidad química y microestructural de salsas bechamel elaboradas con distinta proteína frente al proceso de congelación-descongelación (sección IV.3) se emplearon los siguientes ingredientes: AHAF, ι-C, cloruro sódico y agua destilada. Además, se emplearon ingredientes que aportaran proteína de origen animal y vegetal: leche desnatada en polvo (LDP) o aislado de proteína de soja (APS) -Vicoprot-S<sup>®</sup>, Trades S.A., Tarragona, España-.

## Materiales y métodos

En el estudio de la estabilidad química y microestructural de salsas bechamel elaboradas a distintas velocidades de agitación y con distintos tipos de grasa frente al proceso de congelación-descongelación (sección IV.4) los ingredientes utilizados fueron: AHAF,  $\iota$ -C, cloruro sódico y agua destilada. Asimismo, se emplearon diferentes grasas y aceites: aceite de oliva virgen extra (Carbonell<sup>®</sup>, SOS Cuétara S.A., Madrid, España), aceite de girasol (Koipesol<sup>®</sup>, SOS Cuétara S.A., Madrid, España), aceite de soja virgen (Biolasi Productos Naturales S.L., Guipúzcoa, España) mantequilla (Président<sup>®</sup>, Grupo Lactalis, Laval, Francia).

## III.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

### III.2.1. PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS MODELO

En el estudio del comportamiento de sistemas modelo frente al calentamiento en MO (sección IV.1) se prepararon 5 modelos diferentes empleando los ingredientes detallados en la tabla III.1. La proporción de cada ingrediente se obtuvo en base a un modelo estadístico de superficie de respuesta compuesto central, rotable y ortogonal cuya explicación aparece detallada en la sección de estadística (sección III.10).

Tabla III.1. Composición de los diferentes sistemas modelo analizados.

Muestra	Sistema modelo									
	AN		AHAF		$\iota$ -C		$\lambda$ -C		$\kappa$ -C	
	NaCl	H	NaCl	H	NaCl	H	NaCl	H	NaCl	H
	4	3.5	4	3.5	4	0.55	4	1.2	4	0.55
9	7	3.5	7	3.5	7	0.55	7	1.2	7	0.55
10	1	3.5	1	3.5	1	0.55	1	1.2	1	0.55
11	1.9	1.7	1.9	1.7	1.9	0.4	1.9	0.9	1.9	0.4
12	6.1	1.7	6.1	1.7	6.1	0.4	6.1	0.9	6.1	0.4
13	4	6	4	6	4	0.8	4	1.6	4	0.8
14	6.1	5.3	6.1	5.3	6.1	0.7	6.1	1.5	6.1	0.7
15	4	1	4	1	4	0.3	4	0.8	4	0.3
16	1.9	5.3	1.9	5.3	1.9	0.7	1.9	1.5	1.9	0.7

H: hidrocoloide (g/100 g agua); NaCl: cloruro sódico (g/100 g agua) AN: almidón nativo; AHAF: fosfato de almidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento;  $\iota$ -C:  $\iota$ -carragenato;  $\lambda$ -C:  $\lambda$ -carragenato;  $\kappa$ -C:  $\kappa$ -carragenato.



## *Materiales y métodos*

Con el objetivo de predisolver los ingredientes utilizados en cada sistema, la sal y el hidrocoloide se vertieron en un vaso de precipitados junto con 100 g de agua destilada y la mezcla se agitó con la ayuda de una varilla de vidrio. Una vez predisuelta se vertió en un robot de cocina (Thermomix TM 31, Vorwerk, Wuppertal, Alemania) como en el que se muestra en la figura III.1.



**Figura III.1.** Robot de cocina (Thermomix TM 31).

A continuación se calentó la mezcla en agitación en el robot de cocina a 1100 rpm hasta alcanzar los 90 °C (17 °C/min) y se mantuvo a 90 °C a la misma velocidad de agitación durante 6 minutos. Las diferentes mezclas preparadas se introdujeron en frascos desechables de plástico, se reemplazó el agua evaporada durante la preparación y se atemperaron (20 °C). Finalmente se almacenaron en refrigeración (4 °C) durante 24 h hasta ser analizadas.

### III.2.2. PREPARACIÓN DE LAS SALSAS BECHAMEL

Las salsas bechamel se elaboraron con los ingredientes mencionados en la sección III.1 utilizando las proporciones indicadas en la tabla III.2.

## Material es y métodos

**Tabla III.2.** Composición de las salsas bechamel en función de la base proteica utilizada.

Ingrediente	Salsas con proteína de leche (%)	Salsas con proteína de soja (%)
Almidón	3.5	4.5
LDP	9.3	-
APS	-	3.2
Grasa	2.5	2.5
Carragenato	0.5	0.5
Sal	0.4	0.4
Agua	83.8	88.9

LDP: leche desnatada en polvo; APS: aislado de proteína de soja.

Las muestras (300 g) se prepararon de acuerdo con la metodología descrita por Arocas et al. (2009a). Los ingredientes se colocaron en el robot de cocina, se calentaron hasta los 90 °C (17 °C/min) a 1100 rpm y se mantuvieron a 90 °C a la misma velocidad de agitación durante 6 min. En el estudio de la estabilidad de las salsas preparadas con diferentes aceites y grasas (sección IV.4) se prepararon las muestras a diferentes velocidades de agitación (350, 1100 y 3250 rpm). Finalmente, las salsas obtenidas se vertieron en tarros de Pirex y se adicionó el agua evaporada tras la preparación.

El análisis de las muestras recién preparadas se realizó tras alcanzar la temperatura ambiente. Las destinadas al estudio del efecto del recalentamiento en microondas (sección IV.2) se refrigeraron a 4 °C durante 24 h. Por otro lado, las muestras destinadas al estudio del efecto de la descongelación por HCO y HMO (sección IV.3), se congelaron a -18 °C durante 168 h mientras que las empleadas para el estudio de la sinéresis se mantuvieron congeladas hasta 336 h.

### III.3. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

En el estudio del calentamiento en microondas sobre salsas elaboradas con diferentes almidones (sección IV.2), diferentes lotes de muestras refrigeradas (4 °C) se calentaron durante 60, 90, 120,180, 300 y 480 s en HMO (Moulinex

Óptimo, Paris, Francia) a 900 W y 2.45 GHz. Las muestras se cubrieron durante el calentamiento con un tapón de plástico agujereado.

Para el estudio del efecto de la descongelación en HMO u HCO (sección IV.3) las muestras se trataron del siguiente modo: un lote se descongeló en HMO (Óptimo®, Moulinex, Paris, Francia) a 700 W durante 6 minutos y otro lote se descongeló en HCO (Fagor 2CF-3V, Guipúzcoa, España) a 220 °C durante 30 minutos. La selección de las condiciones de descongelación para cada método se basó en experimentos previos de medida de la temperatura durante el calentamiento. Mediante estas condiciones se alcanzaron al menos 0 °C en el centro geométrico de las diferentes muestras analizadas.

Tras los distintos tratamientos térmicos, las muestras se homogeneizaron en las botellas de Pyrex removiéndolas con una cuchara durante 3 s. A continuación, se atemperaron (20 °C) previamente a la realización de los análisis. Las submuestras para los distintos análisis fueron tomadas de manera aleatoria de diferentes zonas de las botellas de Pyrex.

### **III.4. DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DURANTE EL CALENTAMIENTO .**

#### **III.4.1 HORNO MICROONDAS**

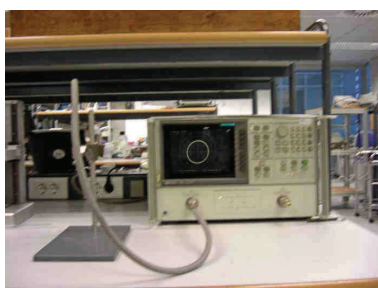
La medida de la temperatura durante el análisis del calentamiento en microondas (sección IV.2) se realizó colocando la punta de una sonda ST3 de fibra óptica conectada a un conversor analógico-digital FOTEMP1-OEM® (OPTICOM, Dresden, Alemania) en el centro geométrico de la muestra. La sonda se insertó a través del tapón de plástico agujereado y se sujetó con cinta aislante. En el caso de las salsas descongeladas por HMO (sección IV.3) fue necesaria la realización de un agujero hasta el centro geométrico de las muestras congeladas utilizando un taladro, previamente a la inserción de la sonda.

### III.4.2 HORNO CONVENCIONAL

La determinación de la temperatura en las muestras descongeladas por HCO (sección IV.3) se llevó a cabo mediante la inserción de un termopar tipo K conectado a un termómetro TES-1300 (Electrical Electronic Co. Taipei, Taiwan) a través de un agujero taladrado en las muestras congeladas. La sonda se insertó a través de papel de aluminio agujereado y sujeta mediante un alambre metálico.

### III.5. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES DIELECTRICAS

Las propiedades dieléctricas —constante dieléctrica ( $\epsilon'$ ) y factor de pérdidas ( $\epsilon''$ )— de las muestras de los sistemas modelo con hidrocoloides y sal analizados en la sección IV.1 se determinaron a dos temperaturas fijas: 20 y 40 °C. Asimismo, en el estudio de salsas elaboradas con diferentes grasas y preparadas a distintas velocidades de agitación (sección IV.4) se analizaron las propiedades dieléctricas a 20 °C en las salsas recién elaboradas. Con el objetivo de que la temperatura fuera la misma para todas las muestras y se mantuviera constante durante el tiempo que duraron los ensayos se empleó un baño termostático (Precistern®, Selecta, Barcelona, España). Para la medida se usó una sonda conectada a un analizador vectorial de redes (Hewlett-Packard 85070M, Hewlett Packard Company, Palo Alto, CA, Estados Unidos) (figura III.2). El equipo se calibró al aire, mediante un cortocircuito metálico y con agua a 25 °C. Cada medida se realizó por triplicado y se obtuvo el valor medio a la frecuencia de 2.45 GHz.



**Figura III.2.** Sistema de medición de propiedades dieléctricas HP 85070M.

Una vez determinadas estas propiedades dieléctricas, se calculó la profundidad de penetración ( $d$ ), mediante la ecuación Ec.III.1 propuesta por Piyasena et al. (2003):

$$d = \frac{\lambda_0}{2 \cdot \pi \cdot \sqrt{2 \cdot \epsilon'}} \cdot \left[ \sqrt{1 + \left( \frac{\epsilon''}{\epsilon'} \right)^2} - 1 \right]^{-1/2} \quad (\text{Ec.III.1})$$

Donde:  $\lambda_0$  = longitud de onda en el vacío (0.12237 m a una frecuencia de 2.45 GHz);  $\epsilon'$  = constante dieléctrica;  $\epsilon''$  = factor de pérdidas.

### **III.6. ANÁLISIS QUÍMICOS**

#### **III.6.1. HUMEDAD**

La humedad de las muestras se calculó por diferencia de masa tras un proceso de liofilización durante 36 h a -45 °C y  $1.3 \times 10^{-3}$  mPa en un liofilizador (Lioalfa-6®, Telstar, Terrassa, España).

#### **III.6.2. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN DE PROTEÍNAS**

##### **III.6.2.1. NITRÓGENO TOTAL Y SOLUBLE**

La determinación del nitrógeno total y soluble de las muestras se determinó por el procedimiento de Kjeldahl (AOAC 1998) utilizando una mezcla de  $K_2SO_4$ ,  $CuSO_4$  y Se (10:1:0.1) como catalizador. Los resultados se expresaron utilizando un factor de conversión de 6.38 y 6.25 para salsas elaboradas con proteína de leche y soja respectivamente.

Para la determinación del nitrógeno total se emplearon directamente 10 g de muestra atemperada (20 °C) tras la descongelación. Para la determinación del nitrógeno soluble se realizó una extracción previa a partir de muestras liofilizadas mediante el método modificado de Kuchroo y Fox (1982). Se pesaron 2 g de cada muestra liofilizada en tubos de centrifuga. Se añadieron 15 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente. A continuación se centrifugó a 15000 rpm a 4 °C durante

### *Materiales y métodos*

15 min (Sorvall Super T21<sup>®</sup>, Kendro, Hanau, Alemania) El líquido sobrenadante se transfirió a un matraz aforado. El precipitado se resuspendió en la misma cantidad de agua y se repitió el procedimiento hasta completar 3 ciclos obteniendo el extracto final que se cuantificó por el método Kjeldahl.

#### III.6.2.2. ELECTROFORESIS SDS-PAGE

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) se llevó a cabo a partir de muestras liofilizadas y desengrasadas. Para ello se empleó 1 g de muestra y se mezcló con 20 mL de tampón de extracción —60 mM tris-HCl, pH 8— y se homogeneizó en un Ultraturrax T-25<sup>®</sup> (IKA, Staufen, Alemania). La mezcla se centrifugó a 15000 rpm a 4 °C durante 15 min. Se determinó la concentración de proteínas del sobrenadante mediante el método de Bradford (1976). Se tomaron alícuotas del sobrenadante y se mezclaron con tampones en condiciones no reductoras —2% SDS, 60 mM tris-HCl, pH 6.8— y reductoras empleando ditioneitol (DTT) —2% SDS, 60 mM tris-HCl, 0.1 mM DTT, pH 6.8—. La electroforesis se llevó a cabo en un equipo Multiphor II Electrophoresis System<sup>®</sup> provisto de un recirculador termostático Multi Temp II<sup>®</sup> (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EEUU) con el que se mantuvo la temperatura a 15 °C. Se empleó un gel de poliacrilamida ExcelGel SDS Homogeneous 12.5<sup>®</sup> (GE Healthcare, Chalfont St Giles, Reino Unido) con un 6% de monómeros totales y un 3% monómeros entrecruzadores en la zona de concentración del gel y 12.5% de monómeros totales y un 2% de monómeros entrecruzadores en la zona de separación, con un intervalo de separación de 9 a 210 kDa. En cada pocillo se depositaron 8 µL de las disoluciones de las muestras. Se utilizó un patrón de bajo peso molecular (GE Healthcare, Chalfont St Giles, Reino Unido). Las condiciones de desarrollo electroforético fueron: 600 V, 50 mA, 30 W durante 80 min. Las bandas de proteínas se tiñeron con una disolución de azul de coomassie (PhastGel Blue R<sup>®</sup>, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) y se destiñeron con una disolución acuosa de etanol al 25% y ácido acético al 8%. Los geles se escanearon y los pesos moleculares de las bandas se determinaron empleando el programa ImageQuant TL (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

### III.6.3. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN DE LÍPIDOS

Las muestras previamente liofilizadas se sometieron a la extracción de la grasa mediante un extractor semiautomático (Soxtec 2055<sup>®</sup>, Foss, Höganäs, Suecia) basado en el método soxhlet utilizando éter de petróleo 40-60°C (Panreac SAU, Barcelona, España) como disolvente. El índice de acidez se determinó según el método de la AOAC (1998). Los niveles de oxidación primaria y secundaria se determinaron mediante los parámetros espectrofotométricos  $k_{232}$  y  $k_{270}$  de la grasa extraída según las indicaciones de las Regulaciones de la Comunidad Europea (EEC 1991).

### III.6.4. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO

La posible degradación de los hidratos de carbono presentes se analizó mediante la determinación del contenido en azúcares reductores totales aplicando el método iodométrico de Shaffer-Somogyi (AOAC 1998). Se emplearon muestras liofilizadas y se utilizó glucosa anhidra como patrón, expresándose los resultados en mg de glucosa/g muestra en base seca (b.s.).

### III.7. SINÉRESIS

La determinación de la sinéresis se realizó según Heyman et al. (2010) con modificaciones. Las muestras se introdujeron en tubos de centrifuga, el lote correspondiente a las muestras recién hechas se atemperó a 20 °C, el resto se almacenó en congelación (-18 °C) durante 48, 96, 168, 336 h. Transcurrido el tiempo de congelación los tubos se atemperaron a 20 °C y se centrifugaron (Sorvall Super T21, Kendro, Hanau, Alemania) durante 15 min a 6000 g. La sinéresis se expresó como el porcentaje de líquido exudado, según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ sinéresis} = \frac{\text{peso del líquido exudado}}{\text{peso total antes de centrifugar}} \cdot 100 \quad (\text{Ec.III.2})$$

### III.8. ANÁLISIS REOLÓGICOS

#### III.8.1. ENSAYOS DE FLUJO VISCOSO

Las propiedades de flujo de los distintos sistemas modelo estudiados en la sección IV.1 se analizaron con un reómetro de esfuerzo controlado —RheoStress 1<sup>®</sup>, Thermo Haake, Karlsruhe, Alemania (figura III.3) —, equipado con un sistema de control electrónico de temperatura (Phoenix<sup>®</sup>, Thermo Haake, Karlsruhe, Alemania). Se utilizaron dos sensores con geometría plato-plato, de titanio, rugosos y de diámetros 35 mm (para muestras más viscosas) y 60 mm (para muestras más líquidas). La distancia entre platos se fijó en 1 mm. Se realizaron curvas de flujo a velocidades de cizalla comprendidas entre 0.01 y 100 s<sup>-1</sup> en un tiempo total de 600 s a 20 °C. Se realizaron tres repeticiones por cada muestra estudiada. A continuación, los datos experimentales de viscosidad frente a la velocidad de cizalla se ajustaron al modelo de Ostwald-de Waele (Ec.III.3) usando el software Rheowin 3 Data Manager (Thermo Haake, Karlsruhe, Alemania):

$$\eta = k \cdot \dot{\gamma}^{n-1} \quad (\text{Ec.III.3})$$

Donde:  $\eta$  = viscosidad aparente (Pa·s);  $\dot{\gamma}$  = velocidad de cizalla s<sup>-1</sup>; k = índice de consistencia (Pa·s<sup>n</sup>); n = índice de flujo.



Figura III.3. Reómetro RheoStress 1.



### III.8.2. ENSAYOS DINÁMICOS OSCILATORIOS

Las propiedades viscoelásticas de las salsas bechamel recién preparadas y recalentadas en MO (sección IV.2) se analizaron mediante ensayos dinámicos oscilatorios de cizalla de baja amplitud en un reómetro de estrés controlado (RheoStress 1<sup>®</sup>, Thermo Haake, Karlsruhe, Alemania) equipado con un baño termóstático (Phoenix<sup>®</sup>, Thermo Haake, Karlsruhe, Alemania) para controlar la temperatura (20 °C). Los sensores utilizados tenían una geometría de plato-plato serrada con 35 mm de diámetro. Se dejó un espacio de 1 mm entre los sensores y las muestras permanecieron 600 s entre los sensores hasta alcanzar el equilibrio previo al análisis.

Se realizaron barridos de esfuerzo a una frecuencia de 1 Hz para determinar la extensión de la respuesta viscoelástica lineal. Posteriormente se llevaron a cabo barridos de frecuencia de 0.01 a 10 Hz con una amplitud de onda dentro de la región lineal. Los valores del módulo de almacenamiento, el módulo de pérdidas y la tangente de pérdidas fueron determinados. El módulo de almacenamiento o elástico ( $G'$ ) es una medida de la energía almacenada y recuperada por ciclo de deformación sinusoidal. El módulo de pérdidas o viscoso ( $G''$ ) es una medida de la energía disipada o perdida como calor por ciclo de deformación sinusoidal. La tangente de pérdidas ( $\tan \delta = G''/G'$ ) es una medida de la proporción de energía perdida y almacenada por ciclo de deformación. La dependencia de  $G'$  con la frecuencia se ajustó a la siguiente ecuación de la ley de potencia (Ec.III.4):

$$G' = kf^n \quad (\text{Ec.III.4})$$

Donde,  $n$  es el índice de la ley de potencia que indica la dependencia de  $G'$  con la frecuencia. Valores de  $n = 1$  indican una dependencia lineal con la frecuencia y los valores de  $n = 0$  indican independencia.

### **III.9. ANÁLISIS MICROESTRUCTURAL**

#### **III.9.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO A BAJAS TEMPERATURAS (cryo-SEM)**

La técnica de cryo-SEM se empleó para la observación de los diferentes sistemas modelo con hidrocoloides y sal (sección IV.1). Para ello, las muestras se sumergieron en N<sub>2</sub> nieve a -210 °C, transfiriéndolas rápidamente a un Cryo-Trans CT1x500C de Oxford Instruments acoplado a un microscopio electrónico de barrido (Jeol JSM 5410) (figura III.4) que trabajaba en condiciones de congelación (-130 °C). En el Cryo-Trans las muestras se fracturaron a -180 °C con ayuda de un pequeño punzón. A continuación se introdujeron en la cámara del microscopio donde se sublimaron a -90 °C durante 20 min con el fin de eliminar el posible exceso de escarcha superficial que podría enmascarar los detalles de las superficie de las muestras. Las muestras se recubrieron con Au a 0.2 kPa y a una corriente de ionización de 40 mA y se observaron a 15 kV y a una distancia de trabajo de 15 mm. Las imágenes se almacenaron con una resolución de 512x402 píxeles y una profundidad de 8 bits.



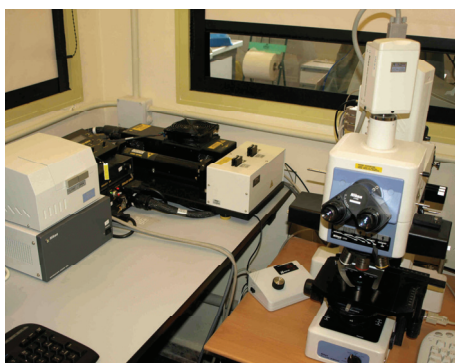
**Figura III.4.** Cryo-Trans CT1x500C de Oxford Instruments acoplado a un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 5410 (cryo-SEM).

#### **III.9.2. MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL DE BARRIDO (CLSM)**

El estudio microestructural de las salsas bechamel se realizó mediante CLSM. Se utilizó un microscopio confocal Nikon C1 acoplado a un microscopio Nikon

### *Materiales y métodos*

Eclipse E800 (Nikon, Tokio, Japón) —figura III.5—. Se utilizó un láser de Ar (488 nm) como fuente de luz para excitar a los agentes de tinción fluorescentes rodamina B y Nile red. La rodamina B (Fluka, Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU) con una excitación máxima de 488 nm y una emisión máxima de 580 nm se disolvió en agua destilada a 1 g/L. Este agente de tinción se empleó para teñir proteínas y almidón. El Nile red (Fluka, Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU) con una excitación máxima de 488 nm y una emisión máxima de 515 nm se disolvió en PEG 200 a 0.1 g/L. Este agente de tinción se empleó para teñir grasas.



**Figura III.5.** Microscopio confocal de barrido Nikon C1 acoplado a un microscopio Nikon Eclipse E800.

Con el objetivo de asegurar un suficiente grosor de muestra para poder observarla sin deformar la estructura nativa al colocar el cubreobjetos, se emplearon dos cuchillas de acero inoxidable y 100  $\mu\text{m}$  de grosor que se pegaron al portaobjetos (Pateras et al. 1994). Se utilizó un objetivo Nikon de 60x/1.40NA/Oil/ Plan Apo VC.

Para visualizar la muestra, una gota de la misma se puso en el portaobjetos y se tiñó con 20  $\mu\text{L}$  de la disolución de rodamina B y 20  $\mu\text{L}$  de la disolución de Nile red. Se obtuvieron pilas de imágenes al escanear automáticamente 20  $\mu\text{m}$  en profundidad a través de la muestra. La separación entre los planos de observación se mantuvo a 0.4  $\mu\text{m}$ . Se observaron un total de 51 planos adyacentes que se almacenaron como imágenes RGB compuestas por 3 canales (rojo, verde y azul) de 8 bits cada uno con una resolución de 1024X1024 píxeles mediante el

### *Materiales y métodos*

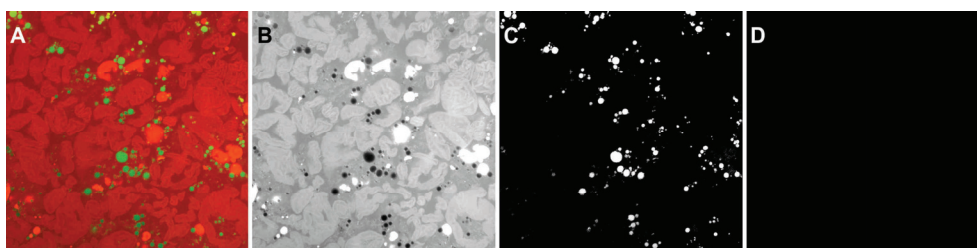
programa EZ-C1 v.3.40 (Nikon, Tokyo, Japan). Las imágenes en 2D se adquirieron de manera aleatoria y se almacenaron con la misma resolución.

### III.9.3. PROCESADO Y ANÁLISIS DE IMAGEN

El procesado y el análisis de las imágenes asistido por ordenador se llevaron a cabo empleando los programas informáticos AnalySYS 3.0 (AnalySYS, Münster, Alemania) e Image J 1.46e (National Institutes of Health Bethesda, Md., EEUU.). No obstante, para la mayor parte del trabajo experimental se empleó el último de ellos debido a su versatilidad, facilidad de uso y gratuidad. Este programa de dominio público, contiene numerosos complementos (plugins) que consisten en una serie de procedimientos programados para realizar funciones específicas que facilitan la tarea de procesado y análisis de imagen.

#### III.9.3.1. OPERACIONES SOBRE LA IMAGEN EN ESCALA DE GRISES

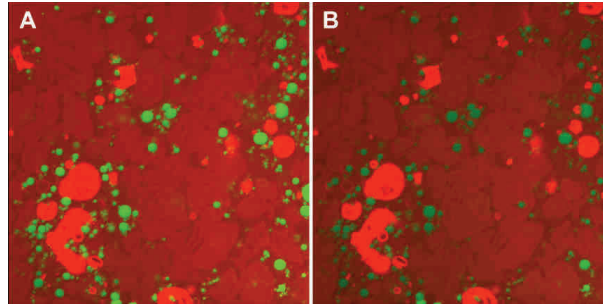
En las imágenes de CLSM donde se han combinado en una misma imagen RGB las emisiones correspondientes a diferentes longitudes de onda, se realizó un paso previo de separación de los canales para conseguir un mejor contraste de los objetos que provienen únicamente de uno de ellos. En la figura III.6 se observa una imagen de CLSM que presenta los 3 canales juntos. La separación de los canales permite una mejor visualización de los glóbulos de grasa por un lado (canal verde) y de la matriz de almidón y proteína por otro (canal rojo) mientras que el canal azul no presenta ningún tipo de información puesto que no se captó emisión en la longitud de onda correspondiente al mismo.



**Figura III.6.** A: micrografía CLSM de una muestra de salsa mostrando los canales RGB (rojo, verde y azul) combinados; B: separación del canal rojo; C: separación del canal verde; D: separación del canal azul.

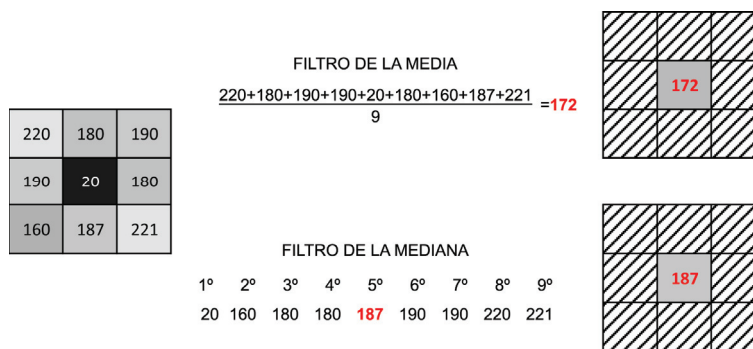
### Eliminación del ruido de fondo

En la CLSM, los agentes de tinción fluorescentes (especialmente el Nile red) manifestaron el proceso de “photobleaching” o decaimiento de la intensidad de luz (Heilig et al. 2009; Herbert et al. 1999) con el tiempo de exposición al láser (figura III.7). Para limitar este efecto se utilizaron velocidades de barrido superiores. Sin embargo, al aumentar la velocidad se hizo perceptible el ruido eléctrico de fondo.



**Figura III.7.** “Photobleaching” o decaimiento de la intensidad de señal en micrografías de salsas captadas mediante CLSM. A: micrografía tomada a tiempo = 0; B: mismo campo tras 5 s de barrido láser. Nótese como la intensidad del fluoróforo que marca los glóbulos de grasa (en verde) resulta fuertemente afectada.

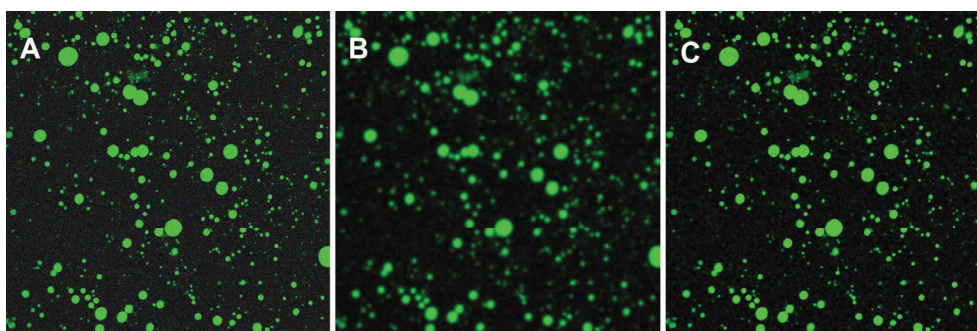
Este ruido se puede eliminar parcialmente aplicando filtros. Los filtros se basan en la aplicación de operaciones aritméticas que producen cambios en la intensidad de cada píxel, en función del valor de los píxeles adyacentes. Dos de los filtros más empleados son el de la media y el de la mediana (figura III.8).



**Figura III.8.** Cálculo del valor del píxel central al aplicar un filtro de la media y de la mediana sobre los 9 píxeles adyacentes (filtro 3x3).

### *Materiales y métodos*

El filtro de la media se basa en calcular el valor de cada píxel como la media del valor de los píxeles vecinos, incluyendo el valor de sí mismo. Con este proceso se lograba suprimir diferencias bruscas de intensidad en la imagen, tomando ésta un aspecto más homogéneo debido a que el valor absoluto de la diferencia entre un píxel y cualquiera que le rodea habrá disminuido. No obstante, el uso de este filtro conllevaba un desenfoque de los bordes de los glóbulos de grasa. El filtro de la mediana, por su parte, calcula el valor del nuevo píxel, ordenando el valor de los píxeles vecinos de menor a mayor y seleccionando el valor que ocupa la posición central de la lista. Este filtro difuminó menos los contornos de los glóbulos de grasa como se puede observar en la figura III.9.

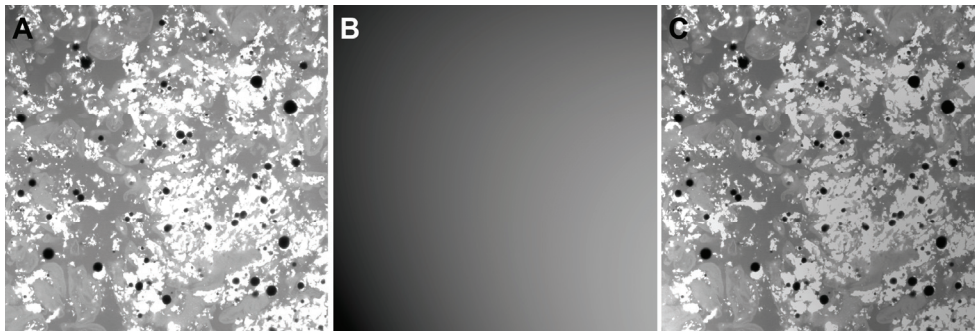


**Figura III.9.** Aplicación de diversos filtros sobre el ruido de fondo de una imagen de CLSM. A: imagen original; B: filtro de la media 3x3; C: filtro de la mediana 3x3.

### **Corrección de la iluminación no uniforme**

Los problemas de iluminación no uniforme se suelen encontrar en los contornos de la imagen debido a efectos de las propias lentes de los microscopios, superficies curvadas o variaciones de espesor de las muestras o incluso leves desviaciones en la alineación del láser. *ImageJ* contiene un complemento (*posteriori shading correction*) que permitió generar el patrón de iluminación de cada imagen, que se empleó para generar una nueva con la iluminación más uniforme (figura III.10).

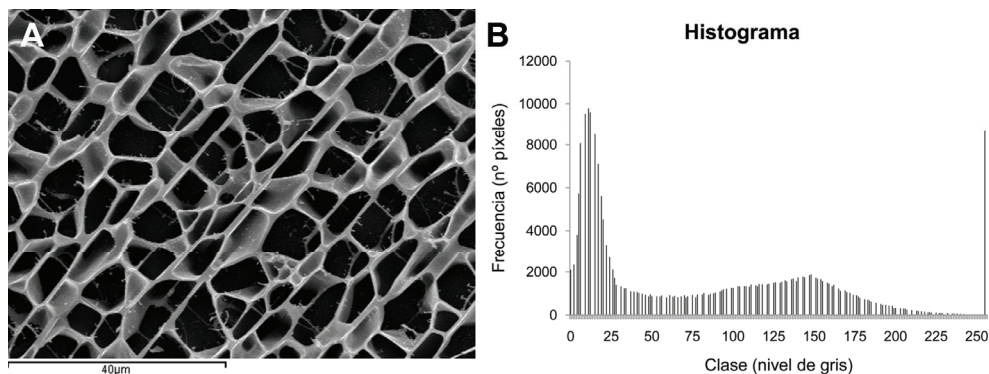




**Figura III.10.** Corrección de la iluminación mediante el complemento *posteriori shading correction*. A: imagen original. Nótese que el borde inferior derecho está más iluminado que el superior izquierdo; B: patrón de iluminación generado por el complemento. C: imagen corregida.

### Manipulación del histograma de nivel de gris

Con el objetivo de mejorar el contraste entre los objetos de interés y el fondo, se realizaron una serie de operaciones sobre el histograma de nivel de gris que permitieron obtener una nueva imagen en la que los valores de los píxeles generados sólo dependían del valor de esos mismos píxeles en la imagen original. El histograma agrupa al número de píxeles (frecuencia) que muestran un determinado nivel de gris en diferentes clases correspondientes a cada nivel (figura III.11). Dentro de este tipo de operaciones se encuentran la *normalización*, *ecualización* y la *inversión*.

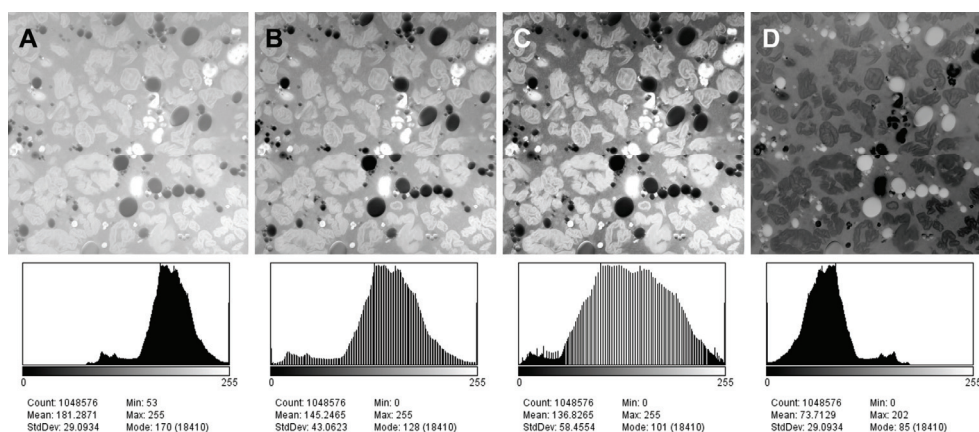


**Figura III.11.** Micrografía obtenida por cryo-SEM y su correspondiente histograma de nivel de gris.

La *normalización* consiste en el estiramiento máximo del histograma, es decir, se traslada el valor de la frecuencia de la clase más baja y la más alta

### Material es y métodos

representada en la imagen original a la clase correspondiente al nivel de gris 0 y 255 respectivamente. Las clases intermedias se trasladan a nuevas clases hasta ocupar toda la extensión del histograma. De esta manera aumenta el contraste y se facilita la detección de objetos. La *ecualización*, por su parte también estira al máximo el histograma pero se reparten los píxeles de manera que cada clase tenga frecuencias similares. Finalmente, la *inversión* consiste en cambiar los valores de nivel de gris de los píxeles de tal forma que aquellos que tenían valores de nivel de gris más elevados pasan a tener los más bajos. De este modo, se permite visualizar mejor los objetos de las imágenes. Tras procesar diferentes micrografías, se seleccionó la *normalización* como proceso más adecuado para mejorar el contraste, como se puede observar en la figura III.12.



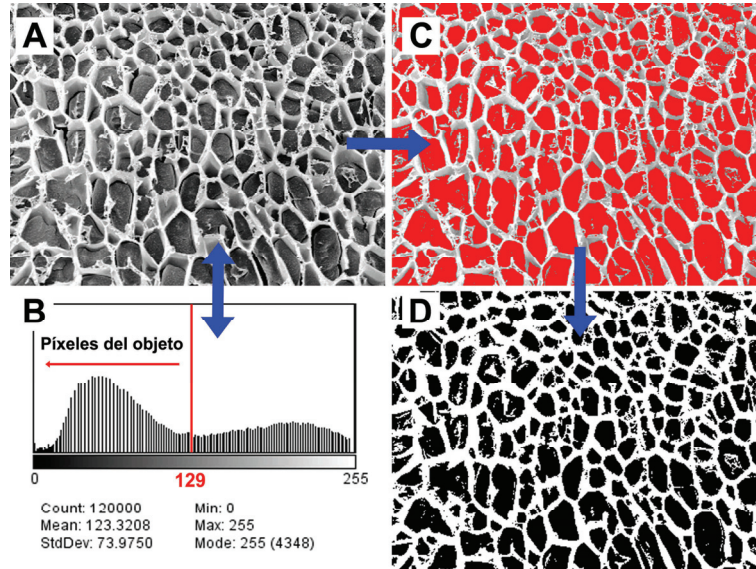
**Figura III.12.** Efecto de diversas manipulaciones del histograma de nivel gris sobre el contraste de la imagen de CLSM. A: imagen original y su correspondiente histograma; B: imagen tras la normalización; C: imagen tras la ecualización; D: imagen tras la inversión.

#### III.9.3.2. SEGMENTACIÓN

Una vez minimizados los errores de las imágenes digitales adquiridas, se separaron objetos de interés del resto de la imagen mediante el proceso el de "thresholding" o *segmentación por umbrales*, basándose en el análisis del histograma de nivel de gris. Esta operación selecciona un nivel de gris que representa el límite entre objeto y fondo, todas las clases por debajo de ese nivel pertenecerán al objeto mientras que las clases por encima de ese nivel pertenecerán al fondo. De este modo, de los 256 niveles de gris diferentes que



podían definir un píxel en una imagen de 8 bits, se pasa a dos únicos valores 0 (negro) o 255 (blanco), obteniéndose la imagen binaria correspondiente (figura III.13).



**Figura III.13.** Segmentación de una micrografía de cryo-SEM. A: imagen procesada y lista para la segmentación; B: histograma de grises de la imagen, nótese la distribución bimodal; C: segmentación de la imagen eligiendo el valor mínimo situado en el valle entre los dos picos de la distribución (nivel de gris = 129); D: imagen binarizada. Todos los píxeles que presentaban niveles de gris por debajo de 129 pasan a ser negros (valor 0), mientras que los píxeles que presentaban valores superiores a 129 pasan a ser blancos (valor 1).

### III.9.3.3. OPERACIONES SOBRE IMÁGENES BINARIAS

La imagen obtenida tras el proceso de separación por umbrales solía contener diversos errores, como ruido de fondo no eliminado o zonas de iluminación irregular que eran consideradas como objetos. Para solucionar estos problemas se emplearon una serie de operaciones específicas para imágenes binarias, como la *erosión*, *dilatación*, *apertura*, *cierre* y *mapa de distancias euclídeas* y *separación de objetos*.

En ocasiones, durante el proceso de segmentación, se puede sobreestimar o infravalorar el tamaño de los objetos. La *erosión* consiste en adelgazar el objeto eliminando una capa de píxeles pertenecientes al objeto en el contorno que

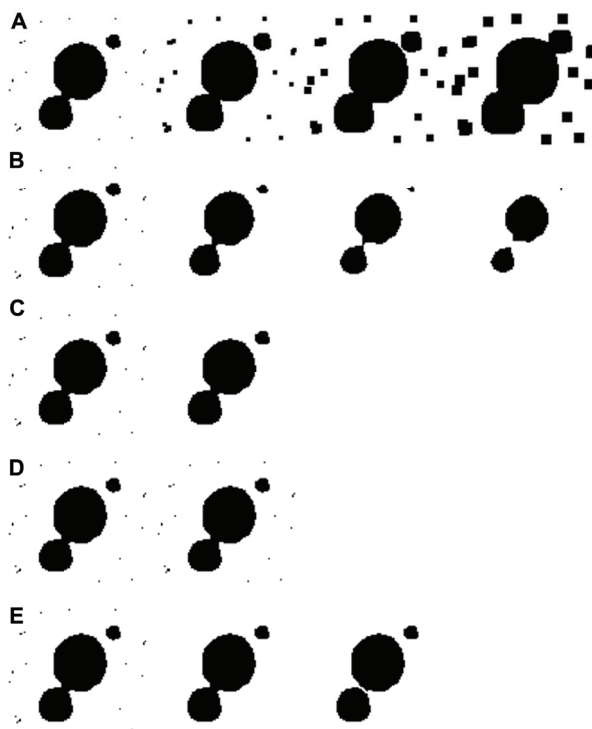
### *Materiales y métodos*

delimita el objeto con el fondo. La *dilatación* opera de manera contraria y añade una capa de píxeles alrededor del objeto. Ambas operaciones se basan en el estudio de los píxeles que rodean al píxel en cuestión. Estas operaciones se pueden realizar iterativamente hasta conseguir el resultado deseado. No obstante, puesto que son operaciones que modifican la cantidad de píxeles del objeto, pueden afectar al análisis cuantitativo posterior.

Para solucionar este problema se utilizaron las dos operaciones anteriores consecutivamente. El orden en que se ejecuten ambas operaciones da resultados completamente diferentes. La operación de *apertura* combina una *erosión* y una *dilatación* posterior y se utiliza para separar objetos que en la imagen original permanecían unidos. El proceso inverso se denomina *cierre (dilatación-erosión)* y como resultado, objetos que antes estaban separados se unen. Estas operaciones combinadas tienen la ventaja de mantener el área del objeto aproximadamente igual.

Uno de los problemas de las operaciones de apertura y cierre es que la modificación que hacen en los objetos no es isotrópica, es decir, la variación en la forma del objeto no es igual en todas las direcciones del mismo (Russ 2005), lo que no las hace recomendables para separar objetos que estén unidos por muchos píxeles. Sin embargo, existe otro método que limita este problema. El *mapa de distancias euclideas* (MDE) asigna a cada píxel del objeto un número proporcional a la distancia de ese píxel al píxel más cercano perteneciente al fondo de la imagen, sin tener en cuenta la dirección. De esta forma se construye una imagen en niveles de gris decrecientes desde el centro del objeto al extremo del mismo. A continuación se segmenta la nueva imagen creada y el efecto de aumentar un nivel de gris es el mismo que el de erosionar o dilatar el objeto pero sin el problema del cambio de forma. Este es el principio que utiliza el proceso denominado "watershed" o *separador de objetos*, eliminando la última línea de píxeles que tienen en común. En la figura III.14 se observa el efecto de todos estos operadores en la eliminación de ruido, separación o unión de objetos. El método más efectivo en el tipo de muestras que han sido analizadas fue el de realizar una operación de apertura seguida de una de separación de objetos. Como se puede observar siguiendo esta rutina se realizaron menos pasos

consiguiendo además que la morfología y el tamaño de los objetos variaran mínimamente.



**Figura III.14.** Diversos procedimientos de tratamiento de una imagen binaria. A: 3 dilataciones sucesivas; B: 3 erosiones sucesivas; C: apertura; D: cierre; E: combinación de apertura y “watershed” o *separador de objetos*. Nótese que con este último procedimiento se elimina el ruido de fondo y se consigue separar los objetos en dos pasos.

#### III.9.3.4. ANÁLISIS DE IMAGEN

El tamaño de las celdas creadas tras la sublimación de las muestras en los sistemas modelo analizados por cryo-SEM (sección IV.1) se determinó a partir del análisis de 20 imágenes adquiridas de manera aleatoria en cada tipo de muestra.

La cuantificación del tamaño y forma de los glóbulos de grasa de las salsas recién preparadas, recalentadas en HMO (sección IV.2) o descongeladas por HCO u HMO (sección IV.3) fueron evaluados a partir de 15 imágenes de CLSM adquiridas aleatoriamente en cada tipo de muestra. El análisis del tamaño, forma y número de glóbulos por campo de las muestras elaboradas a diferente velocidad

### *Materiales y métodos*

de agitación y con diferente tipo de grasa (sección IV.4) se realizó a partir de 4 imágenes representativas de cada tipo de muestra. Puesto que el área de los glóbulos de grasa no presentó una distribución normal en ninguna de las muestras analizadas, se utilizó el percentil 80 ( $P_{80}$ ) del *área* de los glóbulos de grasa como parámetro representativo del tamaño de los glóbulos en las salsas. El  $P_{80}$  indica el valor del *área* por debajo del cual se encuentra el 80% de los glóbulos en cada imagen.

La medida del *área* de los objetos se basó en la cuantificación de los píxeles que pertenecían al objeto multiplicado este valor por el área de cada píxel. Para calibrar el área del píxel se adquirieron imágenes para cada una de las diversas condiciones de captura que se han llevado a cabo (tipo de microscopio y resoluciones empleadas) con una escala integrada que se empleó para calcular el tamaño del píxel en  $\mu\text{m}^2$ . Asimismo, se determinó la densidad de glóbulos de grasa por campo ( $dg$ ), como el número de glóbulos de grasa micrografía. Por último, la forma de los objetos se evaluó empleando el parámetro *circularidad* (Ec.III.5). Un valor de *circularidad* de 1.0 corresponde a un círculo perfecto. Conforme este valor se aproxima a 0 el objeto adquiere una forma cada vez más elongada.

$$Circularidad = \frac{4 \cdot \pi \cdot \text{área}}{(\text{perímetro})^2} \quad (\text{Ec.III.5})$$

Al analizar la imagen binaria, el programa permite la creación de una imagen complementaria donde aparecen numerados cada uno de los objetos. Lo que facilita la identificación de los mismos en la tabla de datos que se genera automáticamente (figura III.15).

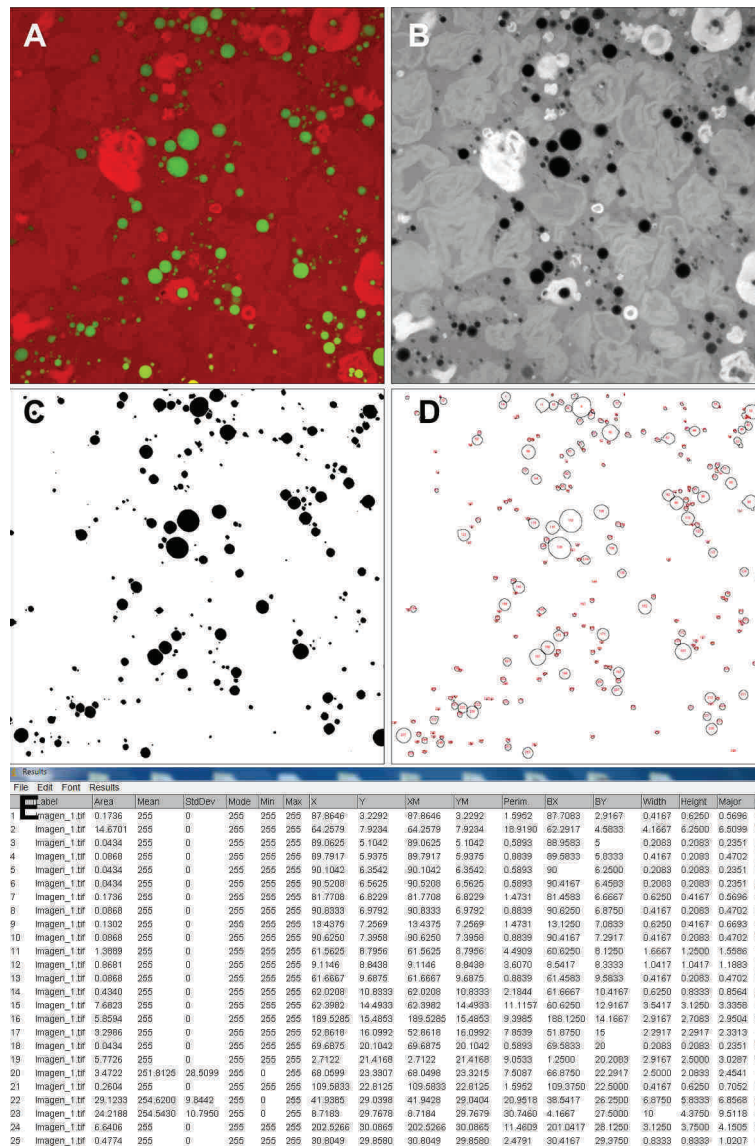
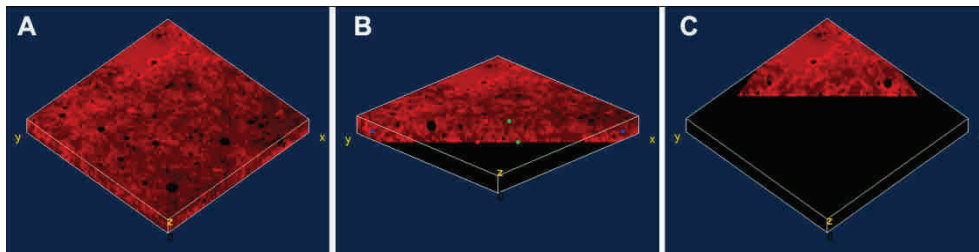


Figura III.15. Proceso de análisis de una imagen de CLSM. A: imagen original. B: separación de canales y mejora de la imagen en escala de grises. C: imagen binaria tras la segmentación y operaciones de mejora; D: imagen con los objetos numerados para su identificación en la tabla de datos; E: tabla de datos generada.

La estructura 3D de las muestras recalentadas en HMO (sección IV.2) fue analizada a partir de una pila de imágenes de CLSM obtenidas en un mismo campo pero a diferentes profundidades. El montaje se lleva a cabo mediante un complemento de *ImageJ* que es capaz de integrar las imágenes de la pila teniendo

### Materiales y métodos

en cuenta la distancia entre los planos de adquisición (eje z). Se analizaron muestras con 20  $\mu\text{m}$  de espesor utilizando 51 micrografías de 1024x1024 píxeles de resolución. Por tanto, cada plano estaba situado a 0.4  $\mu\text{m}$  del anterior. Tras el escalado de las imágenes se determinó que cada píxel tenía unas dimensiones de 0.21  $\mu\text{m}$  de alto y 0.21  $\mu\text{m}$  de largo. Por lo tanto, el tamaño del vóxel (píxel tridimensional) fue de 0.21x0.21x0.4  $\mu\text{m}^3$ . Las reconstrucciones en 3D se observaron a diferentes niveles y con diferentes ángulos de visión (figura III.16).



**Figura III.16.** Diferentes visualizaciones en 3D de la microestructura de una salsa preparada con almidón nativo. A: Ángulo de rotación de 135° con respecto al eje x y 45° con respecto al eje z. B: misma muestra vista desde un ángulo de 110° con respecto al eje x y 45° con respecto al eje z, visualización de un corte transversal. C: mismo ángulo que en A con visualización de un corte transversal.

## III.10. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el estudio de las propiedades dieléctricas, microestructurales y reológicas de sistemas modelo con diferentes hidrocoloides (sección IV.1) se empleó un modelo estadístico de superficie de respuesta compuesto central, rotatable y ortogonal. Mediante esta metodología es posible optimizar una variable de interés, analizando cómo afectan los niveles de los factores del proceso en la misma. En este estudio los factores fueron la cantidad de sal e hidrocoloide, mientras que las variables respuesta estudiadas fueron el parámetro reológico  $k$  y las propiedades dieléctricas  $\epsilon'$ ,  $\epsilon''$  y  $d$ . El diseño compuesto central consiste en un diseño factorial  $2^k$  (siendo  $k$  el número de factores), aumentado por  $2^k$  puntos axiales y  $n_c$  puntos centrales. El diseño se convierte en rotatable mediante la elección de la distancia axial  $\alpha$  (Ec.III.6).

$$\alpha = (n_f)^{1/4} \quad (\text{Ec.III.6})$$

Donde  $n_f$  es el número de puntos en la porción factorial del diseño.

Puesto que se han considerado dos factores la porción factorial  $n_f = 2^2 = 4$  puntos. Por tanto, la distancia axial del diseño es  $\alpha = (4)^{1/4} = 1.414$ . En total se tiene 4 puntos factoriales y 4 puntos axiales. Además, se incluyeron 8 puntos centrales ( $n_c$ ) para garantizar la ortogonalidad del diseño. En total 16 puntos experimentales en cada uno de los sistemas modelo a analizar. Los extremos de los niveles se seleccionaron a partir de determinaciones de viscosidad en experimentos previos.

En el estudio del efecto de la velocidad de agitación, el método de descongelación y el tipo de grasa empleada sobre la microestructura de las salsas (sección IV.4), se empleó un diseño de experimentos multifactorial categórico con dos factores a distintos niveles: tipo de grasa (mantequilla y aceites de oliva, girasol y soja) y velocidad (350, 1100 y 3250 rpm).

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en todas las determinaciones se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Se calcularon las diferencias mínimas significativas (LSD) con un nivel de significación  $P < 0.05$ . Para ello se empleó el programa estadístico Statgraphics Plus versión 5.1 (Manugistics, Inc., Rockville, MA, EE.UU).





## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## IV.1. PROPIEDADES DIELECTRICAS, MICROESTRUCTURALES Y DE FLUJO DE SISTEMAS MODELO ELABORADOS CON DISTINTOS HIDROCOLOIDES Y SAL

En la siguiente sección se estudiaron las propiedades dieléctricas de sistemas elaborados con sal y diferentes hidrocoloides: almidones de maíz —nativo (AN) y fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento (AHAF)— e hidrocoloides —iota ( $\iota$ -C), lambda ( $\lambda$ -C), y kappa ( $\kappa$ -C) carragenatos— como modelos de salsas blancas que vayan a ser sometidas a calentamiento en microondas. Asimismo, se analizaron las propiedades microestructurales y reológicas para comprender mejor el comportamiento dieléctrico de los diferentes sistemas.

### IV.1.1. PROPIEDADES DIELECTRICAS

El factor de pérdidas ( $\epsilon''$ ) y la profundidad de penetración ( $d$ ) de las microondas fueron analizados al considerarse los parámetros más importantes para caracterizar el calentamiento en MO de los sistemas modelo;  $\epsilon''$  relaciona la conversión de la energía electromagnética en energía térmica y en consecuencia evalúa la capacidad de generar calor, y  $d$  es la distancia a la cual la energía de la microonda disminuye aproximadamente a un 37% de su valor en la superficie.

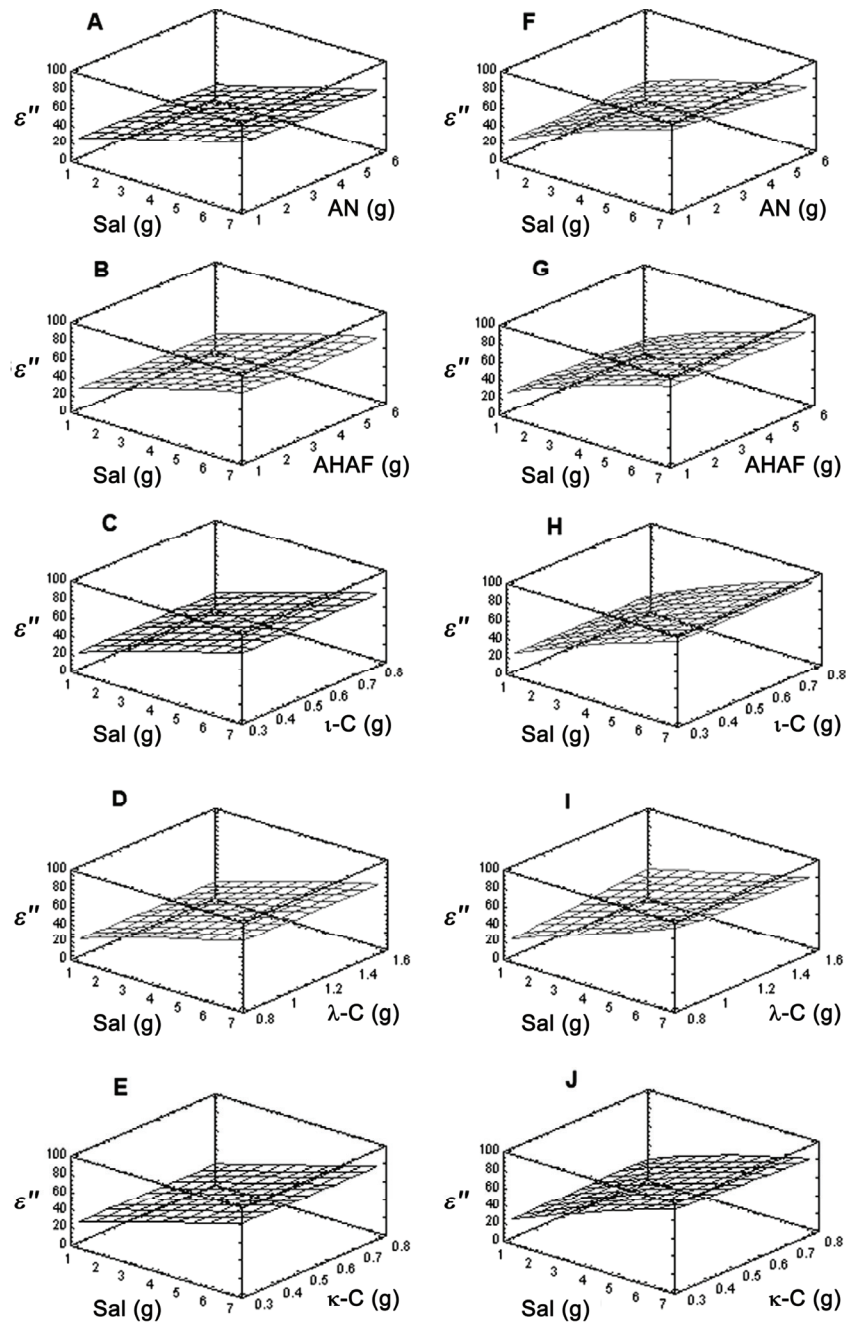
#### IV.1.1.1. FACTOR DE PÉRDIDAS

La figura IV.1 muestra los gráficos de las superficies de respuesta del factor de pérdidas ( $\epsilon''$ ) a temperatura de 20 y 40 °C para los diferentes sistemas con hidrocoloides. Asimismo, en la tabla IV.1, se describen las ecuaciones de predicción correspondientes para el  $\epsilon''$  en función del contenido de sal e hidrocoloide a las dos temperaturas analizadas. Como era de esperar, el factor de pérdidas se vio influenciado de manera significativa y positiva por la cantidad de sal en todos los sistemas modelo analizados. Se sabe que la adición de sal a sistemas alimentarios con un elevado contenido en agua provoca un incremento en  $\epsilon''$ . Bircan y Barringer (1998) observaron que la adición de sal al agua

### *Resultados y discusión*

provocaba un aumento del factor de pérdidas por encima del correspondiente al agua pura. Piyasena et al. (2003) observaron un aumento significativo del factor de pérdidas cuando se aumentaba la concentración de sal en disoluciones de almidón de maíz, a distintas frecuencias y temperaturas, y atribuyeron este hecho a la elevada conductividad asociada al aumentar la concentración de sal. Sakai et al. (2005) también observaron un aumento en el factor de pérdidas al aumentar la concentración de sal en agua y en geles de agar al 1%.

Con respecto a la influencia de la temperatura los valores de  $\epsilon''$  a 40 °C son significativamente superiores ( $P < 0.05$ ) con respecto a 20 °C para todos los sistemas modelo. Umbach et al. (1992) observaron, en diferentes disoluciones de almidón, que el calentamiento causaba un aumento en  $\epsilon''$ . Piyasena et al. (2003) obtuvieron resultados superiores de  $\epsilon''$  para disoluciones de almidón de maíz cuando la temperatura aumentaba de 20 a 80 °C a una frecuencia de 10 MHz. En disoluciones de almidón de patata, trigo, maíz y maíz céreo a 2.75 Hz (Ryynänen et al. 1996) y de almidón de trigo, tapioca, arroz, maíz, maíz céreo y maíz de alto contenido en amilosa a 2.45 Hz (Ndife et al. 1998) se observó que cuando el almidón estaba ya gelatinizado, como sucede en los sistemas modelo del presente estudio, la movilidad del agua aumentaba con la temperatura y el calentamiento provocaba un ligero aumento en  $\epsilon''$ . Nelson et al. (1991) también observaron que el  $\epsilon''$  de diferentes hidrocoloides en polvo (almidón de patata, goma garrofín, goma arábica, carragenato y carboximetilcelulosa) aumentaba con la temperatura en el intervalo desde 20 °C a 100 °C.



**Figura IV.1.** Gráficos de superficie de respuesta de la variable factor de pérdidas ( $\epsilon''$ ) en relación con la cantidad de sal e hidrocoloide. A y F: sistema con AN; B y G: sistema con AHAF; C y H: sistema con  $\iota$ -C; D e I: sistema con  $\lambda$ -C; E y J: sistema con  $\kappa$ -C. AN: almidón nativo; AHAF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento;  $\iota$ -C:  $\iota$ -carragenato;  $\lambda$ -C:  $\lambda$ -carragenato;  $\kappa$ -C:  $\kappa$ -carragenato. Las medidas se realizaron a 20 °C (A, B, C, D, E) y a 40 °C (F, G, H, I, J).

**Tabla IV.1.** Ecuaciones de predicción para el factor de pérdidas ( $\epsilon''$ ) a 2.45 GHz y 20 °C o 40 °C.

Temperatura	Hidrocoloide	Ecuación	$r^2$	Límites de las variables	
				a (g/100 g agua)	b (g/100 g agua)
20 °C	AN	$\epsilon'' = 16.9557 + 10.6399 a - 1.2767 b - 0.3324 a^2$	0.99	1-7	1-6
	AHAF	$\epsilon'' = 21.509 + 9.9005 a - 3.2381 b - 0.2244 a^2 + 0.3357 b^2$	0.99	1-7	1-6
	t-C	$\epsilon'' = 12.3009 + 10.4488 a - 0.2061 a^2$	0.99	1-7	0.3-0.8
	$\lambda$ -C	$\epsilon'' = 15.0082 + 10.1083 a - 0.2008 a^2$	0.99	1-7	0.8-1.5
	$\kappa$ -C	$\epsilon'' = 18.18779 + 18.6080 a$	0.98	1-7	0.3-0.8
40 °C	AN	$\epsilon'' = 9.8339 + 14.9472 a + 0.6943 b - 0.4182 a^2 - 0.6296 ab$	0.99	1-7	1-6
	AHAF	$\epsilon'' = 14.7939 + 13.6262 a - 1.2027 b - 0.4495 a^2$	0.98	1-7	1-6
	t-C	$\epsilon'' = 10.3545 + 14.1741 a - 0.3711 a^2$	0.99	1-7	0.3-0.8
	$\lambda$ -C	$\epsilon'' = -3.14668 + 14.1055 a$	0.97	1-7	0.8-1.5
	$\kappa$ -C	$\epsilon'' = 19.4181 + 9.8746 a$	0.97	1-7	0.3-0.8

Los parámetros que no son significativos no han sido incluidos en la ecuación.

AN: almidón nativo; AHAF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento; t-C: t-carragenato;  $\lambda$ -C:  $\lambda$ -carragenato; a: sal; b: hidrocoloide.

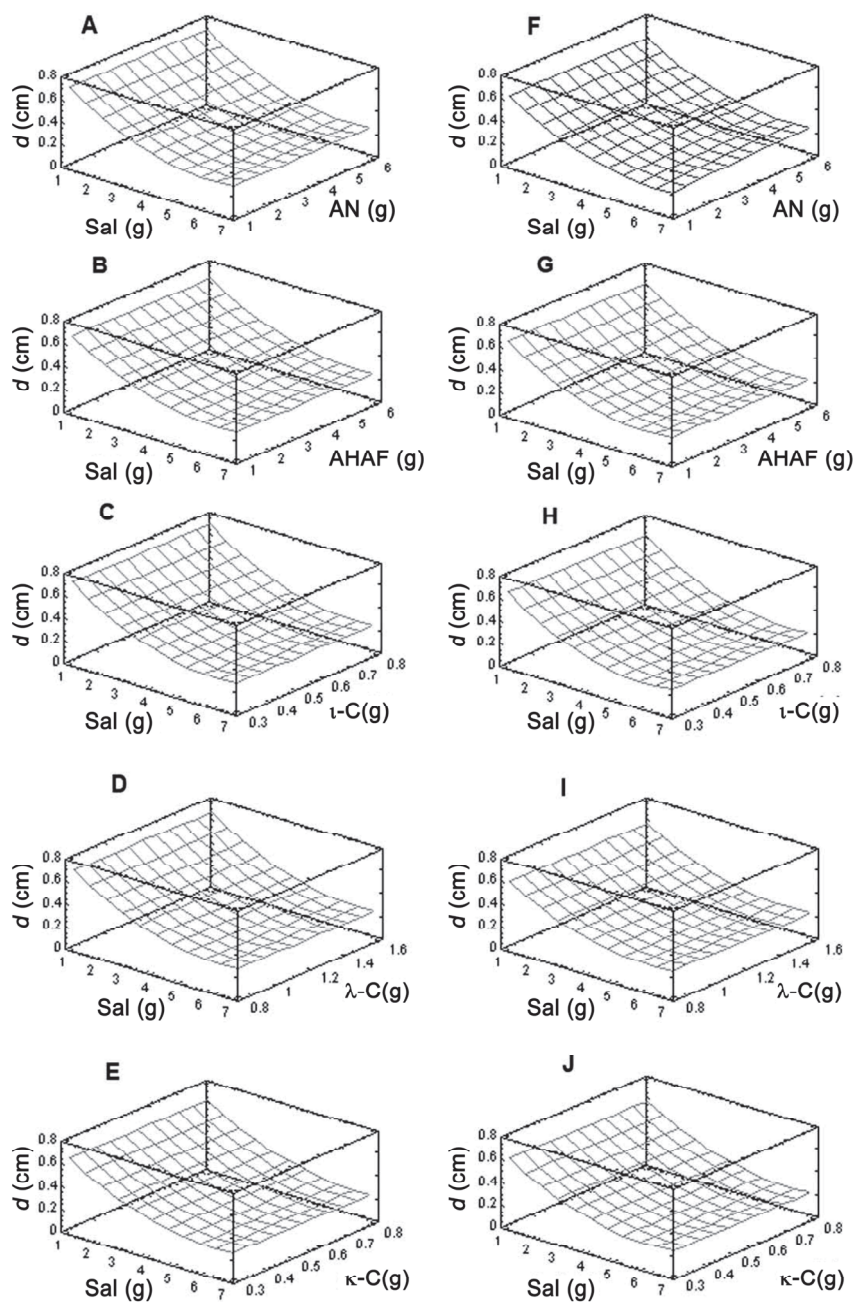
El efecto del nivel de hidrocoloide empleado difería según el sistema modelo. Así, un aumento en la cantidad de almidón nativo (AN) y modificado (AHAF) disminuía significativamente ( $P < 0.05$ ) el valor de  $\varepsilon''$ . El aumento de almidón en el sistema provocó una mayor retención de agua por las cadenas poliméricas y la variación en la cantidad de agua libre en el mismo afectó a sus propiedades dieléctricas. Sin embargo, en los sistemas con carragenatos ( $\iota$ ,  $\lambda$ , o  $\kappa$ ) no se observó un efecto significativo ( $P > 0.05$ ) de la concentración del hidrocoloide, pese a que éstos también poseen una capacidad de retención de agua elevada, por lo que las diferencias en el comportamiento dieléctrico pueden ser debidas a la carga del polímero y a la configuración de la red que forman.

#### IV.1.1.2. PROFUNDIDAD DE PENETRACIÓN.

La figura IV.2 muestra los gráficos de superficie de respuesta de la profundidad de penetración ( $d$ ) a 20 °C y a 40 °C para los diferentes sistemas. Los valores de  $d$  eran significativamente inferiores ( $P < 0.05$ ) cuando existían altas cantidades de sal en el sistema. Este resultado no es sorprendente ya que la profundidad de penetración está inversamente relacionada con el  $\varepsilon''$  y éste aumenta conforme lo hace la cantidad de sal (Ec.III.1). Piyasena et al. (2003) también observaron una disminución de  $d$  con el aumento de la sal en disoluciones de almidón de maíz.

Las ecuaciones de predicción de  $d$  a 20 °C y 40 °C se muestran en la tabla IV.2. En general, estas ecuaciones no muestran una asociación entre la cantidad de hidrocoloide y la profundidad de penetración. Sin embargo los valores de  $d$  fueron significativamente inferiores ( $P < 0.05$ ) a altas temperaturas en todos los sistemas modelo.

Resultados y discusión



**Figura IV.2.** Gráficos de superficie de respuesta de la variable profundidad de penetración ( $d$ ) en relación con la cantidad de sal e hidrocoloide. A y F: sistema con AN; B y G: sistema con AHAF; C y H: sistema con  $\iota$ -C; D e I: sistema con  $\lambda$ -C; E y J: sistema con  $\kappa$ -C. AN: almidón nativo; AHAF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento;  $\iota$ -C:  $\iota$ -carragenato;  $\lambda$ -C:  $\lambda$ -carragenato;  $\kappa$ -C:  $\kappa$ -carragenato. Las medidas se realizaron a 20 °C (A, B, C, D, E) y a 40 °C (F, G, H, I, J).



Tabla IV.2. Ecuaciones de predicción para la profundidad de penetración ( $d$ ) a 2.45 GHz y 20 °C o 40 °C.

Temperatura	Hidrocoloide	Ecuación	$r^2$	Límites de las variables	
				$a$ (g/100 g agua)	$b$ (g/100 g agua)
20 °C	AN	$d = 0.9040 - 0.2083 a + 0.0167 a^2$	0.96	1-7	1-6
	AHAF	$d = 0.8377 - 0.1834 a + 0.0143 a^2$	0.96	1-7	1-6
	t-C	$d = 0.9205 - 0.2146 a + 0.017 a^2$	0.97	1-7	0.3-0.8
	$\lambda$ -C	$d = 0.8797 - 0.1981 a + 0.0155 a^2$	0.97	1-7	0.8-1.6
	$\kappa$ -C	$d = 0.8105 - 0.1782 a + 0.0139 a^2$	0.97	1-7	0.3-0.8
40 °C	AN	$d = 0.7726 - 0.1815 a + 0.0061 b + 0.0144 a^2$	0.98	1-7	1-6
	AHAF	$d = 0.8384 - 0.2036 a + 0.0167 a^2$	0.96	1-7	1-6
	t-C	$d = 0.8503 - 0.2138 a + 0.0177 a^2$	0.95	1-7	0.3-0.8
	$\lambda$ -C	$d = 0.7546 - 0.1707 a + 0.0138 a^2$	0.90	1-7	0.8-1.6
	$\kappa$ -C	$d = 0.7716 - 0.1788 a + 0.0144 a^2$	0.97	1-7	0.3-0.8

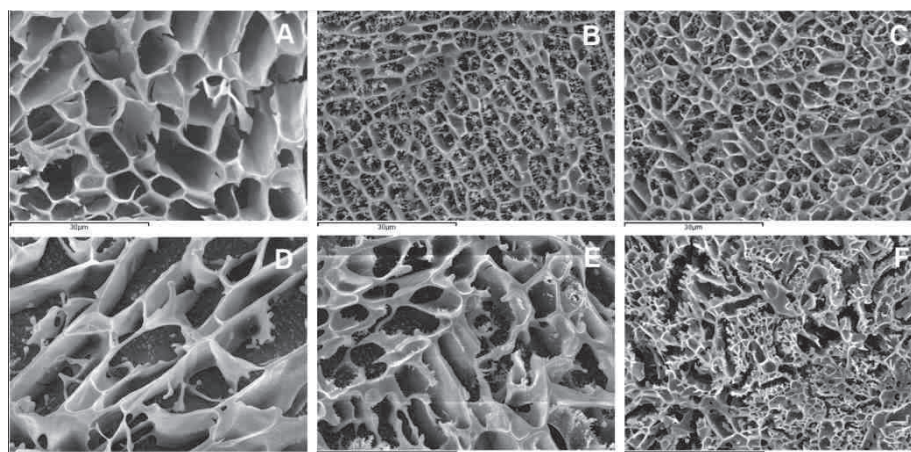
Los parámetros que no son significativos no han sido incluidos en la ecuación.

AN: almidón nativo; AHAF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento; t-C: t-carragenato;  $\lambda$ -C:  $\lambda$ -carragenato;  $\kappa$ -C:  $\kappa$ -carragenato; a: sal; b: hidrocoloide.

#### IV.1.2. MICROESTRUCTURA

La técnica de cryo-SEM se basa en la fijación física de los componentes estructurales de la muestra, lo que evita un paso de deshidratación en la preparación de la misma. Esto permite observar el agua de composición de la muestra y las interacciones entre el agua y los distintos componentes estructurales.

La figura IV.3 presenta la estructura de muestras elaboradas con distintas cantidades de almidón nativo o modificado y la misma cantidad de sal (4 g). En todas las micrografías se puede observar una matriz de celdas formada tras la sublimación de la escarcha superficial; este fenómeno es un artefacto inherente a la técnica de cryo-SEM y se conoce como artefacto eutéctico o fenómeno de agregación de solutos (Llorca et al. 2005). El tamaño de celdas está relacionado con la interacción entre los componentes del sistema y el agua: a mayor tamaño de celda, menor interacción agua-componente y mayor cantidad de agua libre disponible en el sistema.

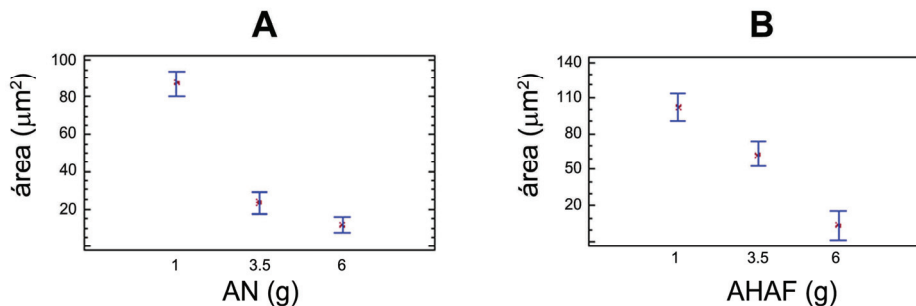


**Figura IV.3.** Micrografías de cryo-SEM. A, B y C: sistema elaborado con 4 g de sal y 1 (A), 3.5 (B) y 6 (C) g de almidón nativo (AN). D, E y F: sistema elaborado con 4 g de sal y 1 (D), 3.5 (E) y 6 (F) g de fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento (AHAF). Escala: 30  $\mu\text{m}$ .

En la figura IV.3 se puede apreciar que al aumentar la cantidad de almidón, la matriz de celdas formada durante la sublimación de la muestra es más cerrada.

Las celdas en la figura IV.3 A (muestras preparadas con 1 g de AN) son mayores que las celdas en la figura IV.3 B (preparadas con 3.5 g de almidón) que, a su vez, son más grandes que las de la figura IV.3 C (6 g de almidón). Lo mismo sucede en las muestras elaboradas con AHAF (figura IV.3 D-F).

Con el objetivo de cuantificar el tamaño de celdas de las micrografías de la figura IV.3 se realizó un análisis de imagen en el que se midieron las correspondientes áreas. La figura IV.4 muestra los gráficos de medias con los intervalos LSD de las muestras elaboradas con ambos almidones. Se puede comprobar que al aumentar la cantidad de AN se produce una disminución del área de celda, que resulta significativa ( $P < 0.05$ ) al comparar las muestras preparadas con 6 g con respecto a las preparadas con 1 y 3.5 g. En los sistemas elaborados con AHAF ocurre lo mismo. Por lo tanto, en ambos casos, los sistemas elaborados con mayor cantidad de almidón presentan un tamaño de celda significativamente inferior ( $P < 0.05$ ), lo que sería indicativo de una menor presencia de agua libre en el sistema. Esta mayor retención de agua por parte de los polímeros de almidón sería la causa de la disminución significativa ( $P < 0.05$ ) en el  $\epsilon''$  al aumentar la proporción de almidón en 100 g de agua, como se ha observado anteriormente en el apartado de propiedades dieléctricas.

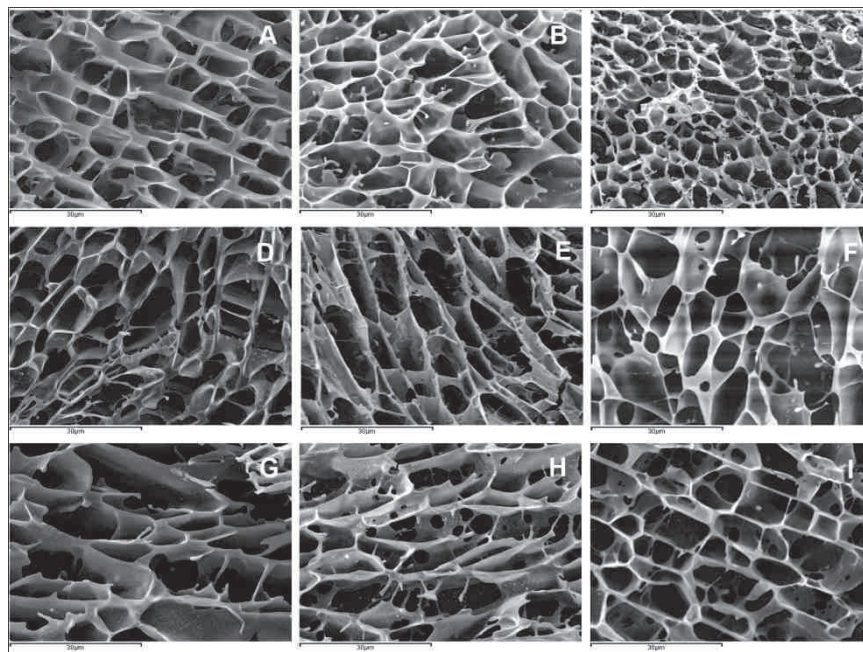


**Figura IV.4.** Área media e intervalos LSD para las muestras con almidón nativo (AN) y almidón modificado (AHAF).

Con respecto a los sistemas preparados con diferentes tipos de carragenato, se observó que el aumento en la cantidad de los mismos no afectaba significativamente ( $P > 0.05$ ) al  $\epsilon''$  y tampoco se apreciaron diferencias en el

## Resultados y discusión

tamaño de las celdas al variar la cantidad de espesante, como se puede observar en la figura IV.5.



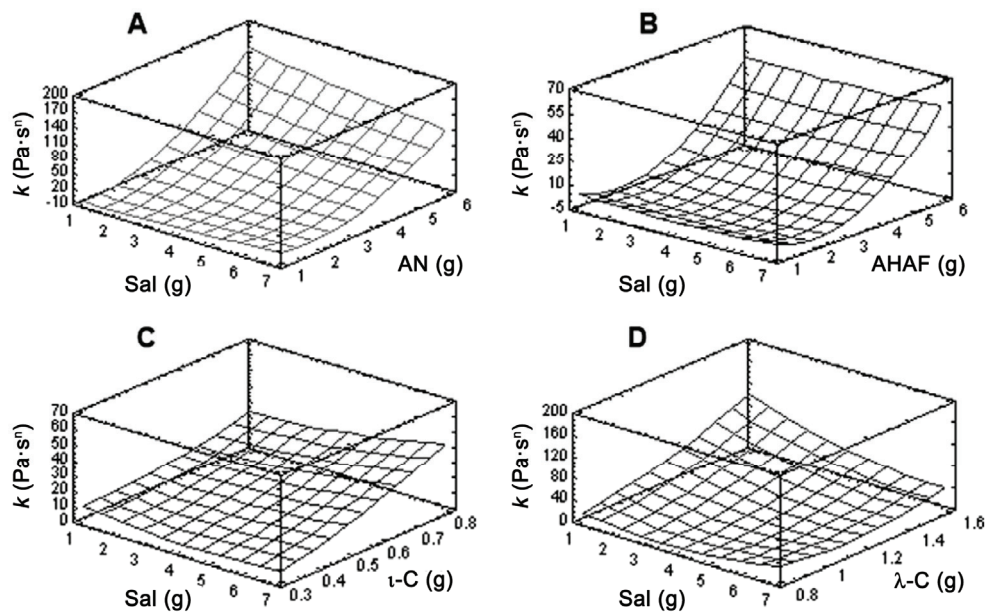
**Figura IV.5.** Micrografías de cryo-SEM. A, B y C: sistema elaborado con 4 g de sal y 0.3 (A), 0.55 (B) y 0.8 (C) g de ι-carragenato (ι-C); D, E y F: sistema elaborado con 4 g de sal y 0.8 (D), 1.2 (E) y 1.6 (F) g de λ-carragenato (λ-C); G, H e I: sistema elaborado con 4 g de sal y 0.3 (G), 0.55 (H) y 0.8 (I) g de κ-carragenato (κ-C). Escala: 30 µm.

### IV.1.3. PROPIEDADES DE FLUJO

Con el objetivo de investigar la influencia que las propiedades reológicas (establecidas por los hidrocoloides empleados) pudieran tener sobre las propiedades dieléctricas, se midieron las propiedades de flujo de los sistemas analizados. Las propiedades de flujo están directamente relacionadas con el estado del agua en los sistemas, que está regido por la capacidad de retención de las moléculas de hidrocoloide.

En el intervalo de velocidades de cizalla estudiado, los datos de viscosidad se ajustaron correctamente al modelo de Ostwald-de Waele ( $\eta = k \cdot \dot{\gamma}^{n-1}$ ; Ec.III.3). El índice de consistencia ( $k$ ) es el parámetro del modelo que representa la resistencia

al flujo. La figura IV.6 muestra los correspondientes gráficos de superficie de respuesta en los diferentes sistemas modelo para este parámetro. Todos los hidrocoloides afectaron de forma significativa ( $P < 0.05$ ) y positiva a la variable  $k$ , es decir el aumento en su concentración aumentaba la consistencia del sistema, lo que explica su utilización como agentes espesantes en la industria alimentaria. El AN originó valores más elevados de  $k$  que el AHAF y el sistema con  $\lambda$ -carragenato mayores que el sistema con  $\iota$ -carragenato.



**Figura IV.6.** Gráficos de superficie de respuesta de la variable índice de consistencia ( $k$ ) en relación con la cantidad de sal e hidrocoloide. A: sistema con AN; B: sistema con AHAF; C: sistema con  $\iota$ -C; D: sistema con  $\lambda$ -C; AN: almidón nativo; AHAF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento;  $\iota$ -C:  $\iota$ -carragenato;  $\lambda$ -C:  $\lambda$ -carragenato.

La sal afectó de forma significativa ( $P < 0.05$ ) y negativa al índice de consistencia en los sistemas con AN y con  $\lambda$ -C; sin embargo, al existir interacciones significativas entre la sal y el espesante se observó que a niveles altos de sal (7 g/100g) y bajos de espesante (1 g/100g en el sistema con AN y 0.8 g/100g en el sistema con  $\lambda$ -C) se producía un aumento en  $k$ . El almidón, a diferencia de los carragenatos, no contiene grupos ionizables, por lo que en principio no debería ser sensible a las sales. Sin embargo, en sistemas modelo se

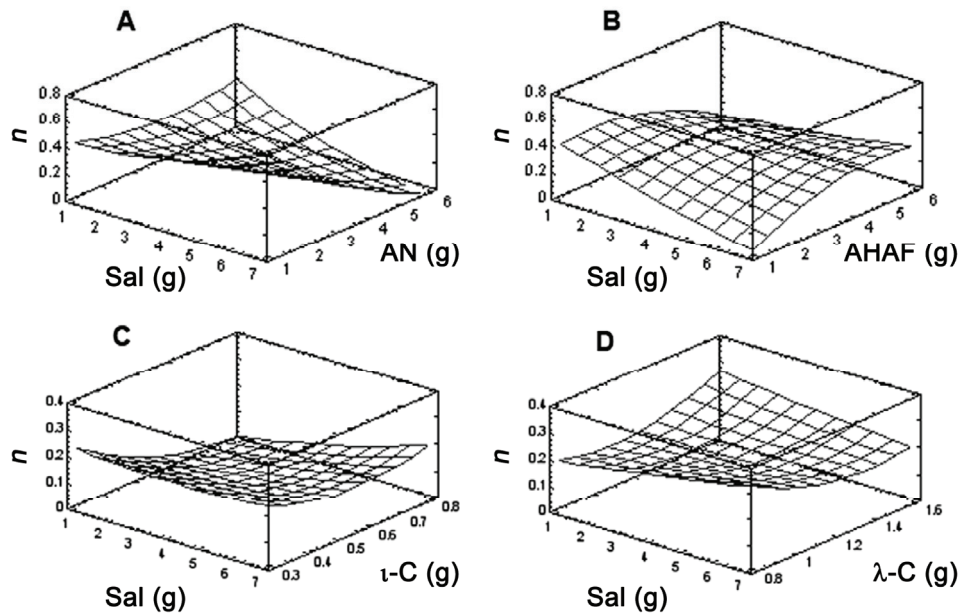
### *Resultados y discusión*

ha observado que sí se ve afectado cuando iones como fosfatos, acetatos, cloruros, citratos, sulfatos y tartratos y cationes como sodio y calcio, se encuentran en concentraciones muy altas (Thomas y Atwell 1999). El efecto de la sal sobre el sistema con AN podría explicarse como resultado de la competencia que existe entre la sal y el almidón por el agua, que limitaría el hinchamiento de los gránulos de almidón nativo y por tanto disminuiría la consistencia que imparten al sistema. A diferencia del sistema con AN, en el de AHAF la sal no fue un factor significativo ( $P < 0.05$ ) para los valores de  $k$ .

Con respecto al sistema elaborado con  $\iota$ -C, se observó que la sal ejercía un efecto significativo ( $P < 0.05$ ) y positivo. Michel et al. (1997) demostraron que el módulo de elasticidad (el cual indica la rigidez de un material) dependía de la concentración y naturaleza del catión en contacto con el  $\iota$ -carragenato. Dado que las moléculas de carragenato contienen grupos sulfato cuya repulsión evita agregación de cadenas, no es sorprendente que las propiedades reológicas estén influenciadas por la adición de cationes que protegen de la repulsión electrostática a los grupos sulfato. Es por ello que la adición de cationes puede ampliar la región cristalina de la red de  $\iota$ -carragenato y así, aumentar el módulo de elasticidad (Michel et al., 1997). Este hecho explicaría el efecto positivo de la sal en el parámetro  $k$ . El  $\lambda$ -carragenato no gelifica al tener más cargas negativas en su estructura química; lo que limita la ampliación de las zonas cristalinas de la red, y por tanto no se produce el aumento de la consistencia que imparte al sistema.

Los valores del índice de flujo ( $n$ ) del modelo de Ostwald-de Waele obtenidos en todos los sistemas modelo (figura IV.7) fueron menores a 1, lo que confirma que las muestras se comportaron como fluidos pseudoplásticos en los que la viscosidad disminuye al aumentar la velocidad de cizalla.





**Figura IV.7.** Gráficos de superficie de respuesta de la variable índice de flujo ( $n$ ) en relación con la cantidad de sal e hidrocoloide. A: sistema con AN; B: sistema con AHAF; C: sistema con  $\iota$ -C; D: sistema con  $\lambda$ -C; AN: almidón nativo; AHAF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento;  $\iota$ -C:  $\iota$ -carragenato;  $\lambda$ -C:  $\lambda$ -carragenato.

Al comparar los dos tipos de almidones empleados se observaron dos comportamientos pseudoplásticos distintos, lo que indica una diferencia estructural entre ambos corroborada por el diferente efecto que ejerce la sal sobre el parámetro  $n$  en los modelos en los que son utilizados. En el caso del AN, los gránulos gelatinizados no resistieron el calentamiento en la preparación y se desintegraron, produciendo la solubilización de la amilosa y amilopectina. En el caso del AHAF la estructura se corresponde con un sistema formado por gránulos de almidón hinchados que han resistido el calentamiento debido a su modificación mediante entrecruzamiento y sustitución.

Los sistemas con carragenato presentaron un mayor comportamiento pseudoplástico ( $n$  más cercano a 0) que los sistemas con almidón, demostrando una complejidad estructural superior. Al comparar entre los sistemas con carragenato, el elaborado con  $\iota$ -C mostró un comportamiento más pseudoplástico que el de  $\lambda$ -C. Por otro lado, una concentración elevada de  $\kappa$ -C formaba geles

### *Resultados y discusión*

fuertes y rígidos, haciendo imposible la determinación de curvas de flujo en estos sistemas y las superficies de respuesta correspondientes.

Los efectos de la cantidad de sal e hidrocoloides sobre el comportamiento pseudoplástico fueron variables. Cuando la cantidad de sal en la muestra era pequeña, un aumento en la cantidad de espesante provocaba una disminución de  $n$  en todos los sistemas, excepto en el elaborado con  $\lambda$ -C. A niveles intermedios de sal, al aumentar la cantidad de hidrocoloide también disminuía  $n$  salvo para el sistema con AHAF donde aumentó. Finalmente, si el contenido en sal era elevado, al aumentar el nivel de hidrocoloide disminuía  $n$  en los sistemas con AN mientras que aumentaba su valor en el sistema con AHAF y no se apreciaba una tendencia definida en los sistemas con  $\iota$ -C y  $\lambda$ -C. Las ecuaciones de predicción de los parámetros  $k$  y  $n$  se muestran en las tablas IV.3 y 4. Las ecuaciones de  $n$  para los sistemas elaborados con  $\iota$ -C y  $\lambda$ -C no están recogidas debido a que ningún factor fue estadísticamente significativo.

En resumen, los efectos combinados de la cantidad de sal e hidrocoloides en el parámetro  $n$  fueron muy difíciles de determinar y no se pudieron generalizar en los sistemas modelo analizados. Observando la manera en la que las propiedades dieléctricas varían con la concentración de sal e hidrocoloides (figura IV 1 y 2), se puede concluir que la sal es con diferencia el parámetro que más influencia ejerce sobre estas propiedades. Por otro lado, mientras que los parámetros reológicos estuvieron determinados por la fracción de moléculas de agua que pudieran estar retenidas en mayor o menor proporción por las cadenas poliméricas de los hidrocoloides, este hecho no desempeñó un papel importante en el comportamiento dieléctrico.



**Tabla IV.3.** Ecuaciones de predicción para el índice de consistencia ( $k$ ) a velocidades de cizalla comprendidas entre 0.01 y 100 s<sup>-1</sup> durante 600 s a 20 °C.

Hidrocoloide	Ecuación	r <sup>2</sup>	Límites de las variables	
			a (g/100 g agua)	b (g/100 g agua)
AN	$k = -8.7638 + 5.0778a - 9.903b - 2.0266ab + 6.3482b^2$	0.98	1-7	1-6
AHAF	$k = -17.6892 + 1.9274a - 16.0165b - 0.2491a^2 + 3.706b^2$	0.99	1-7	1-6
t-C	$k = -17.4887 - 1.1924a - 52.2465b$	0.82	1-7	0.3-0.8
λ-C	$k = 38.2067 + 0.9250a - 84.7427b + 1.7959a^2 - 16.5913ab + 89.3237b^2$	0.77	1-7	0.8-1.6

Los parámetros que no son significativos no han sido incluidos en la ecuación.

AN: almidón nativo; AHAF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento; t-C: t-carragenato; λ-C: λ-carragenato; a: sal; b: hidrocoloide.

**Tabla IV.4.** Ecuaciones de predicción para el índice de flujo ( $n$ ) a velocidades de cizalla comprendidas entre 0.01 y 100 s<sup>-1</sup> durante 600 s a 20 °C.

Hidrocoloide	Ecuación	r <sup>2</sup>	Límites de las variables	
			a (g/100 g agua)	b (g/100 g agua)
AN	$n = 0.3915 + 0.0802a - 0.0811b - 0.02513ab + 0.01411b^2$	0.71	1-7	1-6
AHAF	$n = 0.4195 - 0.0813a + 0.0622b + 0.0185ab - 0.0196b^2$	0.45	1-7	1-6

Los parámetros que no son significativos no han sido incluidos en la ecuación.

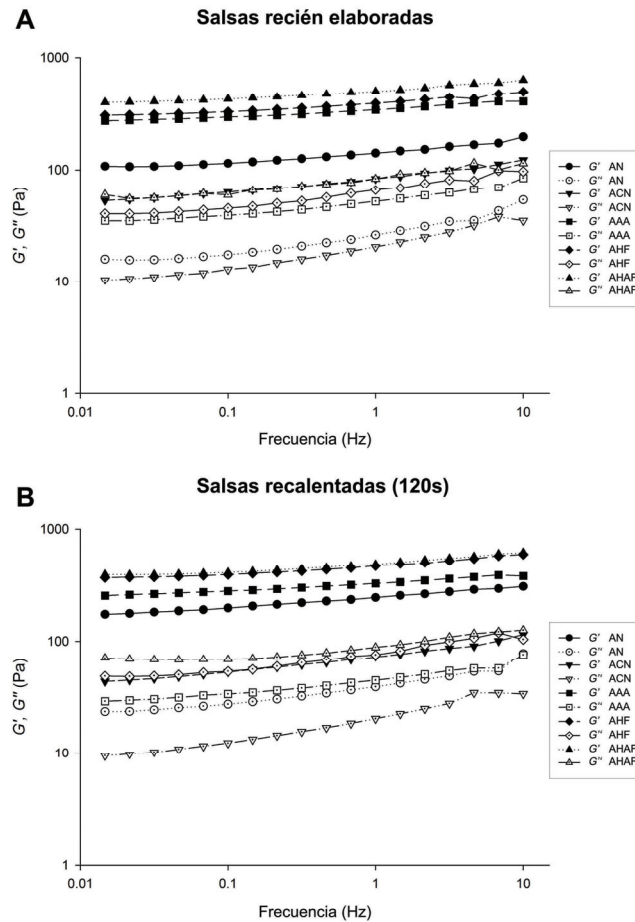
AN: almidón nativo; AHAF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento.

## IV.2. CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA Y MICROESTRUCTURAL DE SALSAS BECHAMEL ELABORADAS CON DISTINTOS TIPOS DE ALMIDÓN Y CALENTADAS AL MICROONDAS

En esta sección se estudiaron la microestructura y las propiedades reológicas de salsas formuladas con diferentes almidones después de ser calentadas en horno microondas durante diferentes tiempos. Los almidones utilizados fueron los descritos en la sección III.1 y se empleó la composición detallada en la tabla III.2 (sección III.2.2) correspondiente a las salsas elaboradas con proteínas de leche.

### IV.2.1. ESPECTROS MECÁNICOS

La figura IV.8 muestra un ejemplo representativo —salsas recién preparadas y salsas recalentadas durante 120 s— de la dependencia de los valores de  $G'$  y  $G''$  con la frecuencia (espectro mecánico) de las diferentes salsas. Además, la tabla IV.5 muestra los valores de  $G'$ ,  $G''$ , y  $\tan \delta$  a una frecuencia de 1 Hz y 20 °C para todas las muestras estudiadas. Los espectros mecánicos de todas ellas revelaron la existencia de geles débiles, con valores de  $G'$  mayores que  $G''$ . Un material que es independiente de la frecuencia en una escala de tiempo amplia se considera sólido, un gel real representa este tipo de material. Por el contrario, una fuerte dependencia con la frecuencia sugiere una estructura molecular que se comporta más como un sólido a altas frecuencias y más como un líquido a frecuencias bajas (Rosalina y Bhattacharya 2002). La dependencia de  $G'$  con la frecuencia se ajustó adecuadamente a una ecuación de ley de potencia ( $G' = kf^n$ ; Ec.III.4) para todos los casos, con valores del índice de la ley de potencia que variaron de 0.06 a 0.16, lo que implicaba una débil dependencia con la frecuencia a lo largo del intervalo de frecuencias estudiado. Otros autores (Arocas et al. 2009a; Mandala et al. 2004) encontraron una dependencia similar con la frecuencia en salsa blanca.



**Figura IV.8.** Espectro mecánico de las salsas elaboradas con diferentes almidones de maíz. A: muestras recién elaboradas. B: muestras tras 120 s de recalentamiento en microondas. AN: almidón nativo; ANC: almidón nativo céreo; AAA: adipato de dialmidón acetilado entrecruzado; AHF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado entrecruzado, AHAF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento.

#### IV.2.1.1 INFLUENCIA DEL TIPO DE ALMIDÓN. MUESTRAS RECIÉN ELABORADAS.

En la figura IV.8 A, que muestra el espectro mecánico de las muestras recién preparadas, se puede observar diferencias evidentes entre las salsas preparadas con almidones nativos y modificados. Los valores de  $G'$  (tabla IV.5) tanto para las salsas con almidón nativo (AN) como para las salsas con almidón nativo céreo (ANC) fueron significativamente menores ( $P < 0.05$ ) que los correspondientes a las

### *Resultados y discusión*

salsas preparadas con almidones modificados. Asimismo, los valores de  $\tan \delta$  de las salsas preparadas con almidones nativos mostraron la existencia de sistemas menos viscoelásticos, con valores de  $\tan \delta$  significativamente superiores ( $P < 0.05$ ) a los de las salsas preparadas con almidones modificados. Estos resultados mostraron diferencias estructurales entre las salsas elaboradas con almidones nativos y modificados como posteriormente se confirmó en el análisis microestructural.

En cuanto a la comparación entre ambos almidones nativos, las salsas con ANC mostraron valores más bajos de  $G'$  y  $G''$  y más altos de  $\tan \delta$  (valores más próximos a 1) que las salsas con AN, lo que indica que las primeras presentan unas propiedades menos elásticas que las segundas. La menor elasticidad de las salsas preparadas con ANC en comparación con AN fue previamente observada por Arocas et al. (2010). Este hecho fue atribuido a una alta susceptibilidad del almidón céreo frente a condiciones de cizalla debido a su baja rigidez granular.

Entre los almidones modificados entrecruzados, las salsas preparadas con el almidón acetilado (AAA) mostraron valores de  $G'$  y  $G''$  significativamente menores ( $P < 0.05$ ) con respecto a las preparadas con los almidones hidroxipropilados (AHF y AHAF), siendo los valores de  $G'$  y  $G''$  de las salsas con AHAF los más altos significativamente ( $P < 0.05$ ). Arocas et al. (2009a) también indicaron que las salsas blancas formuladas con AAA tenían valores de  $G'$  y  $G''$  más bajos que los de las salsas formuladas con AHF. Tárrega et al. (2005) mostraron resultados similares en mezclas de almidón y leche. Los grupos hidroxipropilo debilitan la unión estructural interna de los gránulos promoviendo la penetración de agua (Gunaratne y Corke 2007). Puesto que los grupos hidroxipropilo son más hidrofílicos que los grupos acetilo, pueden retener agua en mayor medida y por tanto los gránulos de los almidones hidroxipropilados tienen mayor capacidad de hinchamiento antes de desintegrarse. Esto puede explicar la elevada consistencia de las salsas formuladas con almidones que presentan este tipo de sustitución.

Tabla IV.5. Valores medios de  $G'$ ,  $G''$ , y  $\tan \delta$  a 1 Hz y 20°C para las diferentes salsas y tiempos de recalentamiento en MO.

Tipo de almidón	60 s			90 s			120 s			180 s			300 s			480 s					
	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)	$\tan \delta$	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)	$\tan \delta$	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)	$\tan \delta$	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)	$\tan \delta$	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)	$\tan \delta$	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)	$\tan \delta$			
AN	140.9 <sup>A</sup> <sub>(11.3)</sub>	26.1 <sup>A</sup> <sub>(0.1)</sub>	0.185 <sup>A</sup> <sub>(0.014)</sub>	187.1 <sup>AB</sup> <sub>(2.6)</sub>	30.9 <sup>A</sup> <sub>(0.25)</sub>	0.165 <sup>B</sup> <sub>(0.001)</sub>	182.2 <sup>AB</sup> <sub>(7.3)</sub>	30.9 <sup>A</sup> <sub>(1.34)</sub>	0.170 <sup>B</sup> <sub>(0.001)</sub>	243.5 <sup>AB</sup> <sub>(9.0)</sub>	38.9 <sup>A</sup> <sub>(1.71)</sub>	0.159 <sup>BC</sup> <sub>(0.001)</sub>	276.1 <sup>B</sup> <sub>(9.0)</sub>	38.9 <sup>A</sup> <sub>(2.66)</sub>	0.141 <sup>D</sup> <sub>(0.005)</sub>	254.6 <sup>AB</sup> <sub>(75.2)</sub>	37.9 <sup>A</sup> <sub>(10.45)</sub>	0.149 <sup>CD</sup> <sub>(0.003)</sub>	679.4 <sup>C</sup> <sub>(101.4)</sub>	98.7 <sup>B</sup> <sub>(15.5)</sub>	0.145 <sup>D</sup> <sub>(0.001)</sub>
ACN	83.3 <sup>A</sup> <sub>(0.6)</sub>	20.5 <sup>A</sup> <sub>(0.11)</sub>	0.246 <sup>A</sup> <sub>(0.000)</sub>	73.2 <sup>A</sup> <sub>(7.6)</sub>	19.68 <sup>A</sup> <sub>(0.79)</sub>	0.270 <sup>BC</sup> <sub>(0.020)</sub>	74.6 <sup>A</sup> <sub>(0.3)</sub>	19.84 <sup>A</sup> <sub>(0.26)</sub>	0.266 <sup>ABC</sup> <sub>(0.004)</sub>	72.5 <sup>A</sup> <sub>(1.8)</sub>	20.33 <sup>A</sup> <sub>(0.70)</sub>	0.280 <sup>CD</sup> <sub>(0.003)</sub>	84.6 <sup>A</sup> <sub>(5.7)</sub>	21.53 <sup>A</sup> <sub>(0.82)</sub>	0.255 <sup>AB</sup> <sub>(0.011)</sub>	88.8 <sup>A</sup> <sub>(3.5)</sub>	26.08 <sup>B</sup> <sub>(0.80)</sub>	0.294 <sup>D</sup> <sub>(0.003)</sub>	118.3 <sup>B</sup> <sub>(12.4)</sub>	39.77 <sup>C</sup> <sub>(3.34)</sub>	0.336 <sup>E</sup> <sub>(0.006)</sub>
AAA	340.3 <sup>A</sup> <sub>(6.7)</sub>	51.75 <sup>A</sup> <sub>(1.01)</sub>	0.152 <sup>C</sup> <sub>(0.000)</sub>	265.9 <sup>B</sup> <sub>(8.5)</sub>	37.82 <sup>B</sup> <sub>(0.55)</sub>	0.142 <sup>BC</sup> <sub>(0.002)</sub>	340.8 <sup>A</sup> <sub>(15.6)</sub>	45.59 <sup>A</sup> <sub>(2.54)</sub>	0.134 <sup>D</sup> <sub>(0.001)</sub>	324.6 <sup>C</sup> <sub>(16.1)</sub>	44.42 <sup>AB</sup> <sub>(1.88)</sub>	0.137 <sup>DE</sup> <sub>(0.001)</sub>	355.6 <sup>C</sup> <sub>(27.2)</sub>	50.05 <sup>A</sup> <sub>(3.53)</sub>	0.141 <sup>BE</sup> <sub>(0.001)</sub>	472.0 <sup>C</sup> <sub>(41.3)</sub>	68.34 <sup>C</sup> <sub>(5.05)</sub>	0.145 <sup>C</sup> <sub>(0.002)</sub>	820.3 <sup>D</sup> <sub>(14.8)</sub>	119.70 <sup>D</sup> <sub>(4.38)</sub>	0.146 <sup>C</sup> <sub>(0.003)</sub>
AHF	388.4 <sup>A</sup> <sub>(7.7)</sub>	65.70 <sup>A</sup> <sub>(0.47)</sub>	0.169 <sup>AB</sup> <sub>(0.005)</sub>	375.9 <sup>A</sup> <sub>(32.3)</sub>	65.74 <sup>A</sup> <sub>(1.64)</sub>	0.175 <sup>AB</sup> <sub>(0.010)</sub>	377.5 <sup>A</sup> <sub>(20.6)</sub>	65.05 <sup>A</sup> <sub>(4.40)</sub>	0.172 <sup>AB</sup> <sub>(0.002)</sub>	465.7 <sup>A</sup> <sub>(14.6)</sub>	75.71 <sup>C</sup> <sub>(6.11)</sub>	0.162 <sup>A</sup> <sub>(0.008)</sub>	386.1 <sup>A</sup> <sub>(32.7)</sub>	69.00 <sup>A</sup> <sub>(5.51)</sub>	0.179 <sup>B</sup> <sub>(0.001)</sub>	588.6 <sup>B</sup> <sub>(4.4)</sub>	103.10 <sup>B</sup> <sub>(3.39)</sub>	0.175 <sup>AB</sup> <sub>(0.007)</sub>	1311.0 <sup>C</sup> <sub>(93.3)</sub>	212.65 <sup>C</sup> <sub>(13.08)</sub>	0.162 <sup>A</sup> <sub>(0.001)</sub>
AHAF	501.2 <sup>AB</sup> <sub>(22.5)</sub>	83.18 <sup>A</sup> <sub>(6.55)</sub>	0.166 <sup>A</sup> <sub>(0.006)</sub>	440.1 <sup>A</sup> <sub>(5.1)</sub>	74.70 <sup>A</sup> <sub>(3.08)</sub>	0.170 <sup>BC</sup> <sub>(0.005)</sub>	466.5 <sup>A</sup> <sub>(40.5)</sub>	83.20 <sup>A</sup> <sub>(5.26)</sub>	0.178 <sup>CD</sup> <sub>(0.004)</sub>	486.3 <sup>AB</sup> <sub>(2.5)</sub>	88.29 <sup>A</sup> <sub>(0.07)</sub>	0.181 <sup>D</sup> <sub>(0.001)</sub>	436.0 <sup>A</sup> <sub>(25.9)</sub>	78.80 <sup>A</sup> <sub>(2.80)</sub>	0.181 <sup>D</sup> <sub>(0.004)</sub>	599.1 <sup>B</sup> <sub>(25.6)</sub>	109.25 <sup>B</sup> <sub>(2.19)</sub>	0.182 <sup>D</sup> <sub>(0.004)</sub>	1382.3 <sup>C</sup> <sub>(99.5)</sub>	198.5 <sup>C</sup> <sub>(14.8)</sub>	0.144 <sup>E</sup> <sub>(0.006)</sub>

Valores entre paréntesis muestran la desviación estándar.

<sup>ABC</sup> En la misma fila y para el mismo parámetro las medias con diferente letra son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) según la prueba LSD de Fisher.

<sup>abc</sup> En la misma columna, las medias con diferente letra son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) según la prueba LSD de Fisher.

AN: almidón nativo; ACN: almidón nativo cérico; AAA: adipato de dialmidón acetilado entrecruzado; AHF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado entrecruzado; AHAF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento. R: recién elaborada.

## Resultados y discusión

### IV.2.1.2. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE RECALENTAMIENTO

Tanto los almidones nativos como los modificados fueron estables al recalentamiento hasta que se aplicaron tiempos prolongados de tratamiento (tabla IV.5). Los cambios en los valores de los parámetros reológicos ( $G'$ ,  $G''$ ) debidos al recalentamiento fueron significativos únicamente cuando las muestras se recalentaron durante tiempos prolongados (300 s para las salsas con almidones modificados y 480 s para almidones nativos). Antes de los 300 s de recalentamiento en microondas, todas las salsas mantuvieron sus parámetros reológicos, pero una vez alcanzados los 300 s para las salsas con almidones modificados y 480 s para los nativos los valores de  $G'$  y  $G''$  se vieron incrementados significativamente ( $P < 0.05$ ).

En la tabla IV.6 se muestra el contenido en humedad (%) de las salsas tras los diferentes tiempos de recalentamiento. Se observa una relación inversa entre la pérdida de agua y los valores de  $G'$  y  $G''$ . Los cambios en el comportamiento viscoelástico de las salsas suceden únicamente cuando la pérdida de humedad es significativa.

**Tabla IV.6.** Contenido en humedad (%) de las salsas a diferentes tiempos de recalentamiento.

Tipo de almidón	Tiempo de recalentamiento						
	R	60	90	120	180	300	480
AN	83.6 <sup>AB</sup> <sub>a</sub> (0.3)	83.9 <sup>B</sup> <sub>a</sub> (0.1)	83.8 <sup>B</sup> <sub>a</sub> (0.3)	83.7 <sup>B</sup> <sub>a</sub> (0.1)	83.4 <sup>AB</sup> <sub>a</sub> (0.0)	83.1 <sup>BC</sup> <sub>a</sub> (0.1)	83.0 <sup>C</sup> <sub>a</sub> (0.3)
ACN	84.1 <sup>A</sup> <sub>a</sub> (0.3)	84.1 <sup>A</sup> <sub>a</sub> (0.1)	83.8 <sup>A</sup> <sub>a</sub> (0.9)	83.9 <sup>A</sup> <sub>a</sub> (0.4)	84.0 <sup>A</sup> <sub>b</sub> (0.2)	83.7 <sup>A</sup> <sub>a</sub> (0.5)	82.5 <sup>B</sup> <sub>a</sub> (0.4)
AAA	83.9 <sup>A</sup> <sub>a</sub> (0.1)	83.8 <sup>A</sup> <sub>a</sub> (0.2)	83.8 <sup>A</sup> <sub>a</sub> (0.2)	84.0 <sup>A</sup> <sub>a</sub> (0.0)	83.7 <sup>A</sup> <sub>ab</sub> (0.2)	81.4 <sup>B</sup> <sub>b</sub> (0.1)	79.8 <sup>C</sup> <sub>b</sub> (0.1)
AHF	83.8 <sup>A</sup> <sub>a</sub> (0.1)	83.6 <sup>A</sup> <sub>a</sub> (0.7)	83.9 <sup>A</sup> <sub>a</sub> (0.2)	83.8 <sup>A</sup> <sub>a</sub> (0.0)	83.7 <sup>A</sup> <sub>ab</sub> (0.1)	81.4 <sup>B</sup> <sub>b</sub> (0.3)	78.2 <sup>C</sup> <sub>c</sub> (0.0)
AHAF	83.9 <sup>AB</sup> <sub>a</sub> (0.1)	84.1 <sup>B</sup> <sub>a</sub> (0.1)	84.0 <sup>B</sup> <sub>a</sub> (0.1)	83.9 <sup>AB</sup> <sub>a</sub> (0.0)	83.6 <sup>AC</sup> <sub>ab</sub> (0.3)	83.5 <sup>C</sup> <sub>a</sub> (0.1)	78.6 <sup>D</sup> <sub>c</sub> (0.1)

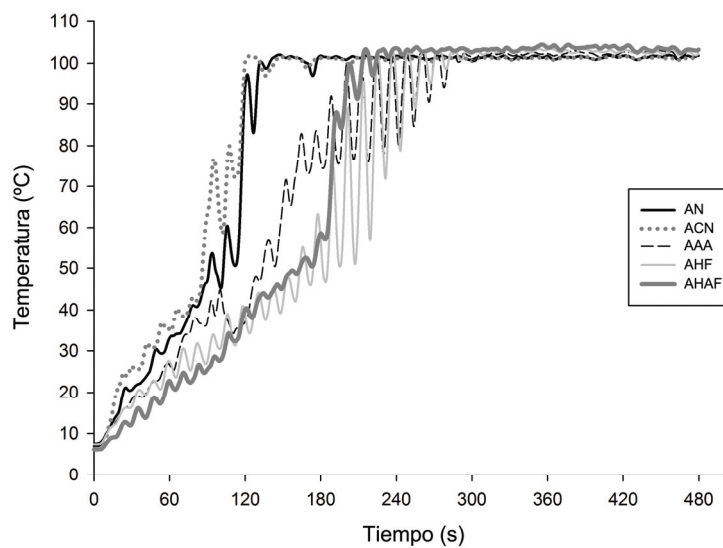
Valores entre paréntesis muestran la desviación estándar.

<sup>ABC</sup> En la misma fila, las medias con diferente letra son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) según la prueba LSD de Fisher.

<sup>abc</sup> En la misma columna, las medias con diferente letra son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) según la prueba LSD de Fisher.

AN: almidón nativo; ANC: almidón nativo céreo; AAA: adipato de dialmidón acetilado entrecruzado; AHF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado entrecruzado, AHAF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento. R: recién elaborada.

Los perfiles de temperatura de las diferentes salsas sometidas al calentamiento en microondas se muestran en la figura IV.9. Como se puede observar, hay dos patrones diferentes de calentamiento. Las salsas elaboradas con almidones nativos (AN y ANC) alcanzan altas temperaturas más rápido que las elaboradas con almidones modificados (AAA, AHF y AHAF). Tattiyakul et al. (2002) demostraron que la transferencia de calor en dispersiones de almidón de maíz waxy entrecruzado sometidas a calentamiento convencional era más lenta que en dispersiones de almidón de maíz normal. Este hecho se relacionó con la elevada viscosidad alcanzada en las primeras dispersiones debido a la elevada fracción de volumen que representaban los gránulos de almidón hinchados.



**Figura IV.9.** Perfiles tiempo-temperatura de salsas elaboradas con diferentes almidones de maíz (3.5% p/p) sometidas a calentamiento en microondas. AN: almidón nativo; ANC: almidón nativo céreo; AAA: adipato de dialmidón acetilado entrecruzado; AHF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado entrecruzado, AHAF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento.

Sin embargo, los almidones nativos mostraron menor pérdida de agua en comparación con los almidones modificados (tabla IV.6). Las diferentes propiedades de retención de agua entre los almidones nativos y modificados pueden ser explicadas debido a su diferente estructura. Los gránulos de almidón nativo se desintegran durante la elaboración de la salsa blanca liberando los polímeros solubles del almidón a la fase continua. El almidón soluble

### *Resultados y discusión*

(principalmente amilopectina) puede interactuar con las moléculas de agua en mayor medida limitando la evaporación de agua durante el recalentamiento.

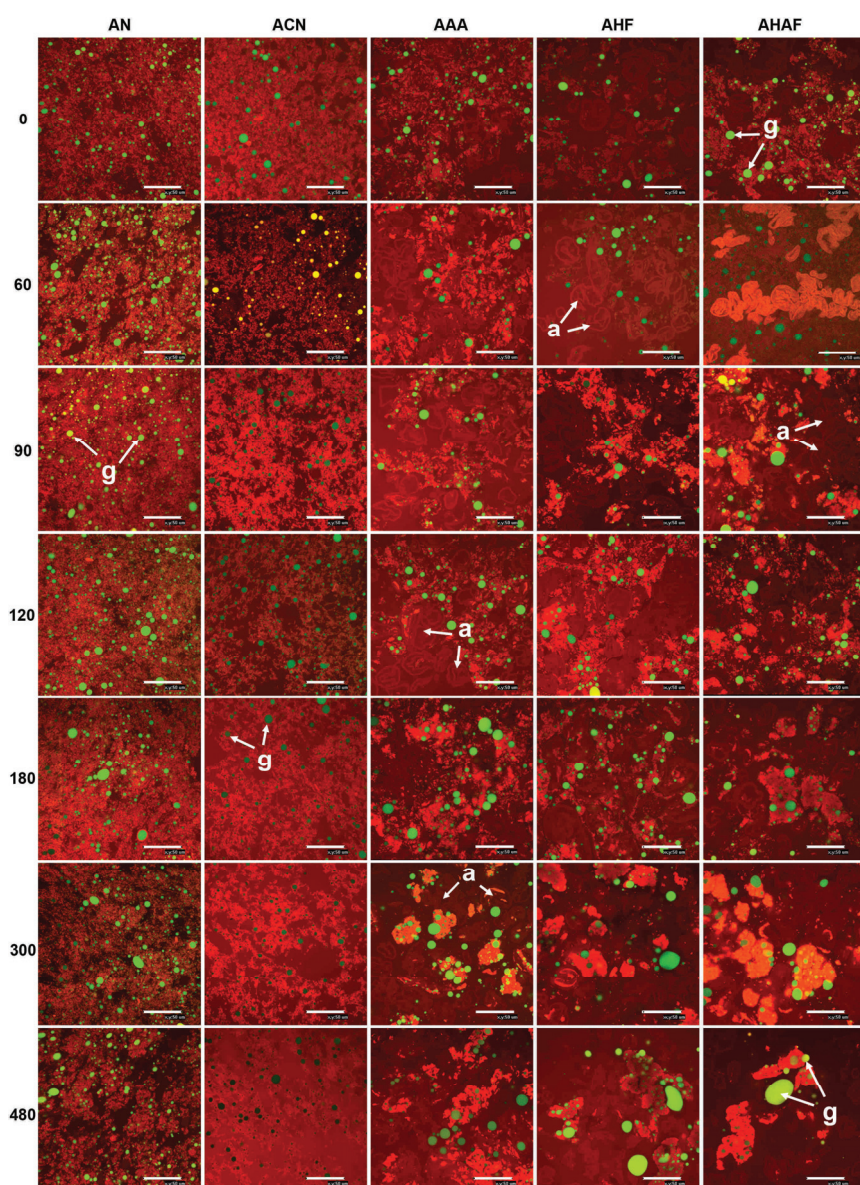
El hecho de que los cambios observados en los valores de  $G'$  y  $G''$  durante tiempos de calentamiento prolongados (300 y 480 s) fueran debidos a la pérdida de agua más que a cambios estructurales en las salsas fue apoyado por el hecho de que los valores de  $\tan \delta$  no se vieron afectados, lo que indica que no se produjeron cambios sustanciales en el tipo de estructura.

La estabilidad de las propiedades viscoelásticas de las salsas blancas durante el recalentamiento en microondas fue observado por Arocas et al. (2009a) cuando se empleó calentamiento convencional. Estos autores demostraron que los valores de  $G'$  y  $G''$  de salsas blancas recién preparadas no variaban durante el calentamiento in situ en un reómetro.

#### IV.2.2. MICROSCOPIA LASER CONFOCAL DE BARRIDO (CLSM) Y ANÁLISIS DE IMAGEN

La figura IV.10 muestra micrografías de las diferentes salsas analizadas. La tinción con Nile red destaca los glóbulos de grasa en color verde, sin embargo la intensidad de la señal recogida disminuye rápidamente como consecuencia del “photobleaching”, fenómeno descrito en la sección III.9.3. Esta es la razón por la cual en algunas imágenes —por ejemplo, las correspondientes a las salsas ANC y calentadas a tiempos prolongados— los glóbulos de grasa se observan en negro. La rodamina B tiene la capacidad de teñir las fases de almidón y proteína en rojo, pero parece tener mayor afinidad por la última (Tromp et al. 2001; van de Velde et al. 2002). Por tanto, este hecho se ha de tener en cuenta cuando se analizan las estructuras de las salsas puesto que la proteína y el almidón pueden distinguirse por la intensidad de la señal recogida.





**Figura IV.10.** Microscopía láser confocal (CLSM) de las salsas elaboradas con diferentes almidones de maíz después de diferentes tiempos de calentamiento. En columnas, las salsas con diferentes almidones: AN: almidón nativo; ANC: almidón nativo céreo; AAA: adipato de dialmidón acetilado entrecruzado; AHF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado entrecruzado, AHAF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento. En filas, diferentes tiempos de calentamiento (en segundos). R: recién elaborada; g: glóbulo de grasa; a: gránulo de almidón. Escala: 50  $\mu$ m.

### *Resultados y discusión*

Las salsas con AN mostraron una compleja matriz compuesta principalmente por proteína teñida en color rojo brillante y polisacáridos en rojo oscuro. Estos polisacáridos son principalmente amilosa y amilopectina que han sido liberadas desde los gránulos que han sido desintegrados durante el proceso de cocinado. Los polímeros de almidón están distribuidos por la matriz junto con el  $\iota$ -carragenato y la proteína láctea. Garnier et al. (2003) mostraron que la caseína se concentraba en agregados y el  $\iota$ -carragenato se localizaba en las zonas oscuras constituyendo la fase continua en mezclas de caseína e  $\iota$ -carragenato analizadas por CLSM. Arltoft et al. (2007a; 2007b) observaron por CLSM una red gelificada de carragenato conectando y estabilizando agregados de proteína en un postre lácteo elaborado con carragenato y almidón y en geles de carragenato y leche. En el presente estudio, los glóbulos de grasa se observan en verde, homogéneamente dispersos y asociados a la fase proteica. Auty et al. (2001) observaron una distribución de grasa similar en queso procesado. A medida que el tiempo de calentamiento aumentaba, los agregados de proteína fueron formándose pero no se observaron diferencias significativas en el tamaño de los glóbulos de grasa (tabla IV.7). Las muestras con ACN mostraron una estructura similar a las de AN sin apreciarse diferencias aparentes en la matriz proteica y en el tamaño de los glóbulos de grasa tras el calentamiento (tabla IV.7). Por lo tanto y debido a la posibilidad de preservar el tamaño de los glóbulos durante el recalentamiento, tanto los almidones AN como ACN pueden ser empleados para preservar la cremosidad de las salsas. Richardson et al. (1993) sugirieron que una elevada densidad de glóbulos de grasa de pequeño tamaño en productos lácteos ayuda a dar una sensación real de cremosidad. Además, de Wijk et al. (2006) sugirieron que la cremosidad en alimentos semisólidos basados en almidón puede ser mejorada por la presencia de glóbulos de grasa pequeños y estables.

**Tabla IV.7.** Valores medios del percentil 80 del área de los glóbulos de grasa ( $\mu\text{m}^2$ ) de las muestras recién preparadas y las descongeladas en microondas durante 480 s.

Tiempo de recalentamiento	Tipo de almidón				
	AN	ACN	AAA	AHF	AHAF
R	6.32 <sup>a</sup> (0.97)	9.62 <sup>a</sup> (0.85)	10.86 <sup>a</sup> (3.01)	9.68 <sup>a</sup> (3.31)	9.99 <sup>a</sup> (1.59)
480 s	7.66 <sup>a</sup> (0.99)	9.28 <sup>a</sup> (1.94)	11.54 <sup>a</sup> (2.27)	15.99 <sup>b</sup> (4.34)	27.89 <sup>b</sup> (9.46)

Valores entre paréntesis muestran la desviación estándar.

<sup>abc</sup> En la misma columna, las medias con diferente letra son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) según la prueba LSD de Fisher.

AN: almidón nativo; ACN: almidón nativo céreo; AAA: adipato de dialmidón acetilado entrecruzado; AHF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado entrecruzado, AHAF: fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento. R: recién elaborada.

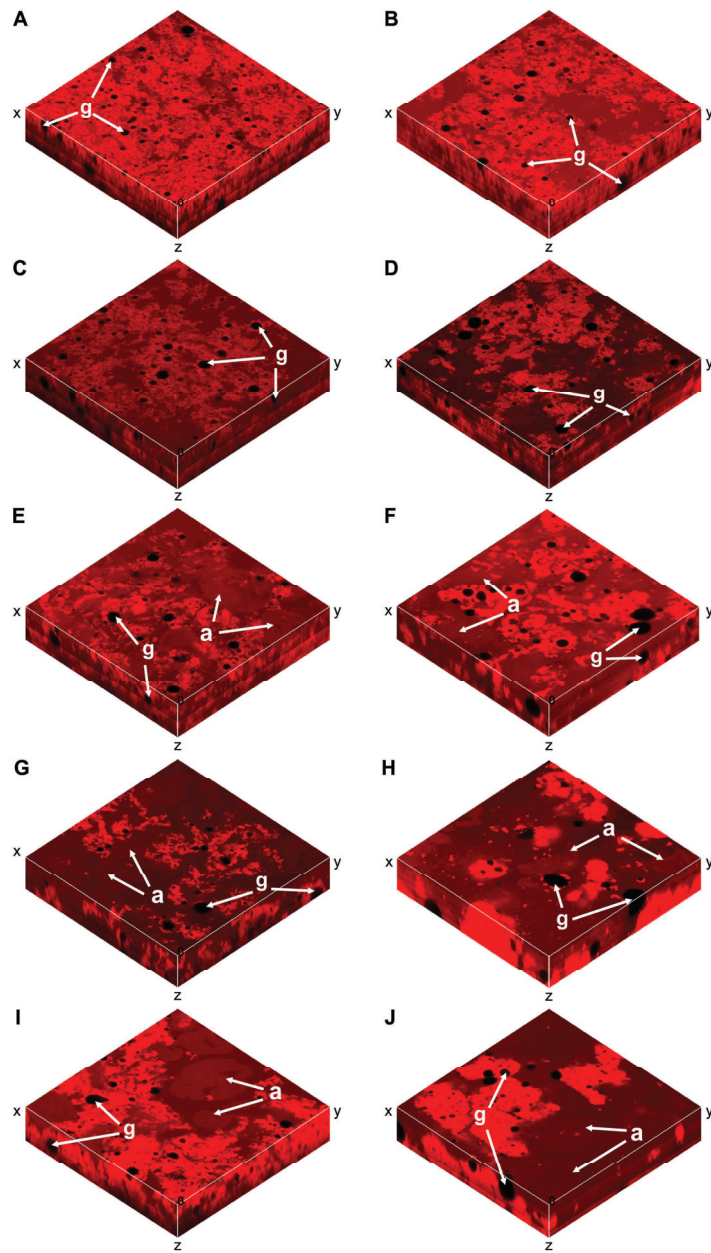
Las muestras con AHF y AHAF mostraron gránulos de almidón hinchados y una matriz de proteína con glóbulos de grasa asociados. A medida que el tiempo de calentamiento aumentaba, la proteína tendió a agregarse y el tamaño de los glóbulos de grasa aumentó significativamente debido a la coalescencia (tabla IV.7). Las salsas que contenían AAA, mostraron una estructura intermedia entre las salsas con almidones nativos e hidroxipropilados puesto que los gránulos no aparecían tan hinchados como en AHF y AHAF y los glóbulos de grasa no mostraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en cuanto al tamaño con el aumento del tiempo de calentamiento (tabla IV.7). Esta estructura intermedia puede estar relacionada con la diferente modificación química del almidón. Mason (2009) afirmó que la sustitución con grupos hidroxipropilo era más estable a la exposición prolongada a altas temperaturas que con grupos acetilo puesto que los grupos hidroxipropilo parecen crear más impedimentos estéricos. Esto puede explicar la mayor capacidad de hinchamiento de los gránulos en AHF y AHAF antes de la ruptura, lo que está a su vez relacionado con la elevada consistencia de las salsas formuladas con este tipo de almidón como se ha mencionado anteriormente en el estudio reológico.

La figura IV.11 muestra, a modo de ejemplo, una reconstrucción en 3D de imágenes de las salsas hechas con diferentes almidones (salsas recién hechas y

### *Resultados y discusión*

recalentadas durante 300 s). La visualización en 3D permite entender mejor la microestructura de las muestras, puesto que es posible analizar la forma de los gránulos hinchados, los glóbulos de grasa y los agregados proteicos. Como se puede observar, los glóbulos de grasa mostraron una forma esférica mientras que los gránulos de almidón permanecieron con una forma irregular y presentaron diversos tamaños actuando como fase dispersa. Además, los gránulos de almidón en las salsas elaboradas con almidones modificados no presentaron un aumento aparente de su tamaño después de ser recalentados por microondas lo que sugiere la idea de que los gránulos fueron cocinados adecuadamente durante la elaboración de la salsa y no se produjeron más cambios estructurales cuando se sometieron al recalentamiento posterior en HMO. Sin embargo, el tamaño de los glóbulos de grasa aumentó en las salsas recalentadas preparadas con almidones hidroxipropilados.

Estos resultados muestran que el hinchamiento de los gránulos de almidón modificado favoreció la agregación proteica. Como los glóbulos de grasa están asociados a la fase proteica, la agregación de esta fase permitió la coalescencia de los glóbulos de grasa, aumentando su tamaño. Por último, las similitudes microestructurales observadas entre las salsas AN y ACN indican que la distribución y tamaño de los glóbulos de grasa y la microestructura de la matriz son independientes de la proporción entre los polímeros de almidón (amilosa y amilopectina).



**Figura IV.11.** Reconstrucciones en 3D de salsas elaboradas con diferentes almidones de maíz. A y B: almidón nativo (AN); C y D: almidón nativo céreo (ANC); E y F: adipato de dialmidón acetilado entrecruzado (AAA); G y H: fosfato de dialmidón hidroxipropilado entrecruzado (AHF); I y J: fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento (AHAF). A, C, E, G, I: muestras recién elaboradas; B, D, F, H, J: muestras recalentadas en microondas durante 300 s. g: glóbulo de grasa; a: gránulo de almidón. Dimensiones de cada reconstrucción: 100X100X20  $\mu\text{m}$ .



### **IV.3. ESTABILIDAD FISICOQUÍMICA Y MICROESTRUCTURAL DE SALSAS ELABORADAS CON DISTINTAS PROTEÍNAS FRENTE AL PROCESO DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN**

Una vez analizado el comportamiento de los diferentes tipos de almidón sobre las características reológicas y microestructurales de las salsas sometidas a recalentamiento en horno microondas (HMO), se estudió el efecto de la descongelación por diferentes métodos —horno convencional (HCO) y HMO— sobre la estabilidad fisicoquímica y microestructural de salsas elaboradas con diferente base proteica. Los objetivos fueron, por un lado, comprobar la idoneidad de diferentes formulaciones proteicas frente a los procesos de congelación-descongelación y por otro analizar el efecto del tratamiento térmico en el producto final obtenido. La composición de las salsas analizadas en este estudio se muestra en la tabla III.2 (sección III.2.2); se utilizó fosfato de dialmidón hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento (AHAF) como almidón y aceite de girasol como grasa.

#### **IV.3.1. ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD FISICOQUÍMICA**

Los datos relacionados con los análisis químicos de las salsas elaboradas con leche desnatada en polvo (LDP) y con aislado de proteína de soja (APS) se recogen en las tablas IV.8 y IV.9 respectivamente. Asimismo, se muestra el perfil térmico de las salsas durante los tratamientos de descongelación por HCO y HMO (figura IV.12).

##### **IV.3.1.1. ANÁLISIS PROTEICO**

Los resultados mostraron que en las salsas elaboradas con proteína láctea la proteína total era significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) en las muestras descongeladas por HMO debido a la evaporación de agua. El gradiente de temperatura generado en el calentamiento en microondas produce la transferencia de agua a la superficie (Meda et al. 2005) favoreciendo la evaporación de agua. En HCO la elevada temperatura alcanzada en la superficie del producto condujo a una deshidratación que formó una costra que podría limitar la evaporación. No

obstante este efecto no fue apreciable en las salsas elaboradas con proteína de soja en las que la proteína total fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) tanto en las muestras descongeladas por HCO como por HMO si se compara con la salsa recién elaborada.

Por otra parte, la fracción de proteína soluble no varió significativamente entre las muestras descongeladas por ambos métodos y las recién hechas en el caso de las muestras elaboradas con proteína láctea. Sin embargo, la descongelación por HCO aumentó significativamente ( $P < 0.05$ ) los valores de proteína soluble en las salsas elaboradas con proteína de soja. Este hecho no era de esperar puesto que el calentamiento conlleva desnaturalización de proteínas que a su vez provoca una disminución en la proteína soluble. Se ha comprobado que la proteína de soja puede adsorberse a los gránulos de almidón mediante enlaces hidrofóbicos o por puentes de hidrógeno dependiendo de las características de los componentes de la superficie del gránulo (Ryan y Brewer 2007), lo que podría ser otra limitación a la extracción de proteína soluble. No obstante, las muestras descongeladas, sufren un recalentamiento que puede debilitar este tipo de enlaces (especialmente a largos tiempos de recalentamiento en HCO) y por tanto se volvería a recuperar parte de esa proteína en la extracción, lo que explicaría por qué las muestras descongeladas en HCO presentaron valores más elevados de proteína soluble para una salsa que parte de la misma composición.

El análisis electroforético (SDS-PAGE) de las muestras recién preparadas, descongeladas por HMO y por HCO de las salsas elaboradas con LDP y APS se muestra en la figura IV.13. Las figuras IV.13 A y C muestran el perfil electroforético de las muestras en presencia de ditioneitol (DTT). Este compuesto es un potente agente reductor que actúa sobre los puentes disulfuro presentes dentro de las cadenas proteicas y entre proteínas. De este modo se observaron en su estado nativo las principales proteínas que se encuentran en las salsas elaboradas con leche desnatada en polvo (LDP) —figura IV.13 A— y con aislado de proteína de soja (APS) —figura IV.13 C—.

**Tabla IV.8.** Medias de los parámetros fisicoquímicos analizados en las salsas elaboradas con leche desnatada en polvo (LDP). R: salsas recién elaboradas; HMO: salsas descongeladas en horno microondas; HCO: salsas descongeladas en horno convencional.

Tratamiento	Parámetros químicos						
	Humedad (%)	Proteína total (g/100g)	Proteína soluble (g/100g)	Índice de acidez	K <sub>232</sub>	K <sub>270</sub>	Poder reductor (mg glucosa/g b.s.)
R	83.42 (0.07) <sup>a</sup>	3.35 (0.18) <sup>a</sup>	0.44 (0.09) <sup>a</sup>	0.92 (0.04) <sup>a</sup>	4.80 (0.20) <sup>a</sup>	1.21 (0.58) <sup>a</sup>	6.88 (1.06) <sup>a</sup>
HMO	82.80 (0.23) <sup>c</sup>	3.75 (0.07) <sup>b</sup>	0.50 (0.05) <sup>a</sup>	0.89 (0.03) <sup>a</sup>	5.67 (0.64) <sup>b</sup>	1.61 (0.10) <sup>ab</sup>	8.42 (1.22) <sup>b</sup>
HCO	83.18 (0.17) <sup>b</sup>	3.46 (0.05) <sup>a</sup>	0.50 (0.15) <sup>a</sup>	0.91 (0.07) <sup>a</sup>	5.71 (0.28) <sup>b</sup>	1.88 (0.11) <sup>b</sup>	7.95 (0.64) <sup>ab</sup>

Los valores entre paréntesis representan la desviación estándar.

<sup>abc</sup>Medias con distinta letra para cada parámetro son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) según la prueba LSD de Fisher.

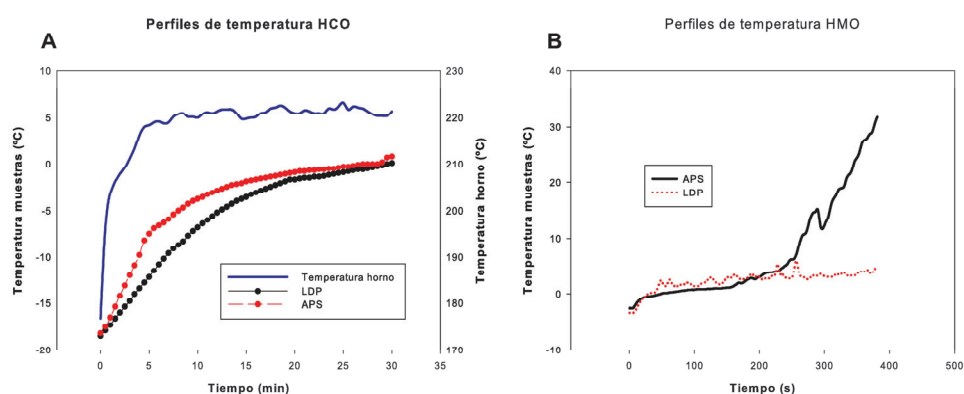
**Tabla IV.9.** Medias de los parámetros fisicoquímicos analizados en las salsas elaboradas con aislado de proteína de soja (ASP). R: salsas recién elaboradas; HMO: salsas descongeladas en horno microondas; HCO: salsas descongeladas en horno convencional.

Tratamiento	Parámetros químicos						
	Humedad (%)	Proteína total (g/100g)	Proteína soluble (g/100g)	Índice de acidez	K <sub>232</sub>	K <sub>270</sub>	Poder reductor (mg glucosa/g b.s.)
R	87.02 (0.45) <sup>a</sup>	2.51 (0.04) <sup>a</sup>	0.49 (0.06) <sup>a</sup>	0.50 (0.04) <sup>a</sup>	5.32 (0.21) <sup>a</sup>	1.96 (0.18) <sup>a</sup>	2.34 (0.34) <sup>a</sup>
HMO	86.06 (0.51) <sup>b</sup>	2.58 (0.05) <sup>b</sup>	0.53 (0.04) <sup>ab</sup>	0.51 (0.04) <sup>a</sup>	5.54 (0.32) <sup>a</sup>	1.98 (0.08) <sup>a</sup>	2.61 (0.28) <sup>a</sup>
HCO	86.32 (0.65) <sup>b</sup>	2.62 (0.05) <sup>b</sup>	0.56 (0.03) <sup>b</sup>	0.61 (0.07) <sup>b</sup>	6.39 (0.32) <sup>b</sup>	2.10 (0.16) <sup>a</sup>	2.44 (0.29) <sup>a</sup>

Los valores entre paréntesis representan la desviación estándar.

<sup>ab</sup>Medias con distinta letra para cada parámetro son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) según la prueba LSD de Fisher.



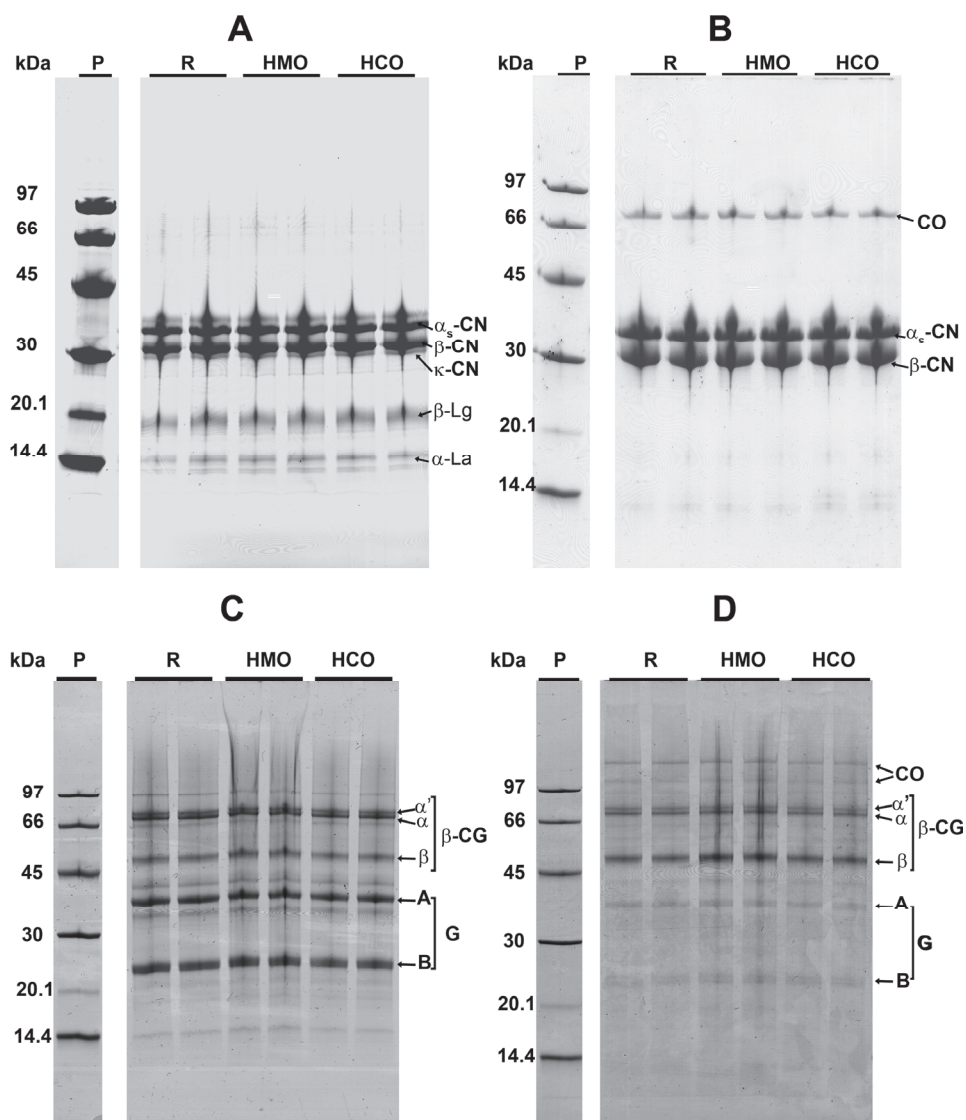


**Figura IV.12.** Perfil tiempo-temperatura de salsas elaboradas con leche desnatada en polvo (LDP) y aislado de proteína de soja (APS). A: descongelación en horno convencional. B: descongelación en horno microondas.

En las salsas con proteína láctea se pueden observar las caseínas entre los 27-35 kDa:  $\alpha_s$ -caseína (35 kDa),  $\beta$ -caseína (32 kDa) y  $\kappa$ -caseína (27 kDa). En la zona de menor peso molecular aparecen las dos principales proteínas del lactosuero:  $\beta$ -Lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) con un peso molecular de 18 kDa y  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -La) con 15 kDa. Según Holt y Zeece (1988), los pesos moleculares de las principales caseínas se encuentran en el intervalo de los 19-25 kDa. Los resultados obtenidos situaron a las caseínas con unos pesos moleculares superiores (27-35 kDa). Sin embargo, Basch et al. (1985) comprobaron que las caseínas se comportaban anormalmente al ser analizadas por SDS-PAGE, dando pesos moleculares superiores. Cheeseman y Jeffcoat (1970) indicaron que el ratio de unión del SDS a las caseínas variaba en función del tipo de caseína, produciéndose, además, un equilibrio competitivo entre la unión con el SDS y otras caseínas pudiendo afectar a su movilidad electroforética.

En las salsas con proteína de soja se observan bandas entre los 46-78 kDa correspondientes a las subunidades de la  $\beta$ -conglucina — $\alpha'$  (77 kDa),  $\alpha$  (71 kDa) y  $\beta$  (46 kDa)—. En la zona de menor peso molecular aparecen los dos principales polipéptidos que conforman las subunidades de la glicina —polipéptidos ácido A (38 kDa) y básico B (23 kDa)—. Los pesos moleculares obtenidos se corresponden con los descritos por otros autores (Arrese et al. 1991; Petruccioli y Anon 1995).

Resultados y discusión



**Figura.IV.13.** Perfiles electroforéticos (SDS-PAGE) de salsas preparadas con leche desnatada en polvo (A y B) y aislado de proteína de soja (C y D). A y C, electroforesis en condiciones reductoras. B y D; electroforesis en condiciones no reductoras. R: salsas recién elaboradas; HMO: salsas descongeladas en horno microondas; HCO: salsas descongeladas en horno convencional. P: patrón de pesos moleculares.  $\alpha_s$ -CN:  $\alpha_s$ -caseína;  $\beta$ -CN:  $\beta$ -caseína;  $\kappa$ -CN:  $\kappa$ -caseína;  $\alpha$ -La:  $\alpha$ -Lactoalbúmina;  $\beta$ -Lg:  $\beta$ -lactoglobulina.  $\beta$ -CG:  $\beta$ -conglucina; G: glicinina;  $\alpha'$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ : subunidades de la  $\beta$ -CG; A, B: cadenas polipeptídicas de la glicinina. CO: congregado.

En la figura IV.13 B se observa el perfil electroforético de las salsas con proteína láctea en condiciones no reductoras. Las bandas correspondientes a la  $\alpha$ -

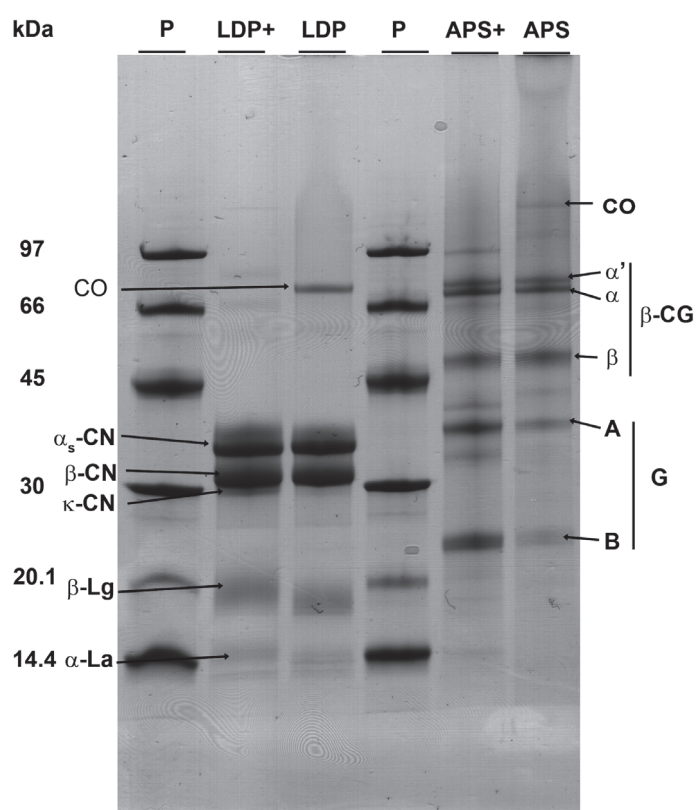
La,  $\beta$ -Lg y la  $\kappa$ -caseína desaparecen coincidiendo con la aparición de una nueva banda de 71 kDa. Durante el calentamiento, las proteínas de la leche pueden interactuar y formar complejos químicos: entre la  $\alpha$ -La y la  $\beta$ -Lg, entre la  $\alpha$ -La y la  $\kappa$ -caseína, así como entre la  $\beta$ -Lg y la  $\kappa$ -caseína. Estos complejos entre proteínas se denominan coagregados (Jovanovic et al. 2007). En la literatura, hay dos teorías que explican el mecanismo de formación de los coagregados. De acuerdo con la primera teoría, es un proceso en dos etapas: las proteínas desnaturalizadas del suero se agregan en un ratio dependiente de su concentración inicial. Estos complejos se asocian a continuación con las micelas de caseína durante el calentamiento prolongado (Corredig y Dalgleish 1996). La mayor interacción parece involucrar grupos tiol-disulfuro de la  $\beta$ -Lg desnaturalizada y la  $\kappa$ -caseína y la superficie de la micela. La segunda teoría según Mottar et al. (1989), indica que a temperaturas altas la  $\beta$ -Lg primero se desnaturaliza y luego interactúa con la caseína. Por su parte, (Jovanovic et al. 2007) mostraron que la propia preparación de la LDP provocaba un alto grado de desnaturalización, mostrando una banda electroforética de peso molecular 71 kDa que representa los coagregados entre la  $\kappa$ -caseína,  $\beta$ -Lg y  $\alpha$ -La. Cuando las muestras fueron tratadas con un agente reductor como el 2-mercaptoetanol, los coagregados identificados prácticamente desaparecían demostrando que estos complejos se forman a través de puentes disulfuro. Como resultado de la degradación de los coagregados con 2-mercaptoetanol las bandas correspondientes a la  $\alpha$ -La y  $\beta$ -Lg recuperaron intensidad, así como la zona correspondiente a la  $\kappa$ -caseína. Corredig y Dalgleish (1996) demostraron que el grado de interacción de las proteínas del lactosuero y las micelas de caseína de la leche cruda aumenta con el tiempo y la temperatura de tratamiento, mientras que el aumento de  $\alpha$ -La asociada aumenta a temperaturas entre 80 y 110 °C. En el caso expuesto por Jovanovic et al. (2007) con la leche desnatada en polvo reconstituida, se observó que la  $\alpha$ -La participaba en alto grado en los coagregados incluso a temperaturas bajas (75 °C). Esto implicaba que la mayoría de la  $\alpha$ -La de la leche desnatada ya habría sido previamente desnaturalizada durante la elaboración de la leche en polvo.

### *Resultados y discusión*

En las salsas con proteína láctea se utiliza LDP; durante la elaboración de este tipo de leche se producen distintos procesos térmicos como pasteurización, evaporación y secado en los que se emplean temperaturas superiores a los 70 °C en el primer y segundo proceso y contacto con aire caliente a temperaturas próximas a los 200 °C en el tercero (Oldfield et al. 2005). Era de esperar, por tanto, que los efectos térmicos significativos sobre las proteínas lácteas hayan tenido lugar en la elaboración de la LDP más que en la elaboración posterior de la salsa y su descongelación por HCO y HMO. En la figura IV.14 se muestra los perfiles electroforéticos de la LDP y APS utilizados como materia prima. Como se puede apreciar, los patrones de desarrollo electroforético de la LDP son similares a los de las salsas recién preparadas y las descongeladas por ambos métodos (figura IV.14). Esto confirma la teoría de que los cambios perceptibles mediante SDS-PAGE ya se habían producido en la propia elaboración de la materia prima.

En la figura IV.13 D se observa el perfil electroforético de las salsas elaboradas con APS en ausencia de DTT. El perfil electroforético es similar al de las muestras con DTT, detectándose las bandas correspondientes a la  $\beta$ -conglucina y glicina, no obstante se observan distintos coagregados alrededor de los 100 kDa que no aparecen en condiciones reductoras, lo que indicó la presencia de puentes disulfuro. Li et al (2007) y Petruccelli y Anon (1995) indicaron que la formación de estos coagregados implica uniones covalentes y no covalentes entre las subunidades  $\alpha$  y  $\alpha'$  de la  $\beta$ -conglucina y las subunidades A y B de la glicina.

Las muestras recién preparadas mantuvieron el mismo perfil que el APS que se utilizó como materia prima (figura IV.14) lo que indicó que el proceso de elaboración de la salsa no supuso condiciones de temperatura que produjeran cambios detectables mediante SDS-PAGE. Asimismo, el método de descongelación no pareció afectar al patrón electroforético de las diferentes muestras, puesto que no se observaron diferencias notables en las carreras correspondientes a las muestras descongeladas por HMO o por HCO, ni entre éstas y las muestras recién elaboradas (figura IV.13 C y D).



**Figura IV.14.** Perfiles electroforéticos (SDS-PAGE) de las materias primas empleadas como fuente de proteínas en las salsas: leche desnatada en polvo (LDP) y aislado de proteína de soja (APS).

Electroforesis en condiciones reductoras (LDP+, APS+) y no reductoras (LDP, APS). P: patrón de pesos moleculares.  $\alpha_s$ -CN:  $\alpha_s$ -caseína;  $\beta$ -CN:  $\beta$ -caseína;  $\kappa$ -CN:  $\kappa$ -caseína;  $\alpha$ -La:  $\alpha$ -Lactoalbúmina;  $\beta$ -Lg:  $\beta$ -lactoglobulina.  $\beta$ -CG:  $\beta$ -conglucina; G: glicina;  $\alpha'$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ : subunidades de la  $\beta$ -CG; A, B: cadenas polipeptídicas de la glicina. CO: congregado.

#### IV.3.1.2. ANÁLISIS LIPÍDICO

En las salsas elaboradas con proteína láctea no se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en los valores del índice de acidez entre las diferentes muestras analizadas, lo que indicó ausencia de lipólisis durante ambos tratamientos de descongelación.

Sin embargo, los valores de  $k_{232}$  y  $k_{270}$  de las salsas con proteína láctea descongeladas por HCO difirieron significativamente ( $P < 0.05$ ) con respecto a las muestras recién elaboradas y las descongeladas por HMO (Tabla IV.8). Los

### *Resultados y discusión*

parámetros  $k_{232}$  y  $k_{270}$  indican principalmente la conjugación de trienos y la presencia de productos secundarios de oxidación, respectivamente (Malheiro et al. 2009). Los productos de oxidación secundarios (principalmente  $\alpha$  y  $\beta$ -dicetonas y  $\alpha$ -cetonas insaturadas) se formaron durante la descongelación debido al calor. Albi et al. (1997) estudiaron muestras de aceites vegetales calentadas en HCO y HMO y vieron que el valor de los parámetros  $k_{232}$  y  $k_{270}$  se veía más afectado por el aumento de temperatura generado que por las propias microondas. El tiempo de calentamiento en HCO era considerablemente mayor que en HMO, lo que pudo favorecer la formación de compuestos secundarios de oxidación y justificar el relativamente elevado valor de los parámetros espectrofotométricos con respecto a las muestras recién elaboradas y descongeladas en HMO.

Por su parte, las salsas elaboradas con proteína de soja mostraron valores del índice de acidez y del  $k_{232}$  significativamente superiores ( $P < 0.05$ ) para las muestras descongeladas por HCO con respecto a las recién preparadas y a las descongeladas por HMO, lo que indicó una mayor liberación de ácidos grasos libres seguido de un mayor desarrollo de reacciones de oxidación primaria (Antolín y Meneses 2000). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en el parámetro  $k_{270}$  entre las diferentes muestras.

#### IV.3.1.3. ANÁLISIS DE LOS HIDRATOS DE CARBONO

La evaluación del efecto de la descongelación por HMO o por HCO sobre los hidratos de carbono se llevó a cabo mediante la medida del poder reductor de las salsas. Las salsas elaboradas con proteína láctea contienen lactosa procedente de la LDP y almidón modificado como fuentes de hidratos de carbono. Por otra parte, en las salsas elaboradas con APS la única fuente de hidratos de carbono presente es el almidón modificado.

La lactosa es un azúcar reductor, por poseer un grupo aldehído libre mientras que el almidón aunque presenta en los extremos grupos oxidables libres, tiene un tamaño molecular tal que hace que el poder reductor de la molécula sea prácticamente nulo. Aunque cuando la leche se somete a elevadas temperaturas es poco probable que se produzca la hidrólisis de la lactosa, esta molécula sí que

sufre reacciones de Maillard, reacciones que ya se han producido durante la elaboración de la LDP.

Las Tablas IV.8 y 9 muestran los resultados obtenidos tras analizar el poder reductor de las salsas con LDP y ASP. En el caso de las salsas con proteína láctea, los valores más elevados los presenta la salsa descongelada por HMO, seguida de la descongelada en HCO y la recién preparada. Esto podría deberse a que el proceso de descongelación indujera una hidrólisis parcial de las moléculas de amilosa y amilopectina. No obstante, estas diferencias fueron sólo significativas ( $P < 0.05$ ) entre las muestras tratadas por HMO y las recién preparadas. Este hecho podría indicar que las microondas afectan de una manera más directa a la fracción de hidratos de carbono favoreciendo la disrupción de sus polímeros y como consecuencia la aparición de un mayor número de grupos reductores. Rashed Khan et al. (1979) observaron que el almidón se hidrolizaba parcialmente dando lugar a moléculas de glucosa en soluciones de almidón en agua a distintas concentraciones (10, 20 y 30%) sometidas a calentamiento por MO durante diferentes tiempos (16, 18 y 20 min).

En cuanto a las salsas preparadas con APS, las diferencias en el valor del poder reductor entre las distintas muestras no fueron significativas ( $P > 0.05$ ) lo que indicó la estabilidad de la fracción de hidratos de carbono frente al proceso de descongelación. No obstante, los valores más elevados los presenta la salsa descongelada por HMO seguida de la descongelada en HCO y la recién preparada.

#### IV.3.1.4. SINÉRESIS

La cuantificación de la sinéresis tras almacenamiento en congelación a diferentes tiempos se muestra en la tabla IV.10. No existieron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en función del tiempo de congelación tanto para las muestras elaboradas con proteína láctea como de soja, siendo la cantidad de líquido exudado mínima. El almidón modificado empleado (AHAF) es céreo, por lo tanto el contenido en amilosa es residual lo que limita la retrogradación y la sinéresis. La proteína junto con el almidón conformaron un entramado con una



## Resultados y discusión

capacidad de retención de agua elevada que confirió al producto una adecuada estabilidad frente al proceso de congelación-descongelación.

**Tabla IV.10.** Sinéresis en función del tiempo de almacenamiento en congelación (-18 °C).

Tipo de salsa	Tiempo de congelación (h)				
	0	48	96	168	336
LDP	0.40 (0.12) <sup>a</sup>	0.38 (0.16) <sup>a</sup>	0.49 (0.15) <sup>a</sup>	0.45 (0.11) <sup>a</sup>	0.43 (0.21) <sup>a</sup>
APS	0.39 (0.08) <sup>a</sup>	0.40 (0.18) <sup>a</sup>	0.45 (0.17) <sup>a</sup>	0.40 (0.18) <sup>a</sup>	0.41 (0.17) <sup>a</sup>

Valores entre paréntesis muestran la desviación estándar.

<sup>a</sup> En la misma fila, medias con diferente letra son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) según la prueba LSD de Fisher.

LDP: salsas elaboradas con leche desnatada en polvo; APS: salsas elaboradas con aislado de proteína de soja.

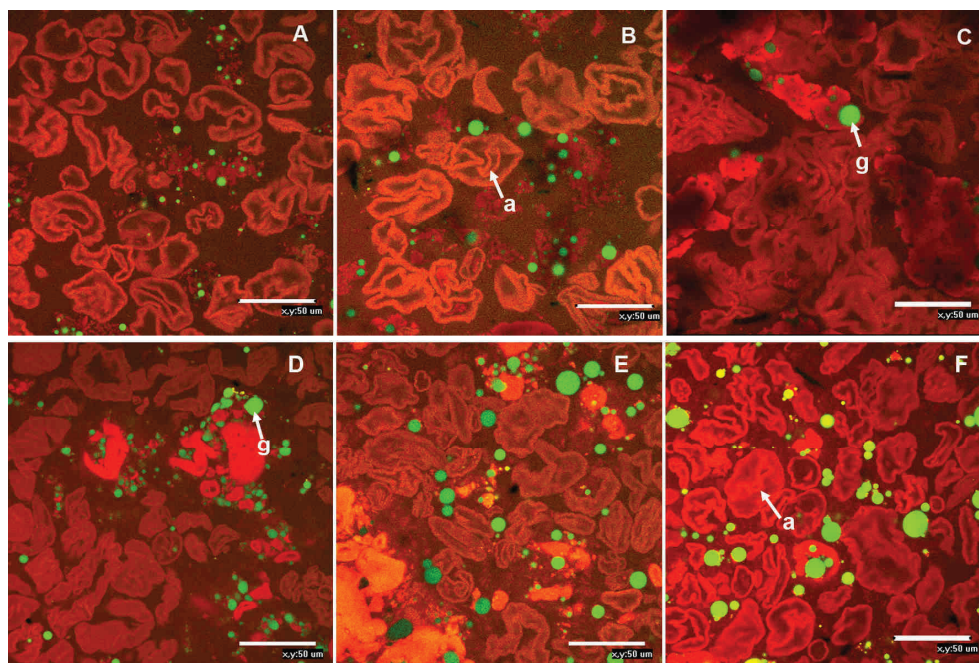
### IV.3.2. MICROESTRUCTURA

La figura IV.15 muestra las micrografías tomadas mediante Microscopía Láser Confocal de Barrido (CLSM) de las salsas elaboradas con proteína láctea y de soja. Las salsas recién preparadas (figura IV.15 A y D) presentan una matriz formada por proteína y polímeros de almidón liberados al medio, donde se encuentran inmersos los gránulos de almidón que han resistido parcialmente el calentamiento al que han sido sometidos durante la preparación de las salsas. Los glóbulos de grasa se mantienen dispersos y asociados a la fase proteica.

En las salsas elaboradas con proteína láctea descongeladas por HMO —figura IV.15 B— los gránulos de almidón se encuentran ligeramente más hinchados que los correspondientes a las salsas recién preparadas, mientras que los que se observan en las salsas descongeladas por HCO (figura IV.15 C) se encuentran gelatinizados con un mayor grado de liberación de polímeros al medio. Esta diferencia en el grado de gelatinización pudo deberse a la diferencia entre el tiempo de descongelación entre un método y otro, siendo mucho mayor en el caso de las muestras descongeladas por HCO. Los glóbulos de grasa se encuentran estabilizados por la fase proteica y se puede observar un aumento de su tamaño cuando las muestras son descongeladas, debido a la coalescencia producida por el calentamiento. No obstante este aumento no fue significativo ( $P > 0.05$ ) aunque



sí se encontró una disminución en la *circularidad* de los glóbulos de grasa en ambos métodos de descongelación con respecto a la salsa recién elaborada (tabla IV.11).



**Figura.IV.15.** Microscopía láser confocal (CLSM) de salsas elaboradas con leche desnatada en polvo (A, B y C) o aislado de proteína de soja (D, E y F). Salsas recién elaboradas (A y D), descongeladas en horno microondas (B y E) o en horno convencional (C y F). a: almidón; g: grasa. Escala: 50  $\mu\text{m}$ .

En las salsas elaboradas con proteína de soja (figura IV.15), el cambio microestructural más importante tuvo que ver principalmente con la *circularidad* y con el aumento en el tamaño de los glóbulos de grasa debido a la coalescencia tanto en las muestras descongeladas por HCO como por HMO, observándose un aumento significativo del *área*, expresada como percentil 80 ( $P_{80}$ ), para ambos tratamientos con respecto a las salsas recién elaboradas (tabla IV.11). Se empleó el  $P_{80}$  dado que las áreas no mostraron una distribución estadística normal (ver sección III.9.3.4). Sin embargo los gránulos de almidón hinchados no presentan diferencias aparentes entre las muestras descongeladas por HMO o por HCO, lo que podría indicar que la proteína de soja limita el hinchamiento y gelatinización

### Resultados y discusión

de los gránulos de almidón una vez cocinados con respecto a la proteína láctea, debido a su afinidad por el agua.

**Tabla IV.11.** Valores medios del percentil 80 del *área* ( $\mu\text{m}^2$ ) y la *circularidad* de los glóbulos de grasa de las muestras recién preparadas y las descongeladas en microondas durante 480 s.

Tratamiento	Tipo de salsa			
	LDP		APS	
	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Circularidad	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Circularidad
R	12.91 (3.13) <sup>a</sup>	0.881 (0.024) <sup>a</sup>	11.74 (2.75) <sup>a</sup>	0.874 (0.057) <sup>a</sup>
HMO	17.53 (6.18) <sup>a</sup>	0.843 (0.031) <sup>b</sup>	26.75 (6.06) <sup>b</sup>	0.832 (0.040) <sup>b</sup>
HCO	15.95 (4.82) <sup>a</sup>	0.834 (0.063) <sup>b</sup>	26.34 (4.79) <sup>b</sup>	0.839 (0.027) <sup>b</sup>

Los valores entre paréntesis representan la desviación estándar.

<sup>ab</sup> Valores con distinta letra dentro del mismo tipo de salsa y parámetro, indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) según la prueba LSD de Fisher.

R: salsas recién elaboradas; HMO: salsas descongeladas en horno microondas; HCO: salsas descongeladas en horno convencional.

#### **IV.4. ESTABILIDAD MICROESTRUCTURAL DE SALSAS ELABORADAS A DISTINTAS VELOCIDADES DE AGITACIÓN Y CON DISTINTOS TIPOS DE GRASA FRENTE AL PROCESO DE CONGELACIÓN–DESCONGELACIÓN**

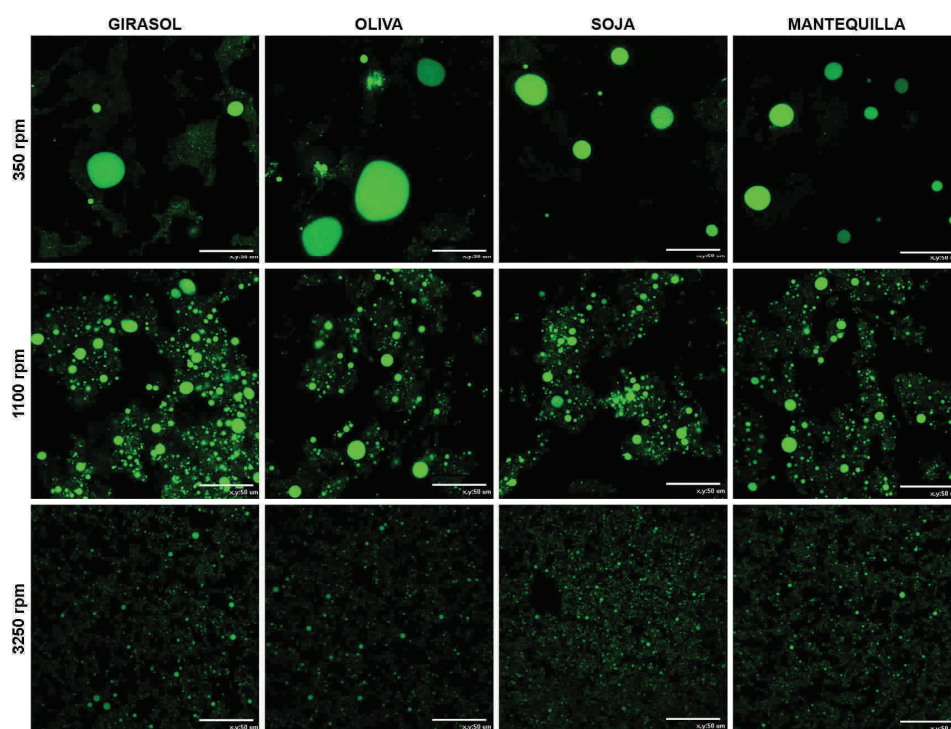
Tras el análisis de la estabilidad química de salsas con diferente composición proteica, se estudió la estabilidad microestructural de las salsas elaboradas a distintas velocidades de agitación con diferentes grasas. Asimismo, se analizó el efecto de la composición lipídica y la microestructural sobre las propiedades dieléctricas de las salsas.

##### **IV.4.1. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS RECIÉN PREPARADAS**

###### **IV.4.1.1. MICROSCOPIA LASER CONFOCAL DE BARRIDO (CLSM)**

La figura IV. 16 muestra las micrografías de las salsas recién preparadas obtenidas mediante CLSM donde se observan los glóbulos de grasa teñidos de verde mediante el uso del agente de tinción Nile red. A partir de esta figura se observa como el tamaño de estos glóbulos disminuyó a medida que aumentaba la velocidad de agitación durante la elaboración de la salsa. Langton et al. (1999) obtuvieron unos resultados similares cuando estudiaron la influencia de la velocidad de la elaboración de mayonesas en el tamaño de los glóbulos de grasa. En función del tipo de grasa empleada, se pudo observar que los glóbulos de grasa de aceite de oliva fueron ligeramente más grandes que cuando se usaron otras grasas en la elaboración de las salsas. Este hecho fue especialmente evidente a la menor velocidad de agitación (350 rpm).

## Resultados y discusión



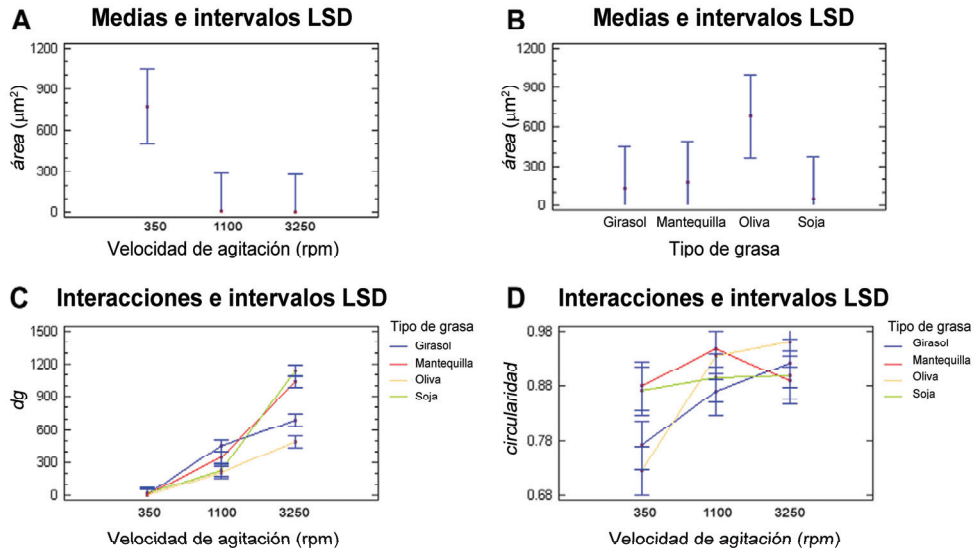
**Figura IV.16.** Microscopía láser confocal (CLSM). Muestras recién elaboradas preparadas con aceite de girasol, oliva, soja y mantequilla a velocidades de 350, 1100 y 3250 rpm. Escala: 50 µm.

### IV.4.1.2. ANÁLISIS DE IMAGEN

Mediante análisis de imagen de las micrografías de CLSM se cuantificaron el tamaño (*área*), la densidad de glóbulos de grasa (*dg*) y la forma (*circularidad*) de los glóbulos de grasa presentes en las muestras. Dado que las áreas de los glóbulos de grasa no siguieron una distribución normal en ninguna de las muestras analizadas, se utilizó el percentil 80 ( $P_{80}$ ) en lugar de la media aritmética como el parámetro estadístico adecuado (sección III.9.3.4). Para los parámetros *dg* y *circularidad* se empleó la media aritmética.

La figura IV.17 muestra los gráficos de medias para el *área* y los de interacciones para *dg* y *circularidad*, con intervalos LSD cuando varía el tipo de grasa y la velocidad de agitación en la elaboración de la salsa. Como ya se deducía a partir de la visualización de las micrografías, se observa que al aumentar la velocidad de agitación, se produce una disminución en el *área* de los

glóbulos de grasa (figura IV.17 A), que resultó significativa ( $P < 0.05$ ) al comparar las salsas elaboradas a 350 rpm con las elaboradas a 1100 y 3250 rpm. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en el *área* cuando varió el tipo de grasa utilizado (figura IV.17 B), aunque como ya se ha comentado anteriormente, fueron las muestras elaboradas con aceite de oliva las que presentaron glóbulos de grasa más grandes.



**Figura IV.17.** Gráficos de medias y de interacciones con intervalos LSD. A y B: medias para la variable respuesta *área* en función de la velocidad de agitación y tipo de grasa, respectivamente; C y D: interacción entre velocidad de agitación y tipo de grasa para las variables respuesta densidad de glóbulos de grasa por campo (*dg*) y *circularidad*, respectivamente.

Como consecuencia del aumento en la velocidad de agitación, se produjo un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) en *dg* tal y como muestra la IV.17 C. Este comportamiento se explica debido a que como consecuencia del aumento en la velocidad, los glóbulos se hacen más pequeños y, por tanto, aumenta el número de éstos por campo. No obstante, dicho aumento fue dependiente del tipo de grasa utilizado en la formulación de la salsa. En este sentido se comprueba que mientras que a 350 rpm, la *dg* de las distintas grasas fue similar, a 1100 y 3250 rpm la evolución fue distinta, siendo ésta más variable cuando se empleó la máxima velocidad. A 1100 rpm, fueron las muestras con aceite de girasol las que tuvieron mayor *dg*, seguidas por la mantequilla, mientras que las de aceite de oliva

### *Resultados y discusión*

y soja presentaron valores inferiores y similares. Cuando la velocidad aumentó a 3250 rpm, fueron las de aceite de soja y mantequilla las que presentaron los valores máximos de  $dg$ , siendo las de oliva las que presentaron los valores mínimos.

En cuanto a la *circularidad* de los glóbulos de grasa (figura IV.17 D), se observa que la velocidad de agitación afectó significativamente ( $P < 0.05$ ) a este parámetro, aunque lo hizo de forma diferente dependiendo del tipo de grasa que se empleó en la salsa. A excepción de las muestras con mantequilla, el resto de grasas experimentaron un aumento en la *circularidad* de los glóbulos de grasa conforme aumentó la velocidad. No obstante, este aumento únicamente fue significativo ( $P < 0.05$ ) para las muestras elaboradas con aceite de girasol (de  $0.77 \pm 0.18$  a 350 rpm hasta  $0.92 \pm 0.02$  a 3250 rpm) y de oliva (de  $0.72 \pm 0.07$  a 350 rpm hasta  $0.96 \pm 0.01$  a 3250 rpm), mientras que no lo fue ( $P > 0.05$ ) para las formuladas con aceite de soja donde la *circularidad* varió levemente entre  $0.87 \pm 0.01$  y  $0.90 \pm 0.02$  para las tres velocidades ensayadas. Estos resultados concuerdan con lo establecido por Langton et al. (1999), los cuales comprobaron que el aumento en la velocidad durante la elaboración de mayonesas conducía a glóbulos de grasa más esféricos. Resultados similares obtuvieron Brown et al. (1995) que observaron partículas más pequeñas y más circulares al aumentar la velocidad de agitación en geles de gelatina y agar. Esta tendencia de aumento de la *circularidad* con la velocidad, no se observó cuando fue la mantequilla la que se utilizó en la elaboración de la salsa. En este caso, no se produjeron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ).

#### IV.4.1.3. PROPIEDADES DIELECTRICAS

Como se ha mencionado anteriormente, el conocimiento de las propiedades dieléctricas (constante dieléctrica, factor de pérdidas y profundidad de penetración) es esencial para entender el patrón de calentamiento de los alimentos en el horno microwaves (HMO), así como su comportamiento durante el recalentamiento tras la congelación o la refrigeración (Prakash et al. 1992). Las emulsiones son dispersiones coloidales de partículas líquidas en otro líquido. El principal efecto de las sustancias coloidales es el de excluir del volumen total a materiales

dieléctricamente activos (principalmente agua) y, por tanto, disminuir la constante dieléctrica (Bengtsson y Risman 1971; Mudgett 1995). En sistemas multicomponente, dicha constante dieléctrica ( $\epsilon'$ ) disminuye debido a dos mecanismos: por un lado, el sustitución del agua por una sustancia con una  $\epsilon'$  mucho menor, como es el caso de las grasas y aceites, y por otro el ligado de moléculas de agua (Ryynänen 2002).

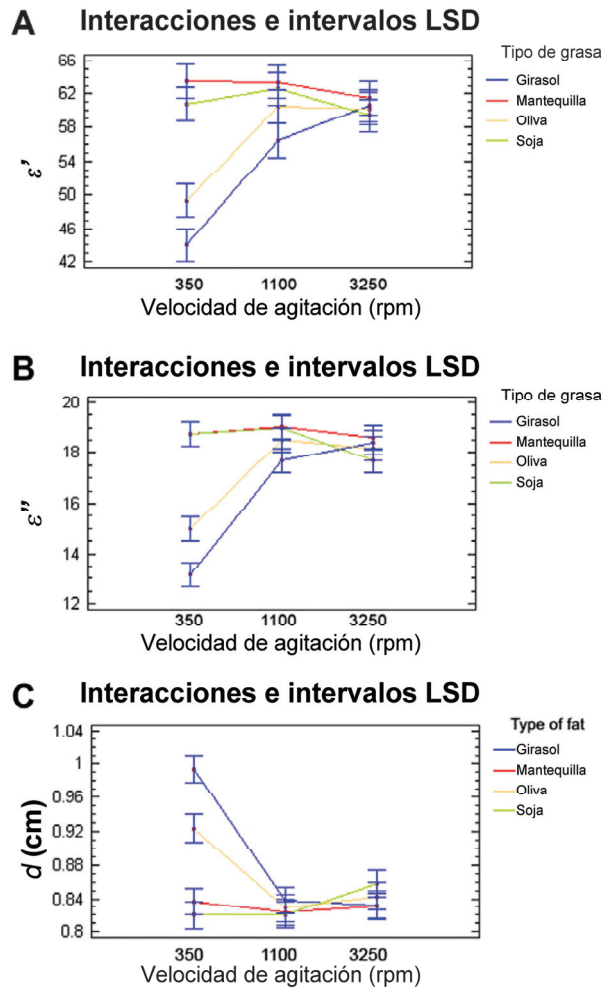
La figura IV.18 muestra los gráficos de interacciones con intervalos LSD para las propiedades dieléctricas de las muestras recién elaboradas cuando varía el tipo de grasa y la velocidad de agitación. Los resultados mostraron que existe una interacción significativa ( $P < 0.05$ ) entre la velocidad de agitación y el tipo de grasa que afecta a las propiedades dieléctricas.

En la figura IV.18 A se observa que la  $\epsilon'$  de todas las muestras, a excepción de las elaboradas con mantequilla, aumentó cuando la velocidad de agitación pasó de 350 a 1100 rpm. Sin embargo, este aumento únicamente fue significativo ( $P < 0.05$ ) para las que llevaban aceite de girasol y de oliva. Cuando la velocidad aumentó a 3250 rpm, la  $\epsilon'$  sólo aumentó significativamente ( $P < 0.05$ ) para las salsas elaboradas con aceite de girasol, mientras que no se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) para las formuladas con aceite de oliva y de soja. Por otro lado, la mantequilla ya partió de una  $\epsilon'$  elevada incluso a velocidades bajas (350 rpm) y no se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) conforme aumentó la velocidad. El aumento en la  $\epsilon'$  como consecuencia del aumento en la velocidad de agitación podría estar relacionado con el menor tamaño de partícula que se obtiene cuando aumenta la velocidad. Kaneko e Hirota (1985) comprobaron en emulsiones del tipo agua en aceite como la  $\epsilon'$  de las emulsiones que contenían partículas en suspensión más pequeñas era mayor que aquéllas que las contenían más grandes. Sin embargo, se sabe que cuando el tamaño de las partículas en suspensión es mucho menor que la longitud de onda de las microondas, comprendida entre 0.001 y 1 m (Decareau 1985), la  $\epsilon'$  del sistema depende únicamente de la forma de dichas partículas y no de su tamaño (Ryynänen 2002). Por tanto, el aumento en la  $\epsilon'$  al aumentar la velocidad de agitación podría explicarse también como consecuencia del aumento en la



## Resultados y discusión

*circularidad* que sufren los glóbulos de grasa conforme aumenta la velocidad tal y como observaron Langton et al. (1999) en mayonesas. Este hecho explicaría la mayor  $\epsilon'$  registrada para las salsas elaboradas con aceite de soja y mantequilla a velocidad de 350 rpm, cuyos glóbulos presentaron una *circularidad* mayor que para el aceite de girasol y de oliva (figura IV.17 D).



**Figura IV.18.** Gráficos de interacciones con intervalos LSD. A, B y C: interacción entre velocidad de agitación y tipo de grasa para las variables respuesta constante dieléctrica ( $\epsilon'$ ), factor de pérdidas ( $\epsilon''$ ) y profundidad de penetración ( $d$ ), respectivamente.



En cuanto al factor de pérdidas ( $\epsilon''$ ) en la figura IV.18 B se observa que el aumento de la velocidad de 350 a 1100 rpm hizo aumentar el  $\epsilon''$  significativamente ( $P < 0.05$ ) para las muestras elaboradas con aceite de girasol y de oliva. Por otro lado, el aumento de velocidad a 3250 rpm produjo una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) en el  $\epsilon''$  para las salsas formuladas con aceite de soja, mientras que no se produjeron variaciones en el resto de grasas estudiadas. De igual manera que para la  $\epsilon'$  se observa que, en general, el  $\epsilon''$  aumentó con la velocidad. La explicación a este comportamiento podría ser la misma que para el caso de la  $\epsilon'$ , es decir, el  $\epsilon''$  aumenta como consecuencia del aumento en la *circularidad* de los glóbulos de grasa al aumentar la velocidad de agitación. Dado que para un mejor calentamiento en el microondas interesa que el material presente un factor de pérdidas elevado, sería conveniente formular la salsa con el tipo de grasa que permita un mayor  $\epsilon''$  según la velocidad utilizada.

A partir de la constante dieléctrica y el factor de pérdidas se determinó la profundidad de penetración ( $d$ ). La influencia sobre dicha variable respuesta cuando varía la velocidad de agitación y el tipo de grasa utilizado en la formulación de la salsa se muestra en la figura IV.18 C. El aumento de velocidad de 350 a 1100 rpm, produjo una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) en  $d$  para las muestras elaboradas con aceite de girasol y de oliva, mientras que no le afectó a las formuladas con aceite de soja y mantequilla. Por otro lado, el aumento a 3250 rpm, produjo un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) en  $d$  para las muestras elaboradas con aceite de soja, mientras que no afectó significativamente ( $P > 0.05$ ) al resto. Dado que  $d$  es inversamente proporcional a la constante dieléctrica y al factor de pérdidas, es lógico que si éstas aumentan conforme lo hace la velocidad de agitación,  $d$  disminuya.

Cabe destacar que los resultados obtenidos se encontraron dentro del intervalo hallado en bibliografía (Calay et al. 1995; Ryyänen 2002) donde se muestra que los alimentos más comunes presentan constantes dieléctricas entre 30 y 80 y factores de pérdidas inferiores a 25 lo que supone profundidades de penetración entre 0.8 y 1.5 cm.

## IV.4.2. MUESTRAS SOMETIDAS AL CICLO DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN

### IV.4.2.1. MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL DE BARRIDO (CLSM)

La figura IV.19 presenta las micrografías obtenidas mediante la técnica CLSM para las muestras descongeladas por cada uno de los tratamientos estudiados (HCO y HMO) tras una semana de congelación a -18 °C, cuando varía el tipo de grasa y velocidad de agitación utilizados para la elaboración de la salsa.

De igual manera que sucedía para las muestras recién elaboradas (figura IV.16), se observa que a medida que aumentó la velocidad de agitación, los glóbulos de grasa disminuyeron de tamaño y aumentaron su *circularidad*. Como consecuencia de esta disminución en el tamaño aumentó la densidad de glóbulos de grasa (*dg*).

A partir de la figura, se comprueba como a una velocidad de 350 rpm, el *área* y *circularidad* de los glóbulos difiere según el tipo de grasa empleado en la elaboración de la salsa. Estas diferencias entre los distintos tipos de grasa no son tan apreciables a velocidades elevadas (1100 y 3250 rpm), como consecuencia de la mayor homogeneización que sufren las muestras al elevar la velocidad de agitación que permitió obtener glóbulos más uniformes en tamaño (*área*) y forma (*circularidad*).

Por otro lado, al comparar las muestras descongeladas utilizando HCO con las descongeladas haciendo uso HMO no se apreciaron diferencias importantes en el tamaño, *dg* y *circularidad* de los glóbulos.

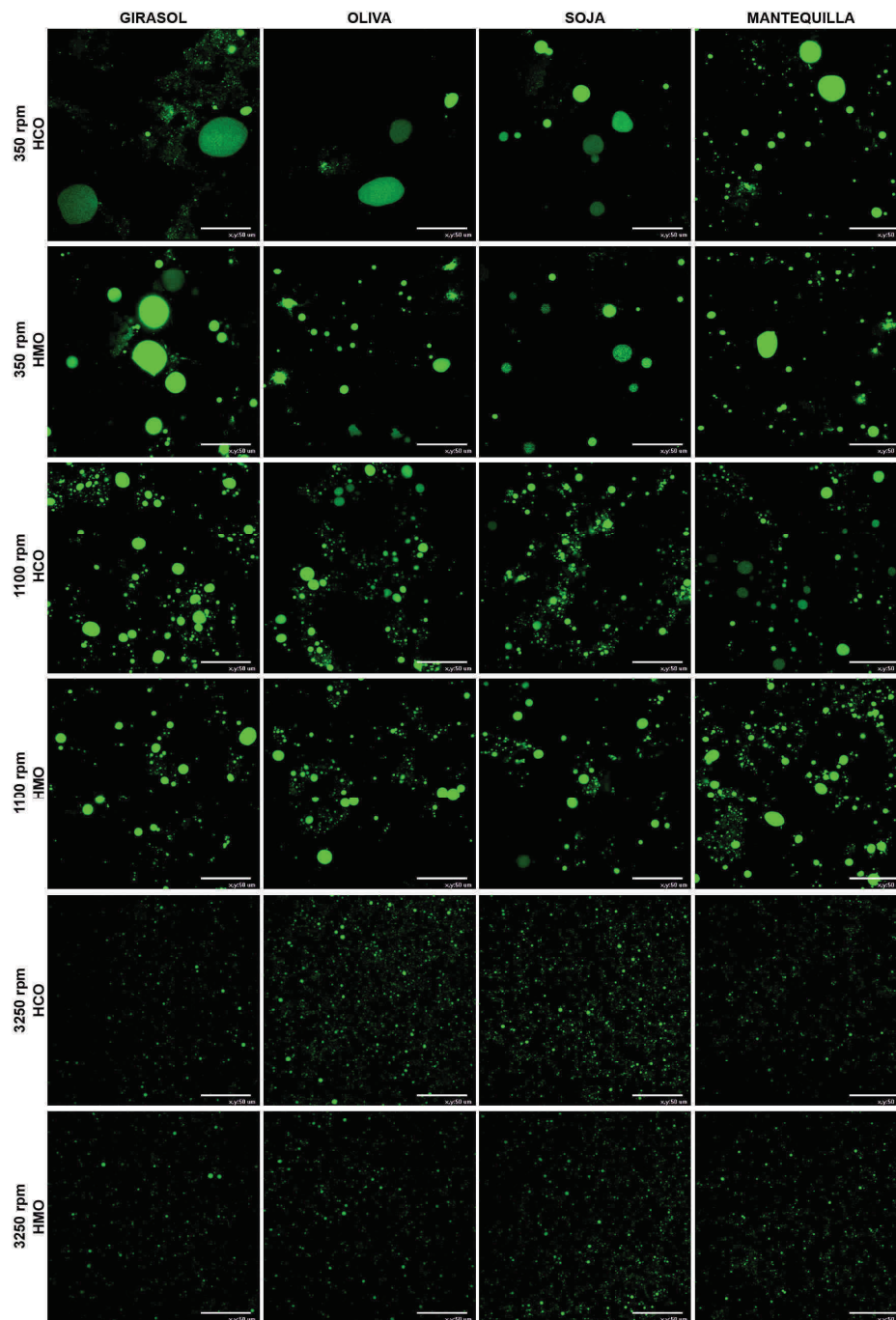
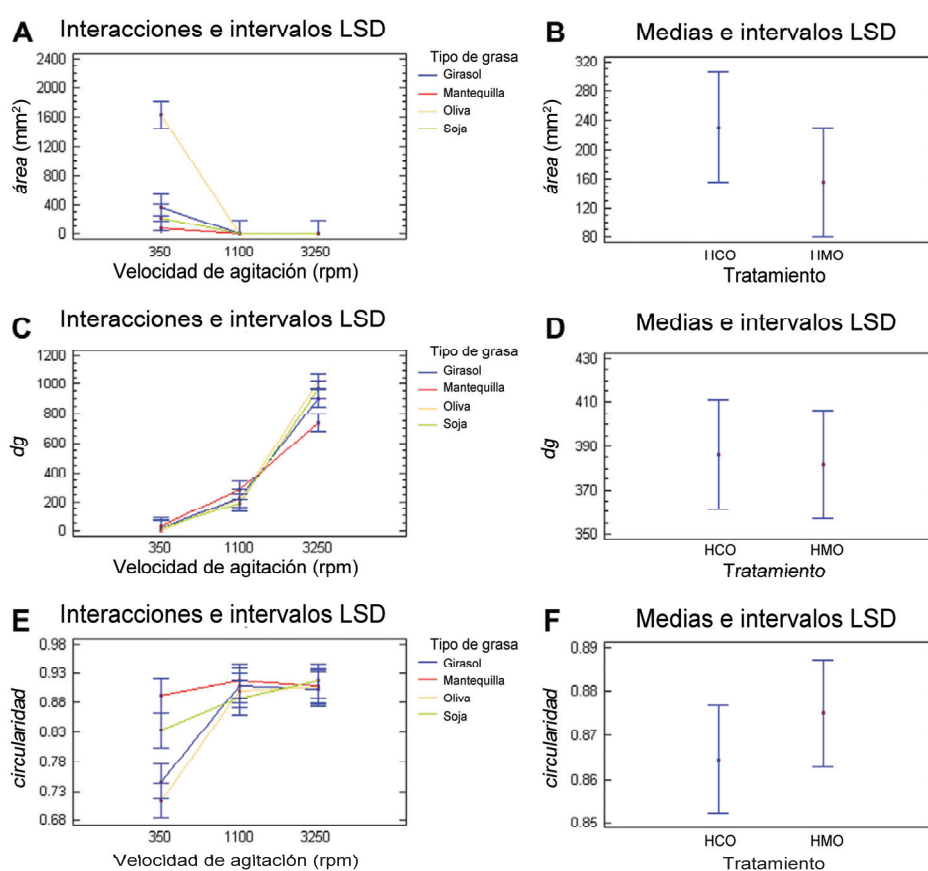


Figura IV.19. Microscopía láser confocal (CLSM). Muestras descongeladas en horno convencional (HCO) y horno microondas (HMO) elaboradas con aceite de girasol, oliva, soja y mantequilla a velocidades de 350, 1100 y 3250 rpm. Escala: 50 µm.

IV.4.2.2. ANÁLISIS DE IMAGEN

De la misma forma que para las muestras recién elaboradas, se realizó un análisis de imagen para cuantificar el *área*, *dg* y *circularidad* de las muestras sometidas al ciclo de congelación-descongelación. La figura IV.20 muestra los gráficos de interacciones y los de medias con intervalos LSD para las variables determinadas mediante análisis de imagen según el tipo de grasa, velocidad de agitación y tratamiento de descongelación utilizados.



**Figura IV.20.** Gráficos de interacciones y de medias con intervalos LSD. A, C y E: interacción entre velocidad de agitación y tipo de grasa para las variables respuesta *área*, densidad de glóbulos de grasa (*dg*) y *circularidad*, respectivamente. B, D y F: medias según tratamiento de descongelación para las variables respuesta *área*, densidad de glóbulos de grasa (*dg*) y *circularidad*, respectivamente.

A diferencia de lo que ocurría para las muestras recién elaboradas en las que el *área* de los glóbulos de grasa únicamente se vio afectada por la velocidad de agitación (figura IV.17 A), en este caso, el *área* de los glóbulos también dependió del tipo de grasa empleado en la formulación de la salsa (figura IV.20 A). Se observa que a medida que la velocidad de agitación aumentaba, el tamaño de los glóbulos de grasa disminuía. No obstante, esta disminución únicamente fue significativa ( $P < 0.05$ ) cuando se utilizó el aceite de oliva para elaborar la salsa. A 350 rpm, fue la muestra preparada con aceite de oliva la que presentó los glóbulos de grasa más grandes ( $P_{80} = 1627.7 \mu\text{m}^2$ ) de la misma forma que sucedía para las muestras recién elaboradas (figura IV.17 B). Por otro lado, se comprueba que a velocidades de 1100 y 3250 rpm no existieron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en el *área* independientemente del tipo de grasa empleado.

En la figura IV.20 B se muestra cómo varía el *área* de los glóbulos de grasa dependiendo del tratamiento de descongelación utilizado. No se observan diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos de descongelación empleados, aunque las muestras descongeladas en microondas (HMO) presentaron un tamaño inferior — $P_{80} = 155.9 \mu\text{m}^2$ — que las descongeladas en horno — $P_{80} = 230.8 \mu\text{m}^2$ —.

En cuanto a la variación en el número  $dg$ , en la figura IV.20 C se observa que, al igual que sucedía en las muestras recién elaboradas (figura IV.17 C), la velocidad de agitación supuso un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) de  $dg$  que fue dependiente del tipo de grasa utilizado. En este sentido, se observa que mientras que a 350 rpm la  $dg$  de todas las grasas fue similar, a 1100 y 3250 rpm ésta fue ligeramente variable. A 1100 rpm las muestras que presentaron mayor  $dg$  fueron las formuladas con mantequilla, mientras que a 3250 rpm fueron las elaboradas con aceite de oliva, siendo las de mantequilla las que tuvieron el menor valor.

La variación en  $dg$  para las muestras descongeladas en HCO y HMO se muestra en la figura IV.20 D. A partir de ésta se puede comprobar que el tratamiento de descongelación no afectó significativamente ( $P > 0.05$ ) a la  $dg$ .

### Resultados y discusión

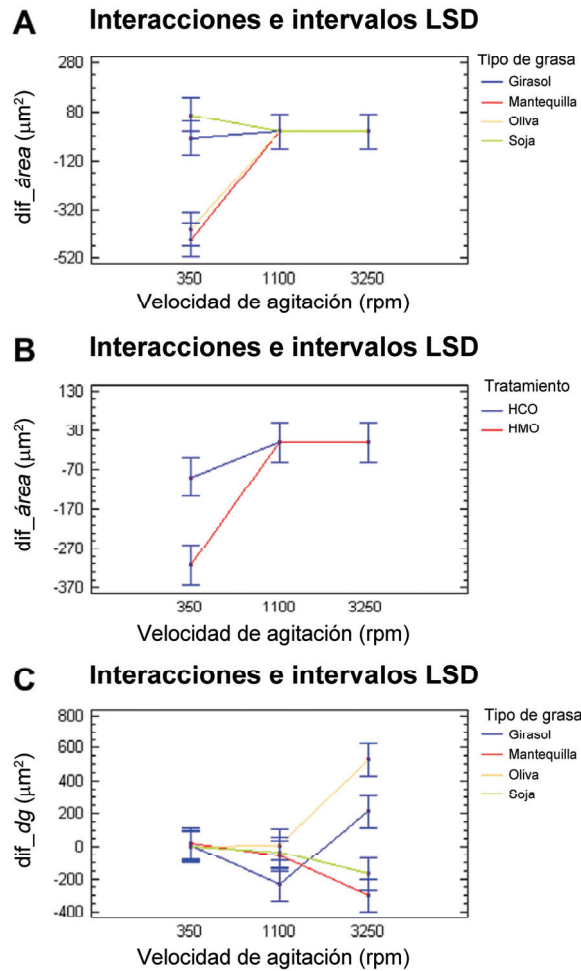
En la figura IV.20 E se muestra la variación en la *circularidad* de los glóbulos de grasa dependiendo de la velocidad de agitación y del tipo de grasa empleado. Se observa que la *circularidad* de los glóbulos de grasa se vio afectada significativamente ( $P < 0.05$ ) por la velocidad de agitación de la misma forma que sucedía para las muestras recién elaboradas (figura IV.17 D). El aumento de velocidad de 350 a 1100 rpm, produjo un aumento de la *circularidad* para todas las muestras, aunque únicamente resultó significativo ( $P < 0.05$ ) para las formuladas con aceite de girasol y de oliva. Sin embargo, a 3250 rpm, no se produjeron variaciones significativas ( $P > 0.05$ ) en la *circularidad* de los glóbulos independientemente del tipo de grasa utilizado. Es importante destacar que conforme aumentó la velocidad de agitación, disminuyó la variabilidad en la *circularidad* de las muestras formuladas con los distintos tipos de grasa a diferencia de lo que sucedía en las muestras recién elaboradas en las que el aumento de velocidad no supuso glóbulos de grasa de *circularidad* más uniforme.

Por último, aunque los glóbulos de grasa de las muestras descongeladas en MO fueron ligeramente más circulares que los de las descongeladas en horno (figura IV.20 F), no existieron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en la *circularidad* de los glóbulos según el tratamiento de descongelación utilizado.

#### IV.4.3. COMPARACIÓN ENTRE LAS MUESTRAS RECIÉN ELABORADAS Y LAS SOMETIDAS AL CICLO DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN

Para cuantificar el cambio experimentado en los glóbulos de grasa debido al hecho de congelar las muestras y posteriormente descongelarlas, se realizó un análisis estadístico. Las variables respuesta para este análisis son la diferencia del *área* (*dif\_área*), diferencia de la densidad de glóbulos (*dif\_dg*) y diferencia de *circularidad* (*dif\_circularidad*) entre las muestras sometidas al ciclo de congelación-descongelación y las recién elaboradas. En la figura IV.21 se muestran los gráficos de interacciones con intervalos LSD en los casos en que existieron interacciones significativas entre las muestras descongeladas y las recién elaboradas. La variable *dif\_circularidad* no resultó significativa ( $P > 0.05$ ) y, por tanto, los glóbulos

de grasa no experimentaron cambios en su *circularidad* por el hecho de someter a las muestras al ciclo de congelación-descongelación.



**Figura IV.21.** Gráficos de interacciones con intervalos LSD. A: interacción entre velocidad de agitación y tipo de grasa para la variable respuesta *dif\_área*. B: interacción entre velocidad de agitación y tratamiento de descongelación para la variable respuesta *dif\_área*. C: interacción entre velocidad de agitación y tipo de grasa para la variable respuesta *dif\_dg*.

En la figura IV.21 A se muestra la diferencia en el *área* (*dif\_área*) de los glóbulos de grasa entre las muestras sometidas al ciclo de congelación-descongelación y las recién elaboradas según el tipo de grasa y la velocidad de agitación. A partir de dicha figura se observa que a velocidades de 1100 y 3250

### *Resultados y discusión*

rpm el valor de la variable analizada fue próximo a cero ( $dif_{\text{área}} = 0$ ) independientemente del tipo de grasa empleado en la formulación de la salsa. Esto indica que no existen diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en el *área* de los glóbulos de las muestras descongeladas con respecto a las recién elaboradas y que, por tanto, las salsas son estables al ciclo de congelación-descongelación cuando se emplean estas velocidades. Es sabido que cuanto más pequeño es el glóbulo de grasa, más estable es la emulsión (Rousseau 2000). Este hecho podría explicar la estabilidad de las salsas a velocidades elevadas donde los glóbulos de grasa son más pequeños. Sin embargo, existen otras teorías (Vanapalli et al. 2002) que postulan que, en ciertas emulsiones, tamaños pequeños de partícula pueden favorecer la coalescencia parcial de la fase grasa provocando la desestabilización de la emulsión. Por otro lado, a 350 rpm, se observaron diferencias entre las muestras sometidas a tratamiento y las frescas lo que podría explicarse debido al mayor tamaño de glóbulo que provocaría la inestabilidad de la salsa. Estas diferencias variaron según el tipo de grasa que se empleó en la elaboración de la salsa. En este sentido, se observa que, al emplear aceite de girasol y de soja, el *área* de los glóbulos de las muestras tratadas no varió significativamente con respecto a las recién elaboradas; mientras que al utilizar aceite de oliva y mantequilla se produjo una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) en el tamaño de los glóbulos debido al hecho de someter a las muestras al ciclo de congelación-descongelación. Resultados similares obtuvieron Vanapalli et al. (2002) en el estudio de la estabilidad de diferentes emulsiones en las que comprobaron como el tipo de aceite tenía un efecto importante en la estabilidad de dichas emulsiones al ciclo de congelación-descongelación. El hecho de que no se observe coalescencia entre los glóbulos podría deberse al bajo contenido en grasa con el que se elaboraron las salsas (2.5% p/p). Guinee et al. (2000) demostraron que el agrupamiento y coalescencia de los glóbulos se veía favorecido por el aumento del contenido en grasa en los alimentos.

La variación en el tamaño de los glóbulos de grasa entre las muestras sometidas a tratamiento y las recién elaboradas, según la velocidad de agitación y el tratamiento de descongelación utilizados, se muestra en la figura IV.21 B. A partir de la figura, se comprueba que a 1100 y 3250 rpm no existieron diferencias



significativas ( $P > 0.05$ ) en el tamaño de los glóbulos de grasa entre las muestras sometidas al ciclo de congelación-descongelación y las recién elaboradas independientemente del tratamiento de descongelación utilizado. Sin embargo, a 350 rpm sí existieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las muestras descongeladas y las recién elaboradas. Esta diferencia fue mayor para las descongeladas en HMO que experimentaron una disminución en el tamaño de los glóbulos de grasa mayor que las descongeladas en horno. El calentamiento en el HMO se basa en la transformación de la energía del campo electromagnético alterno en calor (Vadivambal y Jayas 2010). El calor se produce debido a la fricción molecular de los dipolos permanentes dentro del material cuando intentan reorientarse a causa de la radiación electromagnética de las microondas (Meda et al. 2005). La vibración a la que son sometidas las moléculas durante la radiación de las microondas podría explicar que los glóbulos de grasa de las muestras descongeladas en HMO tengan un tamaño menor. La vibración podría provocar la ruptura de los glóbulos de grasa en otros más pequeños dando lugar a una disminución en el tamaño de partícula.

Por último, en la Figura IV.21 C se presenta la variación en  $dg$  entre las muestras sometidas a tratamiento y las recién elaboradas cuando varía el tipo de grasa y la velocidad de agitación en la elaboración de la salsa. A 350 rpm no se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en  $dg$  entre las muestras sometidas al ciclo de congelación-descongelación y las frescas independientemente del tipo de grasa empleado. Al aumentar la velocidad a 1100 rpm, únicamente se observó una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) en  $dg$  cuando se empleó aceite de girasol en la elaboración de la salsa. A 3250 rpm, se observaron dos tendencias diferentes en la variación de la  $dg$  de las muestras congeladas y descongeladas con respecto a las frescas dependiendo del tipo de grasa empleado en la elaboración de la salsa. En este sentido, se produjo una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) en  $dg$  al utilizar aceite de soja y mantequilla, mientras que al emplear aceite de girasol y de oliva se observó un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) en dicha variable debido al hecho de someter a las muestras a congelación-descongelación.



## **V. CONCLUSIONS**



## Conclusions

1. Corn starches (both native and modified) caused a significant decrease in the loss factor ( $P < 0.05$ ) when increasing their concentration. This had a negative effect on microwave heating efficiency, but it did not significantly affect the penetration depth ( $P > 0.05$ ). The decrease in the loss factor was related to a decrease of free water in the system.  $\iota$ ,  $\lambda$  and  $\kappa$ -carrageenans did not significantly affect the loss factor ( $P > 0.05$ ), so they could be used as a partial replacement for different types of starch to minimise the negative effect of starch in microwaveable formulations.

2. Salt was a positive factor for the loss factor but a negative one for penetration depth, so it could be useful to adjust its dosage as a way to optimise microwave heating for the type of product being prepared.

3. The flow properties and the dielectric properties of the different model systems showed no direct relation. In the starch systems, the decrease in free water and in the loss factor was related to an increase in consistency. In the carrageenan systems, consistency was not related to the system's free water and consequently was not related to dielectric properties either.

4. Sauces elaborated with different native and modified starches were rheologically stable to a refrigeration-microwave reheating process. Rheological properties only changed after long microwave reheating, which was related to dehydration rather than to structural changes.

5. The main microstructural changes occurred during heating were related to fat and protein phases. These changes were more evident when modified starches were used as granule swelling favoured protein aggregation and fat coalescence. In native starch sauces, fat globules remained homogeneously dispersed within the sauce matrix and their size was maintained regardless of the reheating time used. This fact is noticeable since small and homogeneously dispersed fat droplets could improve creaminess perception, especially in low-fat starch-based sauces.

6. In sauces elaborated with different type of protein (skimmed milk powder or soy protein isolate) no changes were detected in the protein chemical structure regardless cooking and thawing (microwave or conventional method). The lipid

### *Conclusions*

fraction was affected when conventional thawing was used, which was related to a longer treatment time. On the other hand, the reducing power was higher when microwave thawing was used which indicated a higher effect of microwaves on starch polymer breakdown. Finally, syneresis was not detected in all the samples indicating a high freeze-stability of the starch- $\lambda$ -carrageenan-protein mixture.

7. The microstructure of the sauces elaborated with different type of protein was affected by both thawing methods, mainly regarding fat globule size and morphology; these changes were significant ( $P < 0.05$ ) in the thawed soy protein sauces in comparison with the freshly-made ones. Moreover, it was shown that soy protein limited the starch granules swelling and gelatinisation which was related with soy protein water affinity.

8. In sauces formulated with modified starch, skim milk powder and different types of fat, it was shown that increasing the agitation speed caused changes in the microstructure of fat phase (size and morphology of the fat globules).

9. There was a significant increase in dielectric constant and loss factor for the sunflower and olive oil sauces when the agitation speed was increased from 350 to 1100 rpm. This fact would be related to decreased globular size and increased circularity as the agitation speed increased —thereby leading to a more homogeneous sauce.

10. The maximum values of dielectric constant and loss factor were obtained at 1100 rpm for butter and soy oil. The appropriate dielectric properties of soy oil that would facilitate microwave heating —along with its nutritional benefits— makes soy oil an ideal choice for sauces in ready-to-eat food products.

11. Thawing treatments (conventional and microwave oven) did not significantly affect ( $P > 0.05$ ) the fat globules size and shape regardless of the agitation speed and the type of fat. So, microwave thawing could be preferable compared to conventional thawing because of the energy savings, speed and convenience.

## **VI. REFERENCIAS**





- Aguilera J. M., Stanley D. W. 1999. Microstructural principles of food processing and engineering. Maryland: Aspen Publishers.
- Aguilera J. M. 2005. Why food microstructure? *Journal of Food Engineering* 67(1-2):3-11.
- Alajaji S. A., El-Adawy T. A. 2006. Nutritional composition of chickpea (*cicer arietinum* L.) as affected by microwave cooking and other traditional cooking methods. *Journal of Food Composition and Analysis* 19(8):806-812.
- Albi T., Lanzón A., Guinda A., Leon M., Perez-Camino M. C. 1997. Microwave and conventional heating effects on thermoxidative degradation of edible fats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(10):3795-3798.
- Antolín I. P., Meneses M. M. 2000. Aplicación de la espectrofotometría uv-visible al estudio de la estabilidad térmica de aceites vegetales comestibles. 2000. *Grasas y aceites*.
- AOAC. 1998. Official methods of analysis of AOAC International. Arlington, VA: AOAC International.
- Arltoft D., Ipsen R., Madsen F., de Vries J. 2007a. Interactions between carrageenans and milk proteins: A microstructural and rheological study. *Biomacromolecules* 8(2):729-736.
- Arltoft D., Madsen F., Ipsen R. 2007b. Screening of probes for specific localisation of polysaccharides. *Food Hydrocolloids* 21(7):1062-1071.
- Arocas A., Sanz T., Fiszman S. M. 2009a. Influence of corn starch type in the rheological properties of a white sauce after heating and freezing. *Food Hydrocolloids* 23(3):901-907.
- Arocas A., Sanz T., Fiszman S. M. 2009b. Clean label starches as thickeners in white sauces. Shearing, heating and freeze/thaw stability. *Food Hydrocolloids* 23(8):2031-2037.
- Arocas A., Sanz T., Fiszman S. M. 2009c. Improving effect of xanthan and locust bean gums on the freeze-thaw stability of white sauces made with different native starches. *Food Hydrocolloids* 23(8):2478-2484.
- Arocas A., Sanz T., Hernández-Carrión M., Hernando M.I, Fiszman S. 2010. Effect of cooking time and ingredients on the performance of different starches in white sauces. *European Food Research and Technology* 231(3):395-405.
- Arocas A., Sanz T., Hernando M. I., Fiszman S. M. 2011. Comparing microwave- and water bath-thawed starch-based sauces: Infrared thermography, rheology and microstructure. *Food Hydrocolloids* 25(6):1554-1562.
- Arrese E. L., Sorgentini D. A., Wagner J. R., Anon M. C. 1991. Electrophoretic, solubility and functional properties of commercial soy protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39(6):1029-1032.
- Auty M. A. E., Twomey M., Guinee T. P., Mulvihill D. M. 2001. Development and application of confocal scanning laser microscopy methods for studying the distribution of fat and protein in selected dairy products. *Journal of Dairy Research* 68(3):417-427.
- Badui S. 2006. Química de los alimentos. México: Pearson Education.
- Basch J. J., Douglas Jr F. W., Procino L. G., Holsinger V. H., Farrell Jr H. M. 1985. Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and whey protein concentrates, application of gel electrophoresis, and comparison with harland-ashworth procedure. *Journal of dairy science* 68(1):23-31.

## Referencias

- Bengtsson N. E., Risman P. O. 1971. Dielectric properties of food at 3 ghz as determined by a cavity perturbation technique. li. Measurement on food materials. *Journal of microwave power* 6:107-123.
- Bhattacharya S., Jena R. 2007. Gelling behavior of defatted soybean flour dispersions due to microwave treatment: Textural, oscillatory, microstructural and sensory properties. *Journal of Food Engineering* 78(4):1305-1314.
- Bilbao-Sáinz C., Butler M., Weaver T., Bent J. 2007. Wheat starch gelatinization under microwave irradiation and conduction heating. *Carbohydrate Polymers* 69(2):224-232.
- Bircan C., Barringer S. A. 1998. Salt-starch interactions as evidenced by viscosity and dielectric property measurements. *Journal of Food Science* 63(6):983-986.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2):248-254.
- Brown C. R. T., Foster T. J., Norton I. T. Underdown J. 1995. Influence of shear on the microstructure of mixed biopolymer systems. En: Harding, S. E., Hill, J. E. y Mitchel, J. R., editors. *Biopolymer mixtures*. Nottingham. p. 65-83.
- Calay R. K., Newborough M., Probert D., Calay P. S. 1995. Predictive equations for the dielectric properties of foods. *International Journal of Food Science & Technology* 29(6):699-713.
- Cerretani L., Bendini A., Rodriguez-Estrada M. T., Vittadini E., Chiavaro E. 2009. Microwave heating of different commercial categories of olive oil: Part i. Effect on chemical oxidative stability indices and phenolic compounds. *Food Chemistry* 115(4):1381-1388.
- Cocci E., Sacchetti G., Vallicelli M., Angioloni A., Dalla Rosa M. 2008. Spaghetti cooking by microwave oven: cooking kinetics and product quality. *Journal of Food Engineering* 85(4):537-546
- Corredig M., Dalgleish D. G. 1996. Effect of temperature and ph on the interactions of whey proteins with casein micelles in skim milk. *Food Research International* 29(1):49-55.
- Cheeseman G. C., Jeffcoat J. 1970. The interaction of bovine milk caseins with the detergent sodium dodecyl sulfate. 1. The relationship between the composition and the size of the protein-detergent aggregate. *Journal of Dairy Research* 37:245-257.
- Chewangkul L., Naivikul O., Garnjanagoonchorn W., Oates C. G., Siroth K., Suwonsichon T. 2001. Microstructural changes in instant noodles during production via triple staining and confocal laser scanning microscopy and scanning electron microscopy. *Kasetsart Journal Natural Science* 35(3):311-317.
- Datta A. K. 2001. Fundamentals of heat and moisture transport for microwaveable food product and process development. En: Datta, A. K. y Anantheswaran, R. C., editors. *Handbook of microwave technology for food applications*. New York: Marcel Dekker.
- de Wijk R. A., Terpstra M. E. J., Janssen A. M., Prinz J. F. 2006. Perceived creaminess of semi-solid foods. *Trends in Food Science & Technology* 17(8):412-422.

- Decareau R. V. 1985. *Microwaves in the food processing industry*. London: Academic Press Inc., Ltd.
- Dolz M., Hernández M. J., Delegido J. 2006. Oscillatory measurements for salad dressings stabilized with modified starch, xanthan gum, and locust bean gum. *Journal of Applied Polymer Science* 102(1):897-903.
- Dürrenberger M. B., Handschin S., Conde-Petit B., Escher F. 2001. Visualization of food structure by confocal laser scanning microscopy (clsm). *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 34(1):11-17.
- EEC. 1991. Commission regulation 2568/91. Annex 11. Official Journal of the European Union.
- Ferrando M., Spiess W. E. L. 2000. Review: Confocal scanning laser microscopy. A powerful tool in food science revision: Microscopía láser confocal de barrido. Una potente herramienta en la ciencia de los alimentos. *Food Science and Technology International* 6(4):267-284.
- Garnier C., Michon C., Durand S., Cuvelier G., Doublier J. L., Launay B. 2003. Iota-carrageenan/casein micelles interactions: Evidence at different scales. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 31(1-4):177-184.
- González-Tomás L., Bayarri S., Taylor A. J., Costell E. 2008. Rheology, flavour release and perception of low-fat dairy desserts. *International Dairy Journal* 18(8):858-866.
- Guinee T. P., Auty M. A. E., Fenelon M. A. 2000. The effect of fat content on the rheology, microstructure and heat-induced functional characteristics of cheddar cheese. *International Dairy Journal* 10(4):277-288.
- Gunaratne A., Corke H. 2007. Effect of hydroxypropylation and alkaline treatment in hydroxypropylation on some structural and physicochemical properties of heat-moisture treated wheat, potato and waxy maize starches. *Carbohydrate Polymers* 68(2):305-313.
- Gunasekaran S., Ding K. 1999. Three-dimensional characteristics of fat globules in cheddar cheese. *Journal of dairy science* 82(9):1890-1896.
- Gunasekaran S., Ak M. M. 2000. Dynamic oscillatory shear testing of foods — selected applications. *Trends in Food Science & Technology* 11(3):115-127.
- Hassanein M. M., El-Shami S. M., El-Mallah M. H. 2003. Changes occurring in vegetable oils composition due to microwave heating. *Grasas y aceites* 54(4):343-349.
- Hegenbart S. 1992. Microwave quality: Coming of age. *Food Products Design* 17:29-52.
- Herbert S., Bouchet B., Riaublanc A., Dufour E., Gallant D., J. 1999. Multiple fluorescence labelling of proteins, lipids and whey in dairy products using confocal microscopy. *Lait* 79(6):567-575.
- Heyman B., Depypere F., Delbaere C., Dewettinck K. 2010. Effects of non-starch hydrocolloids on the physicochemical properties and stability of a commercial béchamel sauce. *Journal of Food Engineering* 99(2):115-120.
- Holt D. L., Zeece M. G. 1988. Two-dimensional electrophoresis of bovine milk proteins. *Journal of dairy science* 71(8):2044-2050.
- Jang H. D., Swaisgood H. E. 1990. Disulfide bond formation between thermally denatured [beta]-lactoglobulin and [kappa]-casein in casein micelles. *Journal of dairy science* 73(4):900-904.

## Referencias

- Jovanovic S., Barac M., Macej O., Djurdjevic J. D. 2005. Page analysis of milk proteins altered by high thermal treatment. *Acta Alimentaria* 34(2):105-112.
- Jovanovic S., Barac M., Macej O., Vucic T., Lacnjevac C. 2007. Sds-page analysis of soluble proteins in reconstituted milk exposed to different heat treatments. *Sensors* 7(3):371-383.
- Kaneko H., Hirota S. 1985. Effect of particle size and stabilising agents upon dielectric properties of water-in-oil type emulsions. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 33(12):5484-5494.
- Keskin S., Sumnu G., Sahin S. 2007. A study on the effects of different gums on dielectric properties and quality of breads baked in infrared-microwave combination oven. *European Food Research and Technology* 224(3):329-334.
- Knudsen J. C., Skibsted L. H. 2010. High pressure effects on the structure of casein micelles in milk as studied by cryo-transmission electron microscopy. *Food Chemistry* 119(1):202-208.
- Kuchroo C. N., Fox P. F. 1982. Fractionation of the water-soluble-nitrogen from cheddar cheese. *Milchwissenschaft* 37(11):651-653.
- Lai V. M. F., Huang A. L., Lii C. Y. 1999. Rheological properties and phase transition of red algal polysaccharide-starch composites. *Food Hydrocolloids* 13(5):409-418.
- Langton M., Jordansson E., Altskär A., Sørensen C., Hermansson A. M. 1999. Microstructure and image analysis of mayonnaises. *Food Hydrocolloids* 13(2):113-125.
- Lewandowicz G., Fornal J., Walkowski A. 1997. Effect of microwave radiation on physico-chemical properties and structure of potato and tapioca starches. *Carbohydrate Polymers* 34(4):213-220.
- Lewandowicz G., Jankowski T., Fornal J. 2000. Effect of microwave radiation on physico-chemical properties and structure of cereal starches. *Carbohydrate Polymers* 42(2):193-199.
- Li J. Y., Yeh A. I., Fan K. L. 2007. Gelation characteristics and morphology of corn starch/soy protein concentrate composites during heating. *Journal of Food Engineering* 78(4):1240-1247.
- Lim H. S., Narsimhan G. 2006. Pasting and rheological behavior of soy protein-based pudding. *LWT - Food Science and Technology* 39(4):344-350.
- Liu H.-H., Kuo M.-I. 2011. Effect of microwave heating on the viscoelastic property and microstructure of soy protein isolate gel. *Journal of Texture Studies* 42(1):1-9.
- Llorca E., Hernando I., Pérez-Munuera I., Quiles A., Larrea V., Fiszman S. M., Lluch M. Á. 2005. Microstructural study of frozen batter-coated squid rings prepared by an innovative process without a pre-frying step. *Food Hydrocolloids* 19(2):297-302.
- Malheiro R., Oliveira I., Vilas-Boas M., Falcão S., Bento A., Pereira J. A. 2009. Effect of microwave heating with different exposure times on physical and chemical parameters of olive oil. *Food and Chemical Toxicology* 47(1):92-97.
- Mandala I. G., Savvas T. P., Kostaropoulos A. E. 2004. Xanthan and locust bean gum influence on the rheology and structure of a white model-sauce. *Journal of Food Engineering* 64(3):335-342.

- Mandala I. G., Sotirakoglou K. 2005. Effect of frozen storage and microwave reheating on some physical attributes of fresh bread containing hydrocolloids. *Food Hydrocolloids* 19(4):709-719.
- Mandala I. G. 2005. Physical properties of fresh and frozen stored, microwave-reheated breads, containing hydrocolloids. *Journal of Food Engineering* 66(3):291-300.
- Mason W. R. 2009. Starch use in foods. En: James, B. y Roy, W., editors. *Starch (third edition)*. San Diego: Academic Press. p. 745-795.
- Meda V., Orsat V., Raghavan G. 2005. Microwave heating and dielectric properties of foods. En: Schubert, H. y Regier, M., editors. *The microwave processing of foods*. Cambridge: CRC Press. p. 61-75.
- Mercasa. 2011. Alimentación en España. Especies condimentos y salsas. [http://www.munimerca.es/mercasa/alimentacion\\_2011/pdfs/pag\\_407-417\\_Especies.pdf](http://www.munimerca.es/mercasa/alimentacion_2011/pdfs/pag_407-417_Especies.pdf)
- Michel A. S., Mestdagh M. M., Axelos M. A. V. 1997. Physico-chemical properties of carrageenan gels in presence of various cations. *International Journal of Biological Macromolecules* 21(1-2):195-200.
- Miller L. A., Gordon J., Davis E. A. 1991. Dielectric and thermal transition properties of chemically modified starches during heating. *Cereal Chemistry* 68(5):441-448.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de España. 2010. La alimentación mes a mes. Diciembre 2010. [http://www.marm.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/diciembre\\_2010\\_tcm7-144521.pdf](http://www.marm.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/diciembre_2010_tcm7-144521.pdf)
- Moschakis T., Murray B. S., Dickinson E. 2005. Microstructural evolution of viscoelastic emulsions stabilised by sodium caseinate and xanthan gum. *Journal of Colloid and Interface Science* 284(2):714-728.
- Moschakis T., Murray B. S., Biliaderis C. G. 2010. Modifications in stability and structure of whey protein-coated o/w emulsions by interacting chitosan and gum arabic mixed dispersions. *Food Hydrocolloids* 24(1):8-17.
- Mottar J., Bassier A., Joniau M., Baert J. 1989. Effect of heat-induced association of whey proteins and casein micelles on yogurt texture. *Journal of dairy science* 72(9):2247-2256.
- Motwani T., Seetharaman K., Anantheswaran R. C. 2007. Dielectric properties of starch slurries as influenced by starch concentration and gelatinization. *Carbohydrate Polymers* 67(1):73-79.
- Mudgett R. E. 1995. Electrical properties of foods. En: Rao, M. A. y Rizvi, S. S. H., editors. *Engineering properties of foods*. New York. p. 389-455.
- Ndife M. K., Sumnu G., Bayindirli L. 1998. Dielectric properties of six different species of starch at 2450 mhz. *Food Research International* 31(1):43-52.
- Nelson S. O., Prakash A., Lawrence K. 1991. Moisture and temperature dependence of the permittivities of some hydrocolloids at 2.45 ghz. *Journal of Microwave power and electromagnetic energy* 26(3):178-185.
- O'Mahony J. A., Auty M. A., McSweeney P. L. 2005. The manufacture of miniature cheddar-type cheeses from milks with different fat globule size distributions. *Journal of Dairy Research* 72(03):338-348.
- Oldfield D. J., Taylor M. W., Singh H. 2005. Effect of preheating and other process parameters on whey protein reactions during skim milk powder manufacture. *International Dairy Journal* 15(5):501-511.



## Referencias

- Ong L., Dagastine R. R., Kentish S. E., Gras S. L. 2011. Microstructure of milk gel and cheese curd observed using cryo scanning electron microscopy and confocal microscopy. *LWT - Food Science and Technology* 44(5):1291-1302.
- Palav T., Seetharaman K. 2006. Mechanism of starch gelatinization and polymer leaching during microwave heating. *Carbohydrate Polymers* 65(3):364-370.
- Palav T., Seetharaman K. 2007. Impact of microwave heating on the physico-chemical properties of a starch-water model system. *Carbohydrate Polymers* 67(4):596-604.
- Parker R., Ring S. G. 2001. Aspects of the physical chemistry of starch. *Journal of Cereal Science* 34(1):1-17.
- Parris N., White A. E. Farrell H. M. 1990. Identification of altered proteins in nonfat dry milk powder prepared from heat-treated skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38(3):824-829.
- Pateras I. M. C., Howells K. F., Rosenthal A. J. 1994. Hot-stage microscopy of cake batter bubbles during simulated baking: Sucrose replacement by polydextrose. *Journal of Food Science* 59(1):168-170.
- Pertusa J. F. 2003. *Técnicas de análisis de imagen. Aplicaciones en biología.*: Universitat de València. Servei de Publicacions.
- Petrucelli S., Anon M. C. 1995. Soy protein isolate components and their interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43(7):1762-1767.
- Piyasena P., Ramaswamy H. S., Awuah G. B., Defelice C. 2003. Dielectric properties of starch solutions as influenced by temperature, concentration, frequency and salt. *Journal of Food Process Engineering* 26(1):93-119.
- Prakash A., Nelson S. O., Mangino M. E., Hansen P. M. T. 1992. Variation of microwave dielectric properties of hydrocolloids with moisture content, temperature and stoichiometric charge. *Food Hydrocolloids* 6(3):315-322.
- Rahman M. S. 1999. Handbook of food preservation. New York: Marcel Dekker.
- Rasheed Khan A., Johnson J. A., Robinson R. J. 1979. Degradation of starch polymers by microwave energy. *Cereal Chemistry* 56(4):303-304.
- Richardson N., Booth D., Stanley N. 1993. Effect of homogenization and fat content on oral perception of low and high viscosity model creams. *Journal of Sensory Studies* 8(2):133-143.
- Rosalina I., Bhattacharya M. 2002. Dynamic rheological measurements and analysis of starch gels. *Carbohydrate Polymers* 48(2):191-202.
- Rousseau D. 2000. Fat crystals and emulsion stability — a review. *Food Research International* 33(1):3-14.
- Russ J. C. 2005. Image analysis of food microstructure. Boca Ratón.: CRC Press.
- Russ J. C. 2006. The image processing handbook, fifth ed. Boca Ratón: CRC Press.
- Ryan K. J., Brewer M. S. 2007. In situ examination of starch granule-soy protein and wheat protein interactions. *Food Chemistry* 104(2):619-629.
- Ryynänen S., Risman P. O., Ohlsson T. 1996. The dielectric properties of native starch solutions - a research note. *Journal of microwave power and electromagnetic energy*. 31(1):50-53.
- Ryynänen S. 2002. Microwave heating uniformity of multicomponent prepared foods. Tesis doctoral. Universidad de Helsinki.

- Sakai N., Mao W., Koshima Y., Watanabe M. 2005. A method for developing model food system in microwave heating studies. *Journal of Food Engineering* 66(4):525-531.
- Shukla T. P. 1998. Microwaveable food ingredients. *Cereal foods world* 43(10):770-772.
- Sieber R., Eberhard P., Gallmann P. U. 1996. Heat treatment of milk in domestic microwave ovens. *International Dairy Journal* 6(3):231-246.
- Sikora M., Badrie N., Deisingh A. K., Kowalski S. 2008. Sauces and dressings: A review of properties and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48(1):50 - 77.
- Singh H. 1994. Cross-linking of milk proteins on heating concentrated milk at 120 °C. *International Dairy Journal* 4(6):477-489.
- Sriamornsak P., Thirawong N., Cheewatanakornkool K., Burapapadh K., Sae-Ngow W. 2008. Cryo-scanning electron microscopy (cryo-sem) as a tool for studying the ultrastructure during bead formation by ionotropic gelation of calcium pectinate. *International Journal of Pharmaceutics* 352(1-2):115-122.
- Steffee J. F. 1996. Rheological methods in food process engineering. East Lansing, Michigan (USA): Freeman Press.
- Sun E., Datta A., Lobo S. 1995. Composition-based prediction of dielectric properties of foods. *Journal of Microwave power and electromagnetic energy* 30(4):205-212.
- Tan I., Torley P. J., Halley P. J. 2008. Combined rheological and optical investigation of maize, barley and wheat starch gelatinisation. *Carbohydrate Polymers* 72(2):272-286.
- Tárrega A., Vélez-Ruiz J. F., Costell E. 2005. Influence of milk on the rheological behaviour of cross-linked waxy maize and tapioca starch dispersions. *Food Research International* 38(7):759-768.
- Tattiyakul J., Rao M. A., Datta A. K. 2002. Heat transfer to three canned fluids of different thermo-rheological behaviour under intermittent agitation. *Food and Bioprocess Processing* 80(1):20-27.
- Thanasukarn P., Pongsawatmanit R., McClements D. J. 2004. Influence of emulsifier type on freeze-thaw stability of hydrogenated palm oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids* 18(6):1033-1043.
- Thebaudin J. Y., Lefebvre A. C., Doublier J. L. 1998. Rheology of starch pastes from starches of different origins: Applications to starch-based sauces. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 31(4):354-360.
- Thomas D. J., Atwell W. A. 1999. Starches. Saint Paul Eagan Press, AACC.
- Thostenson E. T., Chou T. W. 1999. Microwave processing: Fundamentals and applications. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 30(9):1055-1071.
- Tromp R. H., van de Velde F., van Riel J., Paques M. 2001. Confocal scanning light microscopy (cslm) on mixtures of gelatine and polysaccharides. *Food Research International* 34(10):931-938.
- Umbach S. L., Davis E. A., Gordon J., Callaghan P. T. 1992. Water self-diffusion coefficients and dielectric properties determined for starch-gluten-water mixtures heated by microwave and by conventional methods. *Cereal Chemistry* 69:637-642.

## Referencias

- Vadivambal R., Jayas D. 2010. Non-uniform temperature distribution during microwave heating of food materials—a review. *Food and Bioprocess Technology* 3(2):161-171.
- Valero E., Villamiel M., Sanz J., Martínez-Castro I. 2000. Chemical and sensorial changes in milk pasteurised by microwave and conventional systems during cold storage. *Food Chemistry* 70(1):77-81.
- van de Velde F., van Riel J., Tromp R. H. 2002. Visualisation of starch granule morphologies using confocal scanning laser microscopy cslm. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82:1528-1536.
- van Vliet T., Martin A. H., Bos M. A. 2002. Gelation and interfacial behaviour of vegetable proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 7(5-6):462-468.
- Vanapalli S. A., Palanuwech J., Coupland J. N. 2002. Stability of emulsions to dispersed phase crystallization: Effect of oil type, dispersed phase volume fraction, and cooling rate. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 204(1-3):227-237.
- Vélez-Ruiz J., Hernando I., González-Tomás L., Pérez-Munuera I., Quiles A., Tárrega A., Lluch M. A., Costell E. 2006. Rheology and microstructure of custard model systems with cross-linked waxy maize starch. *Flavour and Fragrance Journal* 21(1):30-36.
- Villamiel M., Corzo N., Martínez-Castro I., Olano A. 1996. Chemical changes during microwave treatment of milk. *Food Chemistry* 56(4):385-388.
- Zhang H., Datta A. K. 2001. Electromagnetics of microwave heating: Magnitude and uniformity of energy absorption in an oven. *Microwave technology for food applications*. Nueva York: Marcel Dekker.



## **VII. ABREVIATURAS**



3D	Tridimensional
AAA	Adipato de dialmidón de maíz acetilado entrecruzado
ADC	Convertidor analógico-digital
AHAF	Fosfato de diálmidón de maíz hidroxipropilado de alto grado de entrecruzamiento
AHF	Fosfato de dialmidón de maíz hidroxipropilado entrecruzado
AN	Almidón de maíz nativo
ANC	Almidón de maíz nativo céreo
APS	Aislado de proteína de soja
b.s.	Base seca
CLSM	Microscopía láser confocal de barrido
CO	Calentamiento convencional
Cryo-SEM	Microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas
$d$	Profundidad de penetración de las microondas
$dg$	Densidad de glóbulos de grasa por campo
DTT	Ditiotreitol
$\epsilon'$	Constante dieléctrica
$\epsilon''$	Factor de pérdidas dieléctrico
$G'$	Módulo elástico o de almacenamiento
$G''$	Módulo viscoso o de pérdidas
HCO	Horno convencional
HMO	Horno microondas
$\iota$ -C	iota carragenato
$k$	índice de consistencia
$\kappa$ -C	kappa carragenato
$\lambda$ -C	lambda carragenato
LSD	"Least significant difference", test estadístico de Fischer
MDE	Mapa de distancias euclídeas
MO	Microondas
$n$	Índice de flujo
$P_{80}$	Percentil 80 del área de los objetos en la imagen
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
$\tan \delta$	Tangente de pérdidas



## **VIII. PUBLICACIONES**



L. M. Guardedeño, J. M. Catalá-Civera, P. Plaza-González, T. Sanz, A. Salvador, S.M. Fiszman, I. Hernando. 2010. Dielectrical, microstructural and flow properties of sauce model systems based on starch, gums and salt. *Journal of food engineering*, 98:34-43.

L. M. Guardedeño, T. Sanz, S.M. Fiszman, A. Quiles, I. Hernando. 2011. Microwave heating effect on rheology and microstructure of white sauces. *Journal of food Science*, 76(8):E544-E552.

L. M. Guardedeño, E. Llorca, I. Pérez-Munuera, A. Quiles I. Hernando. Chemical and structural changes in white sauces thawed by microwave or conventional oven. 2009. *Czech Journal of food Science*, 27:S290-S292.

M. Hernández-Carrión, L.M. Guardedeño, J.M. Carot, I. Pérez-Munuera, A. Quiles, I. Hernando. Structural stability of white sauces prepared with different types of fats and thawed in a microwave oven. 2011. *Journal of Food Engineering*, 104(4):557-564







Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Food Engineering

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jfoodeng](http://www.elsevier.com/locate/jfoodeng)

## Dielectrical, microstructural and flow properties of sauce model systems based on starch, gums and salt

L.M. Guardado<sup>a</sup>, J.M. Catalá-Civera<sup>b</sup>, P. Plaza-González<sup>b</sup>, T. Sanz<sup>c</sup>, A. Salvador<sup>c</sup>, S.M. Fiszman<sup>c,\*</sup>, I. Hernando<sup>a</sup><sup>a</sup> Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain<sup>b</sup> ITACA Research Institute, Universidad Politécnica de Valencia, Edif. 8-G, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain<sup>c</sup> Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Apartado de correos 73, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 13 March 2009

Received in revised form 4 December 2009

Accepted 7 December 2009

Available online 11 December 2009

## Keywords:

Sauces

Dielectric properties

Microwave

Microstructure

Starch

Carrageenan

Rheology

## ABSTRACT

The dielectric properties of salted systems based on different hydrocolloids (native or modified starches, or on  $\lambda$ ,  $\kappa$  or  $\gamma$  carrageenan) as models for microwavable white sauces were studied. Microstructural and rheological properties were also studied to better understand the dielectric behaviour.

As expected, salt had a significantly positive effect ( $p < 0.05$ ) on both dielectric properties. Raising the starch concentration significantly lowered ( $p < 0.05$ ) the loss factor, whereas increasing the carrageenan did not. None of the hydrocolloids significantly affected the penetration depth. The decrease in the loss factor could be related to a decrease in the free water content which was observed by Cryo-SEM. Free water and salt content seemed to be the major factors to control for microwave heating of hydrocolloid-thickened systems.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The ready-to-eat meal sector is a steadily-growing market. This is mainly due to today's lifestyle, higher purchasing power and smaller family units, all of which have brought about new consumption habits characterized by increased demand for ready-to-eat products which are easy to prepare and consume and do not sacrifice sensory quality. Using microwave (MW) ovens to heat food has become a regular practice in most homes and offices because they are quick, easy to use and save energy.

Heating occurs because the MW frequency is similar to the natural resonance frequency of water molecules, so its energy is easily absorbed by the water molecules in the food. The oscillation of molecules is delayed, producing a mechanical friction in the environment that results in the creation of heat (Decareau, 1985). However, it is very difficult to try to predict the behaviour of a food in a MW oven based on its composition (Calay et al., 1995; Sun et al., 1995). The fact that each type of food has a complex and unique heating pattern must be taken into account (Hegenbart, 1992). As a result, the current tendency is no longer to adapt existing formulations but to design food that is specifically suitable for MW heating (Meda et al., 2005).

The way in which food responds to the effects of MWs depends primarily on its dielectric properties (dielectric constant and loss factor), which determine the interaction between the electromagnetic energy and the materials in a macroscopic way (Metaxas and Meredith, 1983). In other words, along with water (the main source of microwave interactions), each of the components of a food item contribute to the food dielectrical properties forming a mass with a unique and complex microwave heating potential (Hegenbart, 1992). The dielectric constant ( $\epsilon'$ ) quantifies the capacity of a material to store energy and to polarize it when subjected to an electric field. The loss factor ( $\epsilon''$ ) is related to the amount of energy transformed into heat. From these two indices, the penetration depth ( $d$ ) can be obtained, which is defined as the depth at which energy decreases to 37% of its value on the surface of the material (Datta and Anantheswaran, 2001). Dielectric properties vary depending on different factors: moisture content is usually the most important, but the temperature, density and composition and structure of the food are also crucial. Regarding chemical composition, the most important factor is the presence of mobile ions and permanent dipolar moments associated with water and other molecules.

Many foods have sauces or liquid systems covering pieces of solid food (meat balls, lasagne, etc.). This continuous phase acts as a means of transmitting heat by conduction to the solid phase and also avoids its dehydration. Polysaccharide hydrocolloids are

\* Corresponding author. Tel.: +34 963 90 0022; fax: +34 963 63 6301.  
E-mail address: [sfiszman@iata.csic.es](mailto:sfiszman@iata.csic.es) (S.M. Fiszman).

widely used as thickeners in this type of liquid or semi-liquid system. They possess the characteristic of being able to bind water molecules and can affect the dielectric properties of food considerably by changing its hydration and viscosity properties (Miller et al., 1991). Although research has been carried out on the dielectric properties of different food systems (Bengtsson et al., 1963; Bengtsson and Risman, 1971; Jain and Voss, 1987; Mudgett et al., 1979; Nelson, 1978), information about systems with hydrocolloids is scarce; only Nelson et al. (1991) and Prakash et al. (1992) have studied the influence of moisture content, temperature and charge on the dielectric properties of different powdered (non hydrated) hydrocolloids (potato starch, locust bean gum, arabic gum, carrageenan and carboxymethylcellulose). They found that dielectric properties were highly dependent on the charge of the hydrocolloid. Temperature dependence of all samples increased as the moisture content rose, but it did so to a lesser degree in potato starch (very little charge) and to a much lesser degree in locust bean gum (neutral) than in the other three hydrocolloids.

No previous studies have evaluated the dielectric properties of hydrated hydrocolloids. The majority of hydrocolloid applications in food, such as their use as thickeners in sauces, requires them to be well dispersed and hydrated to perform their function. As hydrocolloids affect the rheological properties of food systems, the study of the relationship between rheological, structural and dielectric properties is an important concern for appropriate product development. The relationship between rheological, structural and dielectric properties has never previously been studied in any food system.

The aim of this study was to analyze the performance of different hydrocolloids (starchy and non-starchy) in white sauce model systems in order to identify microwaveable formulations. To this end, their dielectric, microstructure, and rheological properties were investigated and the relationships among them established.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Ingredients

Native corn starch (C Gel 03401) and modified waxy corn starch (hydroxypropyl distarch phosphate, C Polar Tex 06748) from Cargill, Inc., Minneapolis, USA; ι-carrageenan (Secovis IS) and λ-carrageenan (Secolacta BR) from Hispanagar, Burgos, Spain; κ-carrageenan (Satiagel RPI 740) from Degussa, Essen, Germany; and sodium chloride from Panreac Química SAU, Barcelona, Spain were used.

### 2.2. Sample preparation and experimental design

A typical method of preparing sauces was followed: each sample was prepared by weighing the corresponding amount of salt and hydrocolloid (HC) and dissolving them in 100 g of water; this mixture was placed in a cooking device (Thermomix TM 31, Wuppertal, Germany), heated to 90 °C (17 °C/min) at 2000 rpm and kept at 90 °C at the same agitation speed for 6 min. The samples obtained were stored in plastic bottles and refrigerated for 24 h before being analyzed.

Five model systems prepared with the different HCs and salt were prepared and named as follows: native starch (NS), modified starch (MS), ι-carrageenan (ιC), λ-carrageenan (λC) and κ-carrageenan (κC). Response surface methodology was used to study the effect of two independent variables on the systems' properties. A central composite rotatable design with two factors (amount of salt and amount of each HC) was employed and five levels of each

**Table 1**

Composition of the model systems, with various levels of HC (hydrocolloid) and salt according to the surface response design.

Model system	Sample	HC (g/100 g water)	Salt (g/100 g water)
Native starch or modified starch	1–8	3.5	4
	9	3.5	7
	10	3.5	1
	11	1.7	1.9
	12	1.7	6.1
	13	6	4
	14	5.3	6.1
	15	1	4
ι or κ-Carrageenan	1–8	0.55	4
	9	0.55	7
	10	0.55	1
	11	0.4	1.9
	12	0.4	6.1
	13	0.8	4
	14	0.7	6.1
	15	0.3	4
λ-Carrageenan	1–8	1.2	4
	9	1.2	7
	10	1.2	1
	11	0.9	1.9
	12	0.9	6.1
	13	1.6	4
	14	1.5	6.1
	15	0.8	4
16	1.5	1.9	

variable were chosen (Table 1). The systems studied were: native or modified starch (1–6 g/100 g water), ι or κ-carrageenan (0.3–0.8/100 g water) and λ-carrageenan (0.8–1.6 g/100 g). One experiment was conducted for each HC. The central point (samples 1–8) and range of each system was established by measuring the apparent viscosity ranges of the HC solutions.

### 2.3. Dielectric properties

The dielectric constant ( $\epsilon'$ ) and the loss factor ( $\epsilon''$ ) were determined at 2.45 GHz using an open-ended coaxial probe connected to a network vectorial analyzer (Hewlett-Packard 85070 M, Hewlett Packard Company, Palo Alto (CA), United States). Each system was measured in triplicate at two temperatures (20 °C and 40 °C). The network analyzer was calibrated with air, a metallic short and water at 25 °C then recalibrated with water at the measurement temperature just before the measurement was made to ensure accuracy. The penetration depth ( $d$ ) was determined according to Eq. (1) (Datta and Anantheswaran, 2001):

$$d = \frac{\lambda_0}{2\pi\sqrt{2\epsilon'}} \left[ \sqrt{1 + \left(\frac{\epsilon''}{\epsilon'}\right)^2} - 1 \right]^{-\frac{1}{2}} \quad (1)$$

where  $\lambda_0$  = wavelength in free space (0.12237 m at a frequency of 2.45 GHz),  $\epsilon'$  = dielectric constant and  $\epsilon''$  = loss factor.

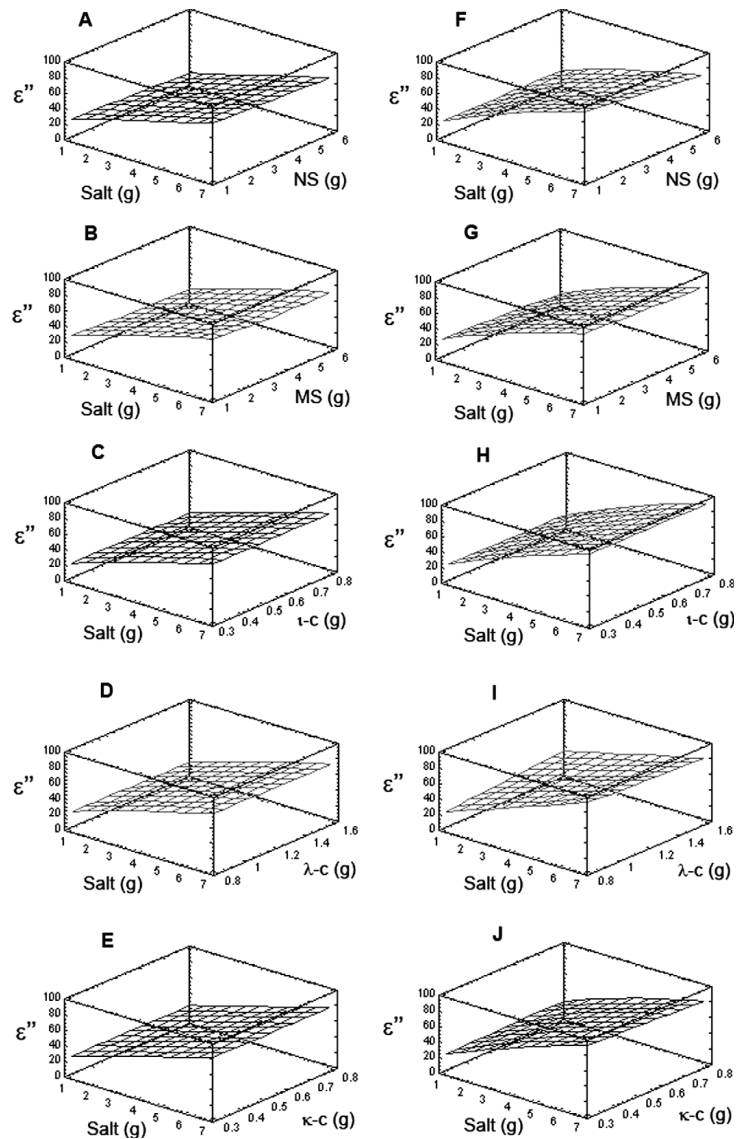
### 2.4. Cryo scanning electron microscopy (Cryo-SEM) and image analysis

The samples were submerged in N<sub>2</sub> slush at  $T \leq -210$  °C and were transferred to a Cryo-Trans (CT1x500C, Oxford Instruments Ltd., Oxford, United Kingdom) coupled to a scanning electronic microscope (Jeol JSM 5410, Tokyo, Japan) that works under freezing conditions ( $T < -130$  °C). The samples were sublimed at -90 °C, covered with Au (0.2 kPa, 40 mA) and observed under the microscope at 15 kV at a distance of 15 mm.

The images obtained through Cryo-SEM were analyzed using Analysis AUTO software (Soft Imaging Systems GMBH, Munich, Germany) to determine the size of the cells created after the sublimation of the samples.

## 2.5. Flow properties

Flow properties were studied with a controlled stress rheometer (RheoStress 1, Thermo Haake, Karlsruhe, Germany) equipped



**Fig. 1.** Response surface plots of the loss factor variable ( $\epsilon''$ ) as a function of salt and HC contents. (A and F): native starch (NS); (B and G): modified starch (MS); (C and H):  $\iota$ -carrageenan; (D and I):  $\lambda$ -carrageenan; (E and J):  $\kappa$ -carrageenan. Measurements carried out at 20 °C (A–E) and at 40 °C (F–J).

with a thermostatic bath (Phoenix, Thermo Haake, Karlsruhe, Germany) to control the temperature. Serrated plate–plate geometries with 35 mm diameter (for the more viscous samples) and 60 mm (for the more liquid samples) were used. The gap between the plates was fixed at 1 mm in all cases.

Flow curves were carried out at shear rates between 0.01 and  $100 \text{ s}^{-1}$  over a total time of 600 s at  $20^\circ\text{C}$ . Three repetitions were carried out on each sample. Viscosity versus shear rate data was fitted to the Ostwald-de Waele model  $\eta = k\dot{\gamma}^{n-1}$  using the Rheowin 3 Data Manager program (Thermo Haake, Karlsruhe, Germany).

### 2.6. Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) was performed on the data using the Statgraphics Plus 5.1 software package (Statistical Graphics Co., Rockville, MD, USA) and an LSD test with a 95% confidence interval to compare the test means.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Dielectric properties

The loss factor ( $\epsilon''$ ) (which influences the conversion of electromagnetic energy into thermal energy and, in consequence, the receptiveness to heating) and the penetration depth ( $d$ ) of the microwaves (the distance where the microwave power decreased to approx. 37% of its surface value) were analysed, as they were considered the most important parameters for characterizing microwave heating of the HC model samples.

#### 3.1.1. Loss factor, $\epsilon''$ .

Fig. 1 shows the response surface plot of  $\epsilon''$  values at  $20^\circ\text{C}$  and  $40^\circ\text{C}$  for the different HC systems. The predictive regression models to explain the loss factor  $\epsilon''$  as a function of salt and HC contents at two different temperatures are given in Table 2. As expected, the loss factor was significant and was positively affected ( $p < 0.05$ ) by the amount of salt present in all the model systems analyzed. Adding salt to food systems with a high water content is known to increase the  $\epsilon''$ . Bircan and Barringer (1998) observed that adding salt to water caused a greater increase in the loss factor than that for pure water. Piyasena et al. (2003) reported a significant increase in the loss factor in corn starch solutions when the concentration of salt increased (measured at different frequencies and temperatures); this increase was attributed to the higher conductivity of salt. Sakai et al. (2005) also observed an increase in the loss factor as the concentration of salt increased in water and in 1% agar gels.

Regarding the influence of temperature,  $\epsilon''$  values measured at  $40^\circ\text{C}$  were significantly higher ( $p < 0.05$ ) than those at  $20^\circ\text{C}$  for

all model systems. Umbach et al. (1992) observed that heating caused an increase in  $\epsilon''$  values in various starch solutions. Similar results were obtained by Piyasena et al. (2003) for corn starch solutions when the temperature was increased from  $20^\circ\text{C}$  to  $80^\circ\text{C}$  at a frequency of 10 MHz. In potato, wheat, corn, and waxy corn starch slurries (5–30% w/w) at 2.75 GHz (Ryynänen et al., 1996) and in wheat, tapioca, rice, corn, waxy corn and high-amylose starches at 2.45 GHz (Ndife et al., 1998), it was found that when the starch was already gelatinized, as in the present case, the mobility of water increased with temperature and heating caused a slight increase in the loss factor. Nelson et al. (1991) also observed that the  $\epsilon''$  of different powdered hydrocolloids (potato starch, locust bean gum, gum arabic, carrageenan, and carboxymethyl cellulose) increased with temperature over the range from  $20^\circ\text{C}$  to  $100^\circ\text{C}$ .

The effect of the HC concentration differed depending on the model system. Higher quantities of both native (NS) and modified (MS) starches significantly decreased the  $\epsilon''$  values ( $p < 0.05$ ). Increasing the amount of starch in the system caused greater water retention by the polymer chains and the change in the amount of free water in these systems affected their dielectric properties. However, no significant effect ( $p > 0.05$ ) of concentration on  $\epsilon''$  values was observed for carrageenan systems ( $\iota$ ,  $\lambda$ , or  $\kappa$ ), even though these HCs also possess high water retention characteristics, so the differences in dielectric behaviour may be induced by the polymer charge and its network conformation.

#### 3.1.2. Penetration depth, $d$

Fig. 2 shows the response surface plot of penetration depth at  $20^\circ\text{C}$  and  $40^\circ\text{C}$  for the different systems. Penetration depth ( $d$ ) values were significantly lower ( $p < 0.05$ ) in salt-enriched systems. This observation was not surprising, since the penetration depth is inversely related to the loss factor; however, other property such as the dielectric constant are also involved in the  $d$  calculation. The decrease in  $d$  with salt was also observed by Piyasena et al. (2003) in corn starch solutions.

The predictive equations of  $d$  at  $20^\circ\text{C}$  and  $40^\circ\text{C}$  are shown in Table 3. In general, these equations failed to find any association between HC concentration and penetration depth. However, the  $d$  values were significantly lower ( $p < 0.05$ ) at the higher temperature in all the model systems.

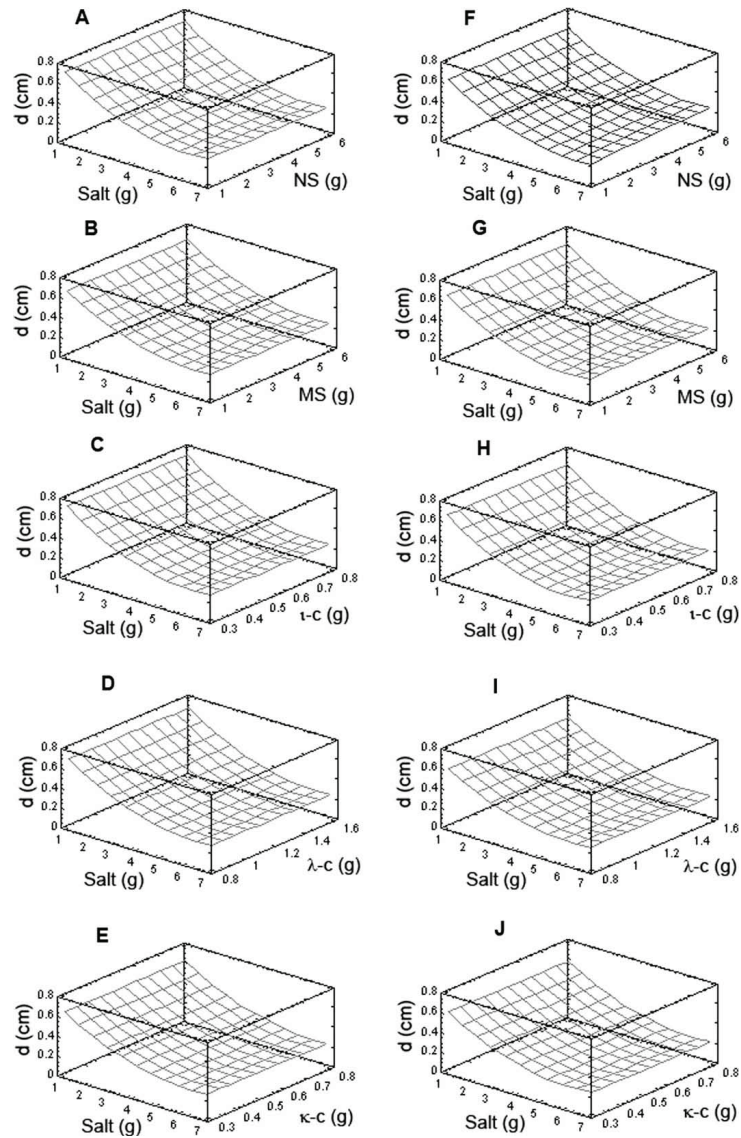
### 3.2. Microstructure

The Cryo-SEM technique is based on fixing the structural components of the samples physically, avoiding a dehydration step when preparing the sample. This makes it possible to observe the water distribution of the samples and the interaction between the water and the different structural components.

**Table 2**  
Predictive regression equations for the loss factor ( $\epsilon''$ ) at 2.45 GHz at  $20^\circ\text{C}$  and  $40^\circ\text{C}$ .

Temperature	Hydrocolloid	Equation	$r^2$	Limits of the variables	
				a (g/100 g water)	b (g/100 g water)
$20^\circ\text{C}$	Native starch	$\epsilon'' = 16.9557 + 10.6399 a - 1.2767 b - 0.3324 a^2$	0.99	1–7	1–6
	Modified starch	$\epsilon'' = 21.509 + 9.9005 a - 3.2381 b - 0.2244 a^2 + 0.3357 b^2$	0.99	1–7	1–6
	$\iota$ -Carrageenan	$\epsilon'' = 12.3009 + 10.4488 a - 0.2061 a^2$	0.99	1–7	0.3–0.8
	$\lambda$ -Carrageenan	$\epsilon'' = 15.0082 + 10.1083 a - 0.2008 a^2$	0.99	1–7	0.8–1.6
	$\kappa$ -Carrageenan	$\epsilon'' = 18.18779 + 8.6080 a$	0.98	1–7	0.3–0.8
$40^\circ\text{C}$	Native starch	$\epsilon'' = 9.8339 + 14.9472 a + 0.6943 b - 0.4182 a^2 - 0.6296 ab$	0.99	1–7	1–6
	Modified starch	$\epsilon'' = 14.7939 + 13.6262 a - 1.2027 b - 0.4495 a^2$	0.98	1–7	1–6
	$\iota$ -Carrageenan	$\epsilon'' = 10.3545 + 14.1741 a - 0.3711 a^2$	0.99	1–7	0.3–0.8
	$\lambda$ -Carrageenan	$\epsilon'' = -3.14668 + 14.1055 a$	0.97	1–7	0.8–1.6
	$\kappa$ -Carrageenan	$\epsilon'' = 19.4181 + 9.8746 a$	0.97	1–7	0.3–0.8

a, Salt; b, hydrocolloid.  
Parameters that were not significant have not been included in the equation.



**Fig. 2.** Response surface plots of the penetration depth variable ( $d$ ) as a function of salt and HC contents. (A and F): native starch (NS); (B and G): modified starch (MS); (C and H):  $\iota$ -carrageenan; (D and I):  $\lambda$ -carrageenan; (E and J):  $\kappa$ -carrageenan. Measurements carried out at 20 °C (A–E) and at 40 °C (F–J).

Fig. 3 presents the structure of the samples prepared with different amounts of native or modified starch and the same amount of salt (4 g). A cell matrix formed after the sublimation of superficial frost was observed; this phenomenon is an artefact which is inherent to the Cryo-SEM technique and is known as the eutectic

artefact or the solute aggregation phenomenon (Llorca et al., 2005). The size of the cells is related to the interaction among the system components and water: the bigger the cell, the lower the water-component interaction and the more free water available in the system.



In Fig. 3 it may be observed how the cell matrix formed during sublimation of the sample became denser as the amount of starch increased. The cells in Fig. 3A (sample prepared with 1 g of starch) were larger than those in Fig. 3B (made with 3.5 g of starch) which, in turn, were larger than those in Fig. 3C (6 g of starch). The same occurred in samples prepared with modified starch (Fig. 3D–F).

In order to quantify the size of the cells in the micrographs shown in Fig. 3, the respective areas were measured using image

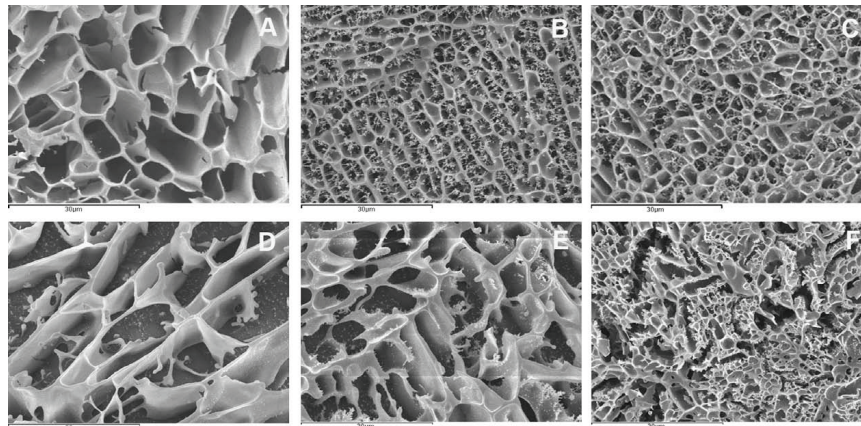
analysis. Fig. 4 shows the means and the LSD intervals of the cell areas in the samples prepared with the two types of starch. As the amount of native starch increased, the cell area decreased; this effect was significant ( $p < 0.05$ ) in the samples prepared with 6 g of starch when compared with those prepared with 1 or 3.5 g. The same occurred with the modified starch. Thus, in both cases the systems prepared with a greater amount of starch presented significantly ( $p < 0.05$ ) smaller cell sizes, which would indicate a smaller

**Table 3**  
Predictive regression equations for penetration depth ( $d$ ) at 2.45 GHz at 20 °C and 40 °C.

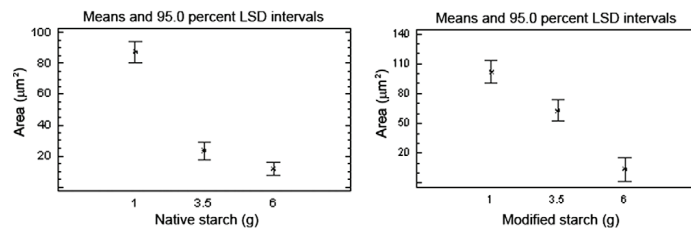
	Hydrocolloid	Equation	$r^2$	Limits of the variables	
				$a$ (g/100 g water)	$b$ (g/100 g water)
20 °C	Native starch	$d = 0.9040 - 0.2083 a + 0.0167 a^2$	0.96	1–7	1–6
	Modified starch	$d = 0.8377 - 0.1834 a + 0.0143 a^2$	0.96	1–7	1–6
	γ-Carrageenan	$d = 0.9205 - 0.2146 a + 0.017 a^2$	0.97	1–7	0.3–0.8
	λ-Carrageenan	$d = 0.8797 - 0.1981 a + 0.0155 a^2$	0.97	1–7	0.8–1.6
	κ-Carrageenan	$d = 0.8105 - 0.1782 a + 0.0139 a^2$	0.97	1–7	0.3–0.8
40 °C	Native starch	$d = 0.7726 - 0.1815 a + 0.0061 b + 0.0144 a^2$	0.98	1–7	1–6
	Modified starch	$d = 0.8384 - 0.2036 a + 0.0167 a^2$	0.96	1–7	1–6
	γ-Carrageenan	$d = 0.8503 - 2138 a + 0.0177 a^2$	0.95	1–7	0.3–0.8
	λ-Carrageenan	$d = 0.7546 - 1707 a + 0.0138 a^2$	0.90	1–7	0.8–1.6
	κ-Carrageenan	$d = 0.7716 - 0.1788 a + 0.0144 a^2$	0.97	1–7	0.3–0.8

$a$ : Salt;  $b$ : hydrocolloid.

Parameters that were not significant have not been included in the equation.



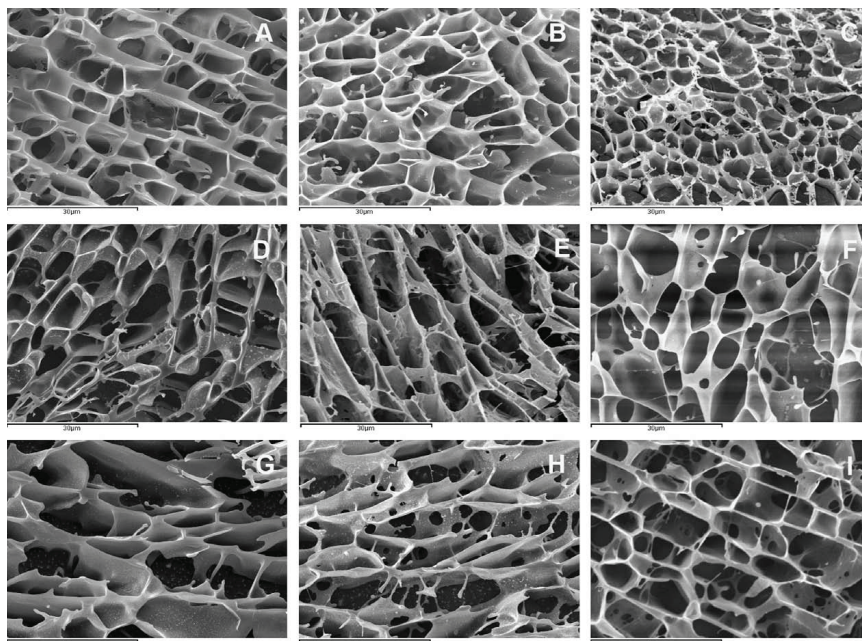
**Fig. 3.** Cryo-SEM microphotographs. (A–C): systems prepared with 4 g of salt and 1 (A), 3.5 (B) and 6 (C) g of native starch (NS). (D–F): system prepared with 4 g of salt and 1 (D), 3.5 (E) and 6 (F) g of modified starch (MS). Magnification:  $\times 2000$ .



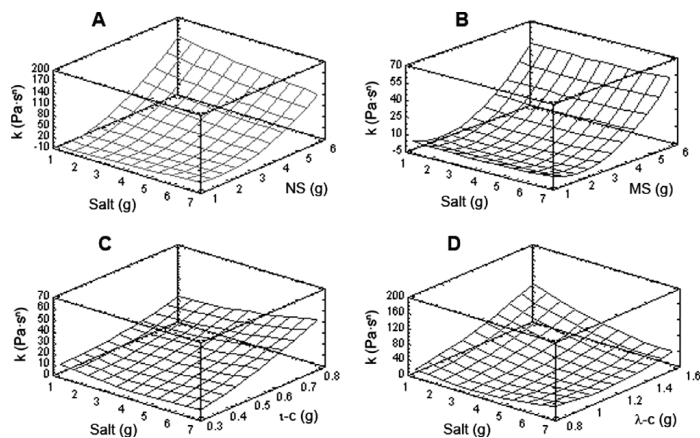
**Fig. 4.** Mean values and LSD intervals for the cell areas in samples prepared with native and modified starches.

presence of free water in the system. The higher water retention of the starch polymers could be the cause of the significant ( $p < 0.05$ )

decrease in the loss factor as the proportion of starch per 100 g of water increased.



**Fig. 5.** Cryo-SEM microphotographs. (A–C): system prepared with 4 g of salt and 0.3 (A), 0.55 (B) and 0.8 (C) g of  $\iota$ -carrageenan; (D–F): system prepared with 4 g of salt and 0.8 (D), 1.2 (E) and 1.6 (F) g of  $\lambda$ -carrageenan; (G–I): system prepared with 4 g of salt and 0.3 (G), 0.55 (H) and 0.8 (I) g of  $\kappa$ -carrageenan. Magnification:  $\times 2000$ .



**Fig. 6.** Response surface plots of the consistency index variable ( $k$ ) as a function of salt and HC contents. (A) native starch (NS); (B) modified starch (MS); (C)  $\iota$ -carrageenan; (D)  $\lambda$ -carrageenan.

Regarding the systems prepared with the different types of carrageenan, it was observed that an increase in the amount of HC did not significantly influence the loss factor ( $p > 0.05$ ) and that the size of the cells did not vary when the quantity of thickener was modified, as may be seen in Fig. 5.

### 3.3. Flow properties

In order to investigate the influence that the rheological properties (provided by the selected hydrocolloids) might have on the dielectric properties, the flow properties were measured. Flow properties are directly related to water status within the systems, which is modulated by the binding capacity of the HC molecules.

In the shear rate range studied, the viscosity data were well adjusted to the Ostwald-de Waele model ( $\eta = k\dot{\gamma}^{n-1}$ ). The consistency index ( $k$ ) is the parameter of the Ostwald-de Waele model that represents the resistance to flow. Fig. 6 shows the response surface plots for the different model systems. All the HCs showed significant ( $p < 0.05$ ) positive effects on the  $k$  index, i.e. an increase in their concentration increased the consistency index of the system (indeed, all the HCs are used as thickening agents in the food industry). NS produced higher  $k$  values than MS, and  $\lambda$ C higher than  $\iota$ C.

Salt had a significant ( $p < 0.05$ ) negative effect on the consistency index in the NS and  $\lambda$ C samples; however, as a result of significant interactions between the salt and the thickener, an increase in the consistency index was observed when the salt levels were high (7 g/100 g) and the thickener levels were low (1 g/100 g in NS and 0.8 g/100 g in  $\lambda$ C). Starch, unlike carrageenan, does not contain groups that can be ionized, so in principle it should not be so sensitive to salt. However, it has been reported that the starch in starch systems is affected by high concentrations of ions such as phosphates, acetate, chloride, citrate, sulphate and tartrate and positive ions like sodium or calcium (Thomas and Atwell, 1999). The effect of salt on NS could be explained as resulting from competition between the salt and the starch for the available water, which would limit the swelling of the native starch granules, decreasing the consistency they provide to the system. Unlike

the NS samples, in the MS systems salt was not a significant factor for variation of  $k$  values ( $p > 0.05$ ).

Regarding  $\iota$ CS, it was observed that salt had a significant ( $p < 0.05$ ) positive effect. Michel et al. (1997) demonstrated that the dynamic elastic modulus (which indicates the rigidity of a material) depended on the concentration and nature of the positive ion in contact with  $\iota$ -carrageenan. Since carrageenan molecules contain sulphate groups and repulsion prevents the formation of chain aggregates, it is not surprising that the rheological properties were influenced by the addition of positive ions that protect sulphate groups from electrostatic repulsion. For this reason, adding positive ions can enlarge the crystalline region of the  $\iota$ -carrageenan network and expand the elasticity module (Michel et al., 1997). This fact would explain the positive effect of salt on the consistency index.  $\lambda$ -Carrageenan does not gel because it has more negative charges in its chemical structure: as this would limit the expansion of crystalline areas in the net, its consistency does not increase.

All the flow index ( $n$ ) values obtained for all the samples (Fig. 7) were below 1, confirming that the samples behaved as shear thinning fluids in which viscosity decreases as shear rate increases.

A comparison of the two types of starch showed different shear thinning behaviour. This difference indicates a structural difference between the two starch types, as shown by the different effects of salt. In the case of the NS, the gelatinized starch granules did not resist heating and broke, resulting in the solubilisation of amylose and amylopectin. In the case of MS the structure corresponded to a particulated system formed by swollen starch granules that had resisted heating without breaking as a result of their modification through cross linking and substitution.

Systems with carrageenan presented greater shear thinning behaviour ( $n$  closer to 0) than starch systems, proving their greater structural complexity. When comparing the different systems prepared with carrageenan,  $\iota$ CS presented higher shear thinning behaviour than  $\lambda$ CS. A higher concentration of  $\kappa$ -carrageenan formed strong, rigid gels, making it impossible to determine flow properties in these samples (it was not possible to plot their response surfaces).

The effects of HC and salt concentration on shear thinning behaviour were variable. When the amount of salt in the sample

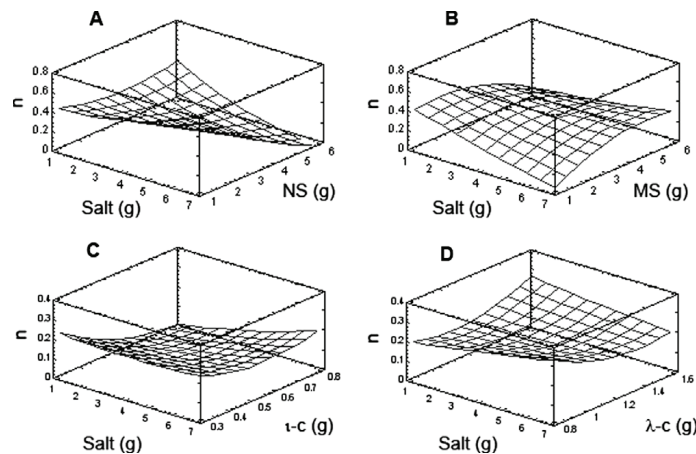


Fig. 7. Response surface plots of the flow index variable ( $n$ ) in relation to the quantity of salt and HC. (A) native starch (NS); (B) modified starch (MS); (C)  $\iota$ -carrageenan; (D)  $\lambda$ -carrageenan.



**Table 4**Predictive regression equations for the consistency index ( $k$ ) at shear rates between 0.01 and 100 s<sup>-1</sup> over a total time of 600 s at 20 °C.

Hydrocolloid	Equation	$r^2$	Limits of the variables	
			$a$ (g/100 g water)	$b$ (g/100 g water)
Native starch	$k = -8.7638 + 5.0778 a - 9.903 b - 2.0266 ab + 6.3482 b^2$	0.98	1–7	1–6
Modified starch	$k = -17.6892 + 1.9274 a - 16.0165 b - 0.2491 a^2 + 3.706 b^2$	0.99	1–7	1–6
$\iota$ -Carrageenan	$k = -17.4887 - 1.1924 a - 52.2465 b$	0.82	1–7	0.3–0.8
$\lambda$ -Carrageenan	$k = 38.2067 + 0.9250 a - 84.7427 b + 1.7959 a^2 - 16.5913 ab + 89.3237 b^2$	0.77	1–7	0.8–1.6

a: Salt; b: hydrocolloid.

Parameters that were not significant have not been included in the equation.

**Table 5**Predictive regression equations for the flow index ( $n$ ) at shear rates between 0.01 and 100 s<sup>-1</sup> over a total time of 600 s at 20 °C.

Hydrocolloid	Equation	$r^2$	Limits of the variables	
			$a$ (g/100 g water)	$b$ (g/100 g water)
Native starch	$n = 0.3915 + 0.0802 a - 0.0811 b - 0.02513 ab + 0.01411 b^2$	0.71	1–7	1–6
Modified starch	$n = 0.4195 - 0.0813 a + 0.0622 b + 0.0185 ab - 0.0196 b^2$	0.45	1–7	1–6

a: Salt; b: hydrocolloid.

Parameters that were not significant have not been included in the equation.

was small, an increase in the quantity of HC resulted in a decrease in the flow index of all the systems except  $\lambda$ CS. With a medium level of salt, the flow index continued to decrease as the amount of HC increased, except in the MS systems. Finally, when the content of salt was high, at higher HC levels the flow index decreased in the NS system but increased in the MS, while no definite tendency was appreciated in the  $\iota$ C and  $\lambda$ C. The predictive equations of consistency index ( $k$ ) and flow index ( $n$ ) are shown in Tables 4 and 5. Predictive flow index equations of  $\iota$ CS and  $\lambda$ CS are not shown due to a lack in statistical significance of parameters.

In short, the combined effects of salt and HC concentration on the flow index were very difficult to determine and could not be generalized for the different model systems studied. Looking at the way that dielectric properties varied with the salt and HC contents (Figs. 1 and 2), it is not difficult to conclude that salt is noticeably the most important factor in the variations in these properties and that while the fraction of the water molecules that could be more or less bonded to the polymer chains determined the rheological behaviour of the systems studied, it did not play an important role in their dielectric behaviour.

#### 4. Conclusions

Corn starches (both native and modified) caused a significant decrease in the loss factor ( $p < 0.05$ ) when increasing their concentration. This has a negative effect on microwave heating efficiency, but it did not significantly affect the penetration depth ( $p > 0.05$ ). The decrease in the loss factor was related to a decrease of free water in the system. Cryo-SEM proved to be a valuable tool for confirming the existence of free water at a microstructural level. Carrageenan ( $\iota$ ,  $\lambda$  y  $\kappa$ -carrageenan) did not significantly affect the loss factor ( $p > 0.05$ ), so it could be suitable for use as a partial replacement for different types of starch to minimize the negative effect of starch in microwaveable formulations.

Salt was a positive factor for the loss factor but a negative one for penetration depth, so it could be useful to adjust its dosage as a way to optimize microwave heating for the type of product being prepared.

The systems' flow properties and the dielectric properties of the different systems showed no direct relation. In the starch systems, the decrease in free water and in the loss factor was related to an increase in consistency. In the carrageenan systems, consistency was not related to the system's free water and consequently was

not related to dielectric properties either. The influence of salt in dielectric properties was neither explained as a consequence of changes in flow properties.

#### Acknowledgements

The authors are grateful for the economic support (project AGL2006-11653-C01 and C02) received from the Ministerio de Ciencia e Innovación and the grant awarded to L.M. Guardado. The authors also appreciate lecturer J.M. Carot's help in the statistical treatment of data, the R&D&I Linguistic Assistance Office, Universidad Politécnica de Valencia (Spain), for translating this paper and Mary Georgina Hardinge for copy editing.

#### References

- Bengtsson, N.E., Melin, J., Remi, K., Soderling, S., 1963. Measurements of the dielectric properties of frozen and defrosted meat and fish in the frequency range 10–200 MHz. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 14, 592–604.
- Bengtsson, N.E., Risman, P.O., 1971. Dielectric properties of food at 3 GHz as determined by a cavity perturbation technique. II. Measurements on food materials. *Journal of Microwave Power* 6, 107–123.
- Bircan, C., Barringer, S.A., 1998. Salt-starch interactions as evidenced by viscosity and dielectric property measurements. *Journal of Food Science* 63 (6), 983–986.
- Calay, R.K., Newborough, M., Probert, D., Calay, P.S., 1995. Predictive equations for the dielectric properties of foods. *International Journal of Food Science* 29, 699–713.
- Datta, A.K., Anantheswaran, R.C., 2001. *Handbook of Microwave Technology for Food Applications*. Marcel Dekker, New York.
- Decareau, R.V., 1985. *Microwaves in the Food Processing Industry*. Academic Press Inc., Ltd., London.
- Hegenbart, S., 1992. Microwave quality: coming age. *Food Product Design* 17, 29–52.
- Jain, R.C., Voss, W.A.G., 1987. Dielectric properties of raw and cooked chicken egg at 3 GHz 23–140 °C. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy* 22 (4), 221–227.
- Llorca, E., Hernando, I., Pérez-Munuera, I., Quiles, A., Larrea, V., Fiszman, S.M., Lluch, M.A., 2005. Microstructural study of frozen batter-coated squid rings prepared by an innovative process without a pre-frying step. *Food Hydrocolloids* 19, 297–302.
- Meda, V., Orsat, V., Raghavan, G.S.V., 2005. Microwave heating and dielectric properties of foods. In: Schuder, H., Regier, M. (Eds.), *The Microwave Processing of Foods*. CRC Press, Woodhead Publishing, Ltd., Cambridge, pp. 61–75.
- Metaxas, A.C., Meredith, R.J., 1983. *Industrial Microwave Heating*. Peter Peregrinus Ltd., London.
- Miller, L.A., Gordon, J., Davis, E.A., 1991. Dielectric and thermal transition properties of chemically modified starches during heating. *Cereal Chemistry* 68, 441–448.
- Michel, A.S., Mestdagh, M.M., Axelos, M.A.V., 1997. Physico-chemical properties of carrageenan gels in presence of various cations. *International Journal of Biological Macromolecules* 21, 195–200.
- Mudgett, R.E., Mudgett, D.R., Goldblith, S.A., Wang, D.I.C., Westphal, W.B., 1979. Dielectric properties of frozen meats. *Journal of Microwave Power* 14, 209–216.

- Ndife, M.K., Summu, G., Bayindirli, L., 1998. Dielectric properties of six different species of starch at 2450 MHz. *Food Research International* 31 (1), 43–52.
- Nelson, S.O., 1978. Radio frequency and microwave dielectric properties of shelled corn. *Journal of Microwave Power* 13, 213–218.
- Nelson, S., Prakash, A., Lawrence, K., 1991. Moisture and temperature dependence of the permittivities of some hydrocolloids at 2.45 GHz. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy* 26 (3), 178–185.
- Piyasena, P., Ramaswamy, H.S., Awuah, G.B., Defelice, C., 2003. Dielectric properties of starch solutions as influenced by temperature, concentration, frequency and salt. *Journal of Food Process Engineering* 26, 93–119.
- Prakash, A., Nelson, S.O., Mangino, M.E., Hansen, P.M.T., 1992. Variation of microwave dielectric properties of hydrocolloids with moisture content, temperature and stoichiometric charge. *Food Hydrocolloids* 6 (3), 315–322.
- Rynänen, S., Risman, P.O., Ohlsson, T., 1996. The dielectric properties of native starch solutions – a research note. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy* 31 (1), 50–53.
- Sakai, N., Mao, W., Koshima, Y., Watanabe, M., 2005. A method for developing model food system in microwave heating studies. *Journal of Food Engineering* 66, 525–531.
- Sun, E., Datta, A.K., Lobo, S., 1995. Composition-based prediction of dielectric properties of foods. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy* 30, 205–212.
- Thomas, D.J., Atwell, W.A., 1999. *Starches*. Egan Press, AACC, Saint Paul (MN).
- Umbach, S.L., David, E.A., Gordon, J., Callaghan, P.T., 1992. Water self-diffusion coefficients and dielectric properties determined for starch–gluten–water mixtures heated by microwave and by conventional methods. *Cereal Chemistry* 60, 637–642.

# Microwave Heating Effect on Rheology and Microstructure of White Sauces

Luis M. Guardeño, Teresa Sanz, Susana M. Fiszman, Amparo Quiles, and Isabel Hernando

**Abstract:** The microstructure and rheological properties of white sauces formulated with different starches were analyzed after being microwave-heated for different times. Significant differences ( $P < 0.05$ ) in rheological parameters analyzed—storage modulus ( $G'$ ), loss modulus ( $G''$ ), and loss tangent ( $\tan \delta$ )—were obtained for sauces made with different starches. Microwave reheating did not affect  $G'$  and  $G''$  values until water evaporation became significant. In addition,  $\tan \delta$  values did not change significantly ( $P < 0.05$ ) even during long reheating times showing that sauce viscoelastic properties did not change after microwave irradiation. However, microstructure assessed by confocal laser scanning microscopy showed changes in fat globule and protein. These microstructural changes did not seem to have a significant effect on rheological measurements since starch and  $\iota$ -carrageenan are mainly responsible for the viscoelastic behavior of the sauces.

**Keywords:** confocal laser scanning microscopy, microwave, rheology, starch, white sauce

**Practical Application:** The development of products appropriate to microwave heating is constantly rising in food industry. It is necessary to understand the behavior of the ingredients and the final product to microwave heating in order to choose those ingredients which will develop the best performance. Starches are common ingredients in industrial sauces, and rheological and microstructural techniques have shown their usefulness in characterization of starch-based systems.

## Introduction

The ready-to-eat meal sector has grown to currently become one of the most successful areas in food industry. This is mainly due to the new consumption habits characterized by an increased demand for products which are easy to prepare and consume and do not sacrifice sensory quality. In this context, microwave oven has become an indispensable appliance in every home due to its ease of use and quickness in preparing such foodstuff.

Some commercial ready-to-eat products include sauces and dressings in their formulation. These liquid media are subjected to industrial processing in which heating and agitation stages lead to significant chemical and physical changes in raw ingredients until the final product is achieved. Moreover, these products withstand freezing or refrigeration conditions until they reach the final consumer. In order to maintain desirable appearance, texture, and stability throughout the product shelf life, these products usually have hydrocolloids and modified starches in their formulation (Sikora and others 2008; Mason 2009); moreover, the current demand for natural, clean-label foods has promoted the use of native starches (Arocas and others 2009a). These ingredients are able to bind water molecules forming a complex matrix in which interactions with other food components are crucial to understand product rheological and organoleptic behavior (Sikora and others 2008).

In white sauces, physicochemical transformations mainly comprise those related to starch gelatinization, protein aggregation, fat globule distribution, and interactions between hydrocolloids and the water phase. These changes depend on the composition of the sauce as well as the time and temperature of cooking. Furthermore, in the case of ready-to-eat products, which usually undergo extra reheating processes, the use of different formulations could improve the behavior of the product when it is subjected to different treatments. This is especially important when the treatment involves microwave irradiation (Guardeño and others 2010).

Many studies have focused on the rheological properties of different starch-based systems subjected to different shear and thermal conditions. Thebaudin and others (1998) investigated the effect of thermal treatment on the textural characteristics of a béchamel sauce prepared with different starches—corn, wheat, and rice. Arocas and others (2009a, 2009b) compared the freeze/thaw and heating stability of model white sauces made with different corn starches and prepared with different shearing conditions. The influence of nonstarch ingredients on rheological behavior of different mixtures has also been studied (Tárrega and others 2005; Vu Dang and others 2009). Heyman and others (2010) investigated the effects of nonstarch hydrocolloids—guar gum, xanthan gum, and carboxymethylcellulose—on the physicochemical properties and stability of béchamel sauces after refrigeration. Nevertheless, little research has been done on the effect of microwave irradiation over starch-based systems. Goebel and others (1984), Palav and Seetharaman (2006, 2007), and Bilbao-Sáinz and others (2007) have focused their studies on the differences in gelatinization of wheat starch dispersions under microwave or conventional heating.

On the other hand, microstructure analysis and microscopic techniques have given the opportunity of linking food structure

MS 20110330 Submitted 3/15/2011, Accepted 7/2/2011 Authors Guardeño, Quiles, and Hernando are with Dept. de Tecnología de Alimentos, Grupo de Microestructura y Química de Alimentos, Univ. Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain. Authors Sanz and Fiszman are with Inst. de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Apartado de correos 73, 46100 Burjassot, Valencia, Spain. Direct inquiries to author Guardeño (E-mail: luigualex@upvnet.upv.es).

to properties and understanding basic mechanisms of physico-chemical changes (Aguilera 2005). In this context, confocal laser scanning microscopy (CLSM) has become a powerful tool which allows us to identify different components because of specific dyes and their fluorescent excitation–emission features (Ferrando and Spiess 2000). Besides, CLSM makes it possible to create three-dimensional (3D) images of the samples which provide more accurate microstructure information (Gunasekaran and Ding 1999). In the last decade, CLSM has been thoroughly employed to study the microstructure of different food systems. Arltoft and others (2007a) studied the interaction between carrageenan and milk proteins mixtures. Auty and others (2001) analyzed the distribution of fat and protein in dairy products. CLSM has also been used to analyze wheat products, such as wheat dough, bread, and pasta (Dürrenberger and others 2001), and to visualize biopolymer mixtures, such as gelatine, whey protein, dextran, gellan gum, gum arabic, and starch, by covalent and noncovalent labeling techniques (Tromp and others 2001; van de Velde and others 2003). More specifically, van de Velde and others (2002) have successfully reported that CLSM is an easy tool to monitor the gelatinization process. However, to the best of our knowledge, no studies of white sauce microstructure using CLSM have been carried out.

Since there is a lack of information about how microwave reheating affects the rheological and microstructural characteristics of starch-based sauces, the aim of this study was to analyze the effect of microwave reheating time in white sauce properties formulated with native and modified starches by means of the study of their linear viscoelastic properties and their microstructure.

## Materials and Methods

### Starches

Five different corn starches were used: native starch (NS) (C Gel 03401), native waxy starch (WS) (C Gel 04201), cross-linked acetylated distarch adipate (CAS) (C Tex 06205), cross-linked hydroxypropyl distarch phosphate (CHS) (C Polar Tex 06741), and highly cross-linked hydroxypropyl distarch phosphate (HCHS) (C Polar Tex 06748) from Cargill, Inc. (Minneapolis, Minn., U.S.A.). The starches were selected in order to compare waxy and normal native starches and different starch chemical modifications: substitution (acetyl and hydroxypropyl starches) and cross-linking (adipate and phosphate diester linkage) at different levels.

### Sample preparation

The white sauce consisted of powdered skimmed milk (9.3% w/w) (Central Lechera Asturiana, Asturias, Spain), starch (3.5% w/w), sunflower oil (2.5% w/w) (Koipesol<sup>®</sup>, SOS-Cuétara S.A, Madrid, Spain), *t*-carrageenan (0.5% w/w) (Secovis IS<sup>®</sup>, Hispanagar, Burgos, Spain), sodium chloride (0.4% w/w) (Panreac Química SAU, Barcelona, Spain), and water up to 100% w/w. The samples were prepared according to Arocas and others (2009b). Briefly, all ingredients were placed into a cooking device (Thermomix TM 31, Wuppertal, Germany) heated up to 90 °C (17 °C/min) at 1100 rpm and kept at 90 °C at the same agitation speed for 6 min. The samples were stored in Pyrex glass bottles (300 g).

The analyses of freshly made samples were performed after cooling them down to room temperature. The study of the effect of microwave reheating was performed with previously refrigerated (24 h) samples. After microwave reheating, the samples were homogenized in the Pyrex bottles by stirring them with a spoon for 3 s. Then, subsamples were randomly taken from different areas

of the bottles with a plastic Pasteur pipette for microstructural analyses and with a spatula for viscoelastic measurements.

### Microwave reheating

Different batches of samples (300 g) were heated for 60, 90, 120, 180, 300, and 480 s in a microwave oven (Optimo<sup>®</sup>, Moulinex, Paris, France) at 900 W and 2.45 GHz. The samples were covered with a drilled plastic cap during the heating process and after heating they were cooled down to room temperature until being analyzed.

### Linear viscoelastic properties

The linear viscoelastic properties of the white sauces were studied using small amplitude oscillatory shear with a controlled stress rheometer (RheoStress 1<sup>®</sup>, Thermo Haake, Karlsruhe, Germany) equipped with a thermostatic bath (Phoenix<sup>®</sup>, Thermo Haake, Karlsruhe, Germany) to control the test temperature (20 °C). Ser-rated plate–plate geometry with 35-mm diameter was used. The gap between the plates was 1 mm. The samples remained 10 min between the plates as equilibration time prior to analysis.

Stress sweep tests were carried out at a frequency of 1 Hz to determine the extension of the linear viscoelastic response and frequency sweep tests at 10 to 0.01 Hz at a stress wave amplitude within the linear region. Values of the storage modulus, the loss modulus, and the loss tangent were recorded. The storage or elastic modulus ( $G'$ ) is a measure of the energy stored and recovered per cycle of sinusoidal deformation. The loss or viscous modulus ( $G''$ ) is a measure of the energy dissipated or lost as heat per cycle of sinusoidal deformation. The loss tangent ( $\tan \delta = G''/G'$ ) is a measure of the ratio of energy lost to energy stored in a cycle deformation.

The dependence of  $G'$  on frequency was adjusted to the following power law equation:

$$G' = kf^n, \quad (1)$$

where  $n$  is the power law index which provides an indication of the frequency dependence of  $G'$ . Values of  $n = 1$  indicate a linear dependence on frequency, and values of  $n = 0$  indicate no frequency dependence.

### Confocal laser scanning microscopy and image analysis

**Equipment and dyes.** The microstructural study was performed using CLSM. A Nikon confocal microscope C1 unit that was fitted on a Nikon Eclipse E800<sup>®</sup> microscope was used (Nikon, Tokyo, Japan). An Ar laser line (488 nm) was employed as a light source to excite fluorescent dyes rhodamine B and Nile red. Rhodamine B (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., U.S.A.) with  $\lambda_{\text{ex,max}}$  488 nm and  $\lambda_{\text{em,max}}$  580 nm was solubilized in distilled water at 1 g/L. This dye was used to stain proteins and starch. Nile red (Fluka, Sigma-Aldrich) with  $\lambda_{\text{ex,max}}$  488 nm and  $\lambda_{\text{em,max}}$  515 nm was solubilized in PEG 200 at 0.1 g/L. This dye was used to stain fat.

Two razor blades (platinum coated double edge blades with 100- $\mu\text{m}$  thickness) were stuck to a glass slide (Pateras and others 1994). By this mean it was possible to assure a sufficient thickness to visualize the sample without deforming the native sample structure when putting the cover. A 60 $\times$ /1.40NA/Oil/Plan Apo VC Nikon objective lens was used.

**Sample visualization.** A drop of the sample was placed on the slide and stained with 20  $\mu\text{L}$  of rhodamine B solution and 20  $\mu\text{L}$  of Nile red solution. Stacks of images were obtained

by automatically scanning 20 μm depth through the sample. The separation between observation planes was kept at 0.4 μm. Fifty-one adjacent planes were observed and stored as images with 1024 × 1024 pixel resolution using the microscope software (EZ-C1 v.3.40, Nikon). 2D images were randomly acquired and stored with the same resolution.

**Image analysis.** The CLSM images were processed and analyzed using the software *ImageJ* (National Institutes of Health, Bethesda, Md., U.S.A.). Fifteen randomly acquired CLSM images were binarized after greyscale threshold segmentation. Fat globule area (μm<sup>2</sup>) was automatically determined from the binarized images. Since fat globule area did not show a normal distribution in every sauce system, the 80th percentile (P<sub>80</sub>) of the globule area was used as the parameter which better represented the fat globule size. P<sub>80</sub> indicated that 80% of the globules in each image had an area below this value.

Morphological features of the samples were directly visualized from 2D images and after 3D reconstruction of stacks from 2D images.

**Temperature measurements during microwave treatment.**

The temperature during microwave heating was measured by positioning the tip of an ST3 optical fiber probe connected to a signal conditioner FOTEMP1-OEM® (OPTICOM, Dresden, Germany) in the middle of the sample container. The probe was inserted through the drilled plastic cap and was fixed with tape.

**Sample moisture after microwave treatment.**

Sample moisture content was calculated as weight loss after freeze-drying for 36 h at -45 °C/1.3 × 10<sup>-3</sup> mPa in a vacuum lyophilizer (Telstar Iioalfa-6®, Telstar, Terrassa, Spain).

**Statistical data analysis.**

Analysis of variance was performed on the data using the Statgraphics Plus 5.1 software package (Statistical Graphics Co., Rockville, Md., U.S.A.). Least significant difference (LSD) Fisher's test was used to evaluate mean values differences (P < 0.05).

**Results and Discussion**

**Mechanical spectra**

A representative example of the frequency dependence of G' and G'' (mechanical spectra) of the different sauces—freshly made and after being microwave-reheated during 120 s—is shown in Figure 1. In addition, values of G', G'', and tan δ at a frequency of 1 Hz at 20 °C of all types of sauces and reheating times are shown in Table 1. For all the sauces the mechanical spectra revealed the existence of soft gels, with values of G' higher than values of G''. A material that is frequency independent over a large time scale range is solid like; a true gel is such a material. In contrast, strong frequency dependence suggests a material structure with molecular entanglements that behaves more like a solid at higher frequencies and more like a liquid at lower frequencies (Rosalina and Bhattacharya 2002). The frequency dependence of G' was well adjusted to a power law equation (Eq. 1) in all the cases, with values of the power law index which varied from 0.06 to 0.16 implying a weak frequency dependence throughout the frequency range measured. A similar frequency dependence was previously found in white sauces by other authors (Mandala and others 2004; Arocas and others 2009b).

**Influence of the type of starch: freshly made white sauces**

The mechanical spectra of the freshly made white sauces (Figure 1A) showed clear differences among the native starch and

**Table 1—Mean values of G' and G'' and tan δ at 1 Hz and 20 °C for the different sauces and reheating times.**

Type of starch	Freshly made			60 s			90 s			120 s			180 s			300 s			480 s		
	G' (Pa)	G'' (Pa)	(Pa)/tan δ	G' (Pa)	G'' (Pa)	(Pa)/tan δ	G' (Pa)	G'' (Pa)	(Pa)/tan δ	G' (Pa)	G'' (Pa)	(Pa)/tan δ	G' (Pa)	G'' (Pa)	(Pa)/tan δ	G' (Pa)	G'' (Pa)	(Pa)/tan δ	G' (Pa)	G'' (Pa)	(Pa)/tan δ
NS	140.9 <sup>a</sup>	26.1 <sup>a</sup>	0.185 <sup>a</sup>	187.1 <sup>ab</sup>	30.9 <sup>a</sup>	0.170 <sup>ab</sup>	182.2 <sup>ab</sup>	30.9 <sup>a</sup>	0.170 <sup>ab</sup>	243.5 <sup>ab</sup>	38.9 <sup>a</sup>	0.159 <sup>bc</sup>	276.1 <sup>b</sup>	38.9 <sup>a</sup>	0.141 <sup>d</sup>	254.6 <sup>ab</sup>	37.9 <sup>a</sup>	0.149 <sup>cd</sup>	679.4 <sup>c</sup>	98.7 <sup>b</sup>	0.145 <sup>d</sup>
NS	(11.3)	(0.1)	(0.014)	(2.6)	(0.25)	(0.001)	(7.3)	(1.34)	(0.001)	(9.0)	(2.66)	(0.005)	(9.0)	(2.66)	(0.005)	(75.2)	(10.45)	(0.003)	(101.4)	(15.5)	(0.001)
WS	83.3 <sup>a</sup>	20.5 <sup>a</sup>	0.246 <sup>a</sup>	73.2 <sup>a</sup>	19.68 <sup>a</sup>	0.270 <sup>abc</sup>	74.6 <sup>a</sup>	19.84 <sup>a</sup>	0.266 <sup>abc</sup>	72.2 <sup>a</sup>	20.33 <sup>a</sup>	0.280 <sup>cd</sup>	84.6 <sup>a</sup>	21.53 <sup>a</sup>	0.255 <sup>ab</sup>	88.8 <sup>a</sup>	26.08 <sup>ab</sup>	0.294 <sup>b</sup>	118.3 <sup>a</sup>	39.77 <sup>c</sup>	0.336 <sup>d</sup>
WS	(0.6)	(0.11)	(0.000)	(7.6)	(0.79)	(0.020)	(0.3)	(0.26)	(0.004)	(1.8)	(0.70)	(0.003)	(5.7)	(0.82)	(0.011)	(3.5)	(0.80)	(0.003)	(12.4)	(3.34)	(0.006)
CAS	340.3 <sup>a</sup>	51.75 <sup>a</sup>	0.152 <sup>a</sup>	265.9 <sup>ab</sup>	57.82 <sup>a</sup>	0.142 <sup>ab</sup>	340.8 <sup>a</sup>	45.39 <sup>a</sup>	0.134 <sup>ab</sup>	324.6 <sup>a</sup>	44.42 <sup>ab</sup>	0.137 <sup>abc</sup>	355.6 <sup>a</sup>	50.05 <sup>a</sup>	0.146 <sup>ab</sup>	472.0 <sup>c</sup>	68.34 <sup>b</sup>	0.146 <sup>a</sup>	820.3 <sup>b</sup>	119.70 <sup>b</sup>	0.146 <sup>a</sup>
CAS	(6.7)	(1.01)	(0.000)	(8.5)	(0.55)	(0.002)	(15.6)	(2.54)	(0.001)	(16.1)	(1.88)	(0.001)	(27.2)	(3.53)	(0.001)	(41.3)	(5.05)	(0.002)	(14.8)	(4.38)	(0.003)
CHS	388.4 <sup>a</sup>	65.70 <sup>a</sup>	0.169 <sup>abc</sup>	375.9 <sup>a</sup>	65.74 <sup>a</sup>	0.175 <sup>abc</sup>	377.5 <sup>a</sup>	65.05 <sup>a</sup>	0.172 <sup>abc</sup>	465.7 <sup>a</sup>	75.71 <sup>a</sup>	0.162 <sup>a</sup>	386.1 <sup>ab</sup>	69.00 <sup>a</sup>	0.179 <sup>abc</sup>	588.6 <sup>a</sup>	103.10 <sup>b</sup>	0.175 <sup>abc</sup>	1311.0 <sup>c</sup>	212.65 <sup>c</sup>	0.162 <sup>a</sup>
CHS	(7.7)	(0.47)	(0.005)	(32.3)	(1.64)	(0.010)	(20.6)	(4.40)	(0.002)	(14.6)	(6.11)	(0.008)	(32.7)	(5.51)	(0.001)	(4.4)	(3.39)	(0.007)	(93.3)	(13.08)	(0.001)
HCHS	501.2 <sup>ab</sup>	83.18 <sup>a</sup>	0.166 <sup>a</sup>	440.1 <sup>a</sup>	74.70 <sup>a</sup>	0.178 <sup>cd</sup>	466.5 <sup>a</sup>	83.20 <sup>a</sup>	0.178 <sup>cd</sup>	486.3 <sup>ab</sup>	88.29 <sup>a</sup>	0.181 <sup>d</sup>	436.0 <sup>a</sup>	78.80 <sup>a</sup>	0.181 <sup>d</sup>	599.1 <sup>b</sup>	109.25 <sup>b</sup>	0.182 <sup>d</sup>	1382.3 <sup>c</sup>	198.5 <sup>c</sup>	0.144 <sup>d</sup>
HCHS	(22.5)	(6.55)	(0.006)	(5.1)	(3.08)	(0.005)	(40.5)	(5.26)	(0.004)	(2.5)	(0.07)	(0.001)	(25.9)	(2.80)	(0.004)	(25.6)	(2.19)	(0.004)	(99.5)	(14.8)	(0.006)

Values between parentheses are the standard deviations.  
<sup>a-d</sup> Values with different letters within the same row and within the same parameter are significantly different (P < 0.05) according to the LSD multiple range test.  
<sup>ab-cd</sup> Values with different letters within the same column are significantly different (P < 0.05) according to the LSD multiple range test.  
<sup>a</sup> Type of starch: NS, native starch; WS, native waxy starch; CAS, cross-linked acetylated starch; CHS, cross-linked hydroxypropyl starch; HCHS, highly cross-linked hydroxypropyl starch phosphate.

the modified starch sauces.  $G'$  and  $G''$  values (Table 1) of both NS and WS sauces were significantly lower than the values of all the modified starch sauces. Also, the  $\tan \delta$  values of the native starch sauces revealed the existence of less viscoelastic systems with values of  $\tan \delta$  significantly higher than those of the modified starch sauces. These results revealed the existence of structure differences between native and modified starches, as later confirmed by the microstructure observation.

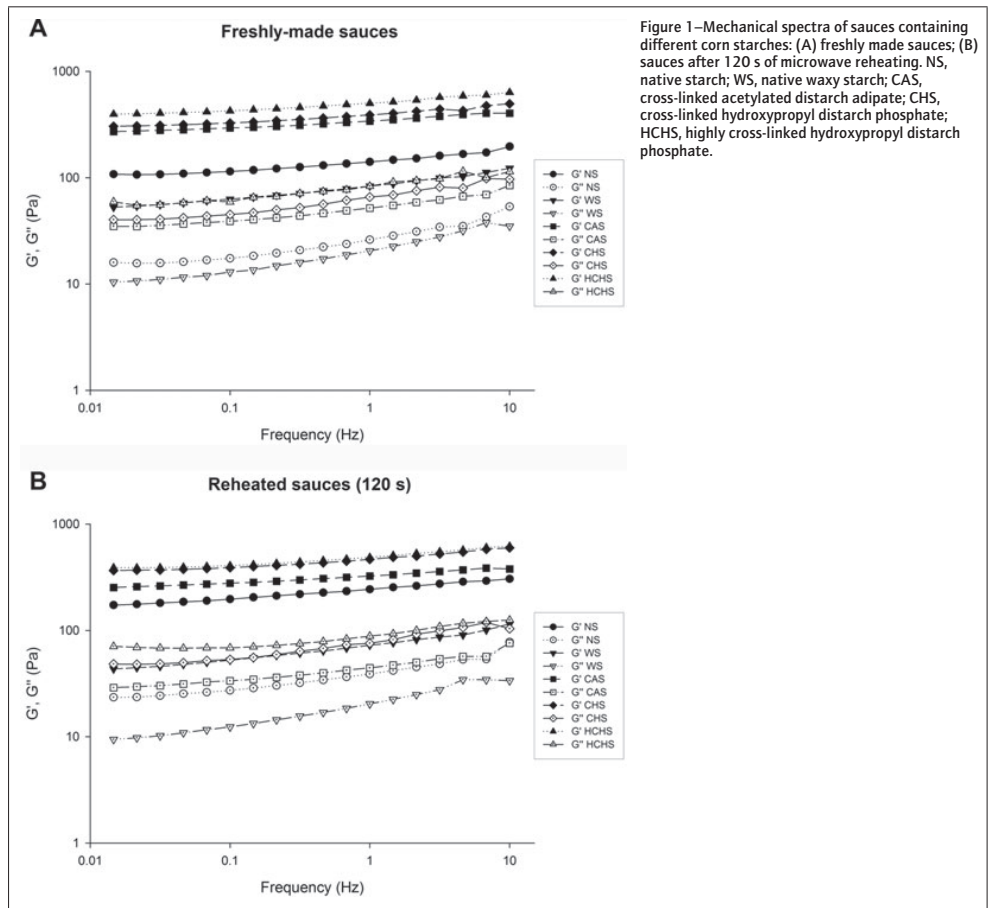
As for the comparison between both native starches, the WS white sauce showed lower  $G'$  and  $G''$  values and higher  $\tan \delta$  (value closer to 1) than the NS one, revealing the less elastic properties of the former. The lower elasticity of the white sauces prepared with waxy corn starch in comparison with normal corn starch was also previously observed by Arocas and others (2010). The effect was attributed to a high sensitivity of waxy starch to shearing conditions because of its lower granular rigidity.

Among the modified starch sauces, the acetylated starch white sauce (CAS) showed significantly lower  $G'$  and  $G''$  values than

both hydroxypropyl starch sauces (CHS and HCHS), the  $G'$  and  $G''$  values of HCHS being significantly the highest. Arocas and others (2009b) also found that white sauces formulated with acetylated starch had lower  $G'$  and  $G''$  values than those formulated with hydroxypropyl starch. Similar results were found by Tárrega and others (2005) in milk–starch mixtures. Hydroxypropyl groups weaken the internal bond structure of the granules promoting water penetration (Gunaratne and Corke 2007). Since hydroxypropyl groups are more hydrophilic than acetyl ones, they could retain water in a greater extent and so granules in hydroxypropyl starches have a greater swelling power before disintegrate. This could explain the highest consistency of sauces containing hydroxypropyl substituted starches.

**Influence of reheating time**

Both native and modified starches were stable for reheating treatment until long microwave treatment is applied (Table 1). Changes



in the rheological parameter values ( $G'$ ,  $G''$ ) due to reheating were significant only when long reheating times were applied (300 s for modified starches and 480 s for native starches). Before 300 s of microwave reheating, all the sauces maintained their rheological parameters, but once 300 s was reached for modified starches and 480 s for native starches  $G'$  and  $G''$  values increased significantly ( $P < 0.05$ ).

In Table 2, the moisture content (%) of the sauces after the different reheating times is shown. An inverse relationship between water loss and  $G'$  and  $G''$  values was observed. The changes in the viscoelastic behavior of the sauces occurred only when water loss by evaporation was significant.

The temperature profiles of the different sauces submitted to microwave heating are shown in Figure 2. As can be noticed, there were 2 different heating patterns. Sauces made with native starches (NS and WS) reached high temperatures sooner than those made with modified ones (CAS, CHS, and HCHS). Tattiyakul and others (2002) have shown that heat-transfer rate in cross-linked waxy corn starch dispersions submitted to conventional heating was slower than in normal corn starch dispersions. This fact was related to the higher viscosities reached in the former due to the high volume fraction of swollen starch granules.

However, the native starches showed lower water loss in comparison with modified ones (Table 2). The different water retention properties among the native and the modified starch sauces can be explained due to their different structure. Native starch granules disintegrate during white sauce manufacturing releasing the soluble starch polymers to the continuous phase. The soluble starch (mainly amylopectin) may interact with water molecules further avoiding water evaporation during reheating.

The fact that the observed changes in  $G'$  and  $G''$  values upon long reheating times (300 and 480 s) were due to water loss rather than to a change in the sauce structure was also supported by the fact that the  $\tan \delta$  values were not affected, denoting that no substantial change in the type of structure occurred.

The stability of the white sauce viscoelastic properties during microwave reheating was in agreement with previous results from Arocas and others (2009b) where conventional heating was carried out. These authors had shown that the  $G'$  and  $G''$  values of freshly made white sauce samples did not change during heating *in situ* in the rheometer plate.

CLSM and image analysis

Figure 3 shows micrographs of the different sauces analyzed. Nile red highlights fat globules in green color; however, the in-

tensity of the signal collected declined quickly as a consequence of photobleaching (Herbert and others 1999; Heilig and others 2009). This is the reason why in some images—for example, samples elaborated with WS and heated for prolonged time—the fat globules are observed as black holes. Rhodamine B has the capacity to stain starch and protein phases in red but appears to have higher affinity for the latter (Tromp and others 2001; van de Velde and others 2002). Thus, this fact must be taken into account when analyzing the structures of white sauces since protein and starch can be distinguished by the intensity of the signal collected.

The NS sauces show a complex matrix composed mainly of protein in bright red and polysaccharides in dark red. Most of these polysaccharides are amylose and amylopectin leached from the granules that have been disintegrated during the cooking process. The starch polymers are distributed along with *t*-carrageenan and milk protein. Garnier and others (2003) showed in casein/*t*-carrageenan mixtures observed by CLSM that casein appeared concentrated in aggregates and *t*-carrageenan was located in dark areas constituting the continuous phase. Artoft and others (2007a,b) observed by CLSM a gelled network of carrageenan connecting and stabilizing protein aggregates in a dairy dessert made of carrageenan and starch and in carrageenan-milk gels. In the present study, fat globules were observed in green, homogeneously dispersed and associated with the protein phase. A similar fat distribution was observed by Auty and others (2001) in processed cheese. As heating time increased, protein aggregates were formed but no significant differences in fat globule size were observed (Table 3). Samples with WS showed a similar structure to NS ones not showing apparent differences in the protein matrix

Table 3—Mean values of the 80th percentiles of fat globule area ( $\mu\text{m}^2$ ) of freshly made and 480 s microwave-reheated sauces.

Reheating time (s)	Type of starch				
	NS	WS	CAS	CHS	HCHS
Freshly made	6.32 <sup>a</sup> (0.97)	9.62 <sup>a</sup> (0.85)	10.86 <sup>a</sup> (3.01)	9.68 <sup>a</sup> (3.31)	9.99 <sup>a</sup> (1.59)
480	7.66 <sup>a</sup> (0.99)	9.28 <sup>a</sup> (1.94)	11.54 <sup>a</sup> (2.27)	15.99 <sup>b</sup> (4.34)	27.89 <sup>b</sup> (9.46)

Values between parentheses are the standard deviations.  
<sup>ab</sup> Values with different letters within the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ) according to the LSD multiple range test.  
 Type of corn starch: NS, native starch; WS, native waxy starch; CAS, cross-linked acetylated distarch adipate; CHS, cross-linked hydroxypropyl distarch phosphate; HCHS, highly cross-linked hydroxypropyl distarch phosphate.

Table 2—Moisture content (%) for the different sauces and reheating times.

Type of starch	Reheating time (s)						
	Freshly made	60	90	120	180	300	480
NS	83.6 <sup>AB</sup> (0.3)	83.9 <sup>B</sup> (0.1)	83.8 <sup>B</sup> (0.3)	83.7 <sup>B</sup> (0.1)	83.4 <sup>AB</sup> (0.0)	83.1 <sup>BC</sup> (0.1)	83.0 <sup>C</sup> (0.3)
WS	84.1 <sup>A</sup> (0.3)	84.1 <sup>A</sup> (0.1)	83.8 <sup>A</sup> (0.9)	83.9 <sup>A</sup> (0.4)	84.0 <sup>A</sup> (0.2)	83.7 <sup>A</sup> (0.5)	82.5 <sup>B</sup> (0.4)
CAS	83.9 <sup>A</sup> (0.1)	83.8 <sup>A</sup> (0.2)	83.8 <sup>A</sup> (0.2)	84.0 <sup>A</sup> (0.0)	83.7 <sup>A</sup> (0.2)	81.4 <sup>B</sup> (0.1)	79.8 <sup>C</sup> (0.1)
CHS	83.8 <sup>A</sup> (0.1)	83.6 <sup>A</sup> (0.7)	83.9 <sup>A</sup> (0.2)	83.8 <sup>A</sup> (0.0)	83.7 <sup>A</sup> (0.1)	81.4 <sup>B</sup> (0.3)	78.2 <sup>C</sup> (0.0)
HCHS	83.9 <sup>AB</sup> (0.1)	84.1 <sup>B</sup> (0.1)	84.0 <sup>B</sup> (0.1)	83.9 <sup>AB</sup> (0.0)	83.6 <sup>AC</sup> (0.3)	83.5 <sup>C</sup> (0.1)	78.6 <sup>D</sup> (0.1)

Values between parentheses are the standard deviations.  
<sup>ABC</sup> Values with different letters within the same row are significantly different ( $P < 0.05$ ) according to the LSD multiple range test.  
<sup>abc</sup> Values with different letters within the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ) according to the LSD multiple range test.  
 Type of corn starch: NS, native starch; WS, native waxy starch; CAS, cross-linked acetylated distarch adipate; CHS, cross-linked hydroxypropyl distarch phosphate; HCHS, highly cross-linked hydroxypropyl distarch phosphate.



and in the fat globule size (Table 3). Therefore, due to the possibility of preserving the globule size during reheating, the use of both NS and WS starches could be used to retain the creaminess of the sauces during reheating. Richardson and Booth (1993) suggested that high density of even small-sized globules in dairy homogenized products, together with the sensation of thickness generated by a sufficient viscosity, is necessary to give a realistic sensation of creaminess. Moreover, de Wijk and others (2006) suggested that creaminess in semisolid starch-based foods can be improved by the presence of small and stable fat droplets.

Samples with CHS and HCHS showed swollen starch granules and a protein matrix associated with fat globules. As heating time increased, protein tended to aggregate and the size of fat globules increased significantly due to coalescence (Table 3). Sauces containing CAS showed an intermediate structure between native and the hydroxypropyl distarch phosphate starches, since starch granules do not swell as they do in CHS and HCHS and fat globules' size showed no significant differences as heating time increased (Table 3). This intermediate structure could be related to the different chemical modifications in the starch. Mason (2009) stated that hydroxypropyl substitution was more stable to prolonged high temperature than acetylation since hydroxypropyl groups appeared to create more steric hindrance. This could explain the higher granule swelling power of CHS and HCHS before rupture which could also be related to the higher consistency of sauces formulated with these types of starch as previously reported.

Figure 4 shows 3D reconstructions of image stacks of sauces made with different starches (fresh and 300 s microwave reheated sauces). The 3D visualization permits to better understand microstructure of samples since it is possible to analyze the shape of swollen starch granules, fat globules, and protein aggregates. As can be seen, fat globules showed a spherical shape while starch granules remained with an irregular size and shape acting as a dispersed phase. Moreover, starch granules in modified starch-based sauces did not show an apparent increase in their size after microwave reheating which supports the idea that starch granules are cooked properly in sauce elaboration, and no further structural changes are achieved when subjected to microwave reheating. However, fat

globule size increased in reheated sauces made with hydroxypropyl modified starches.

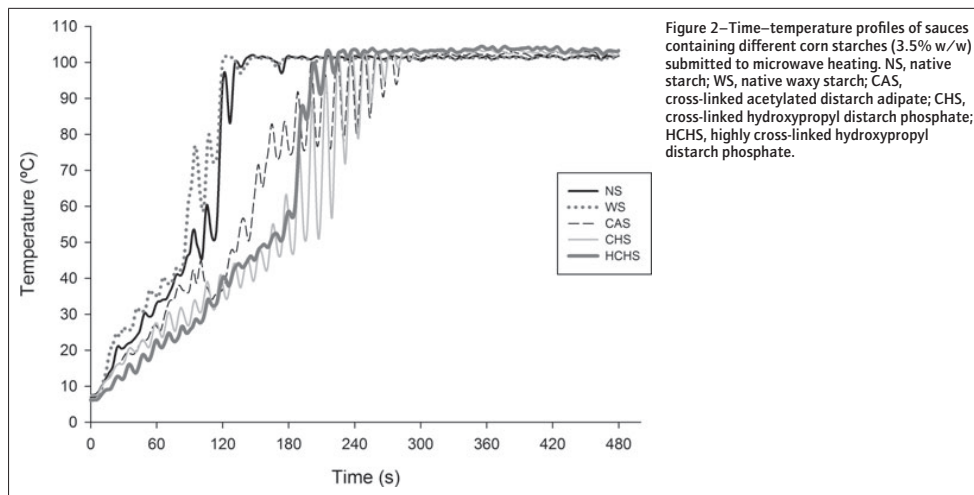
These results showed that the swelling of the modified starch granules favored protein aggregation. As fat globules are associated with the protein phase, the protein aggregation favors the fat globules to coalesce, increasing their size. Finally, similarities between NS and WS sauces indicated that the distribution and size of fat globules and matrix microstructure are independent of the proportion between the starch polymers (amylose and amylopectin).

## Conclusions

Changes in rheological parameters only occurred after long microwave reheating and were associated with dehydration rather than with structural changes in the sauces, that is, samples did not show significant changes in  $\tan \delta$ . The water loss during heating was lower in native starch sauces than in modified ones which could be explained by a higher interaction between leached starch polymers and water, once starch granule is disintegrated in native starch sauces. The rheological parameters were almost constant until 300 s of microwave reheating. This could be explained because starch and *t*-carrageenan, which are mainly responsible for the rheological behavior, were not affected by reheating.

CLSM was a useful tool to visualize differences in starch swelling stages depending on the type of starch, as well as fat globule size and distribution and degree of protein aggregation. The main structural changes occurring during heating were due to changes in fat and protein phases. These changes were more evident when modified starches were used in the formulation of the sauces as granule swelling favored protein aggregation and fat coalescence.

In native starch sauces (NS and WS) fat globules were maintained homogeneously dispersed within the sauce matrix. Moreover, fat globules' size was maintained regardless of the reheating time the sauces were subjected to. This fact is noticeable since small and homogeneously dispersed fat droplets could improve creaminess perception, especially in low-fat starch-based sauces.





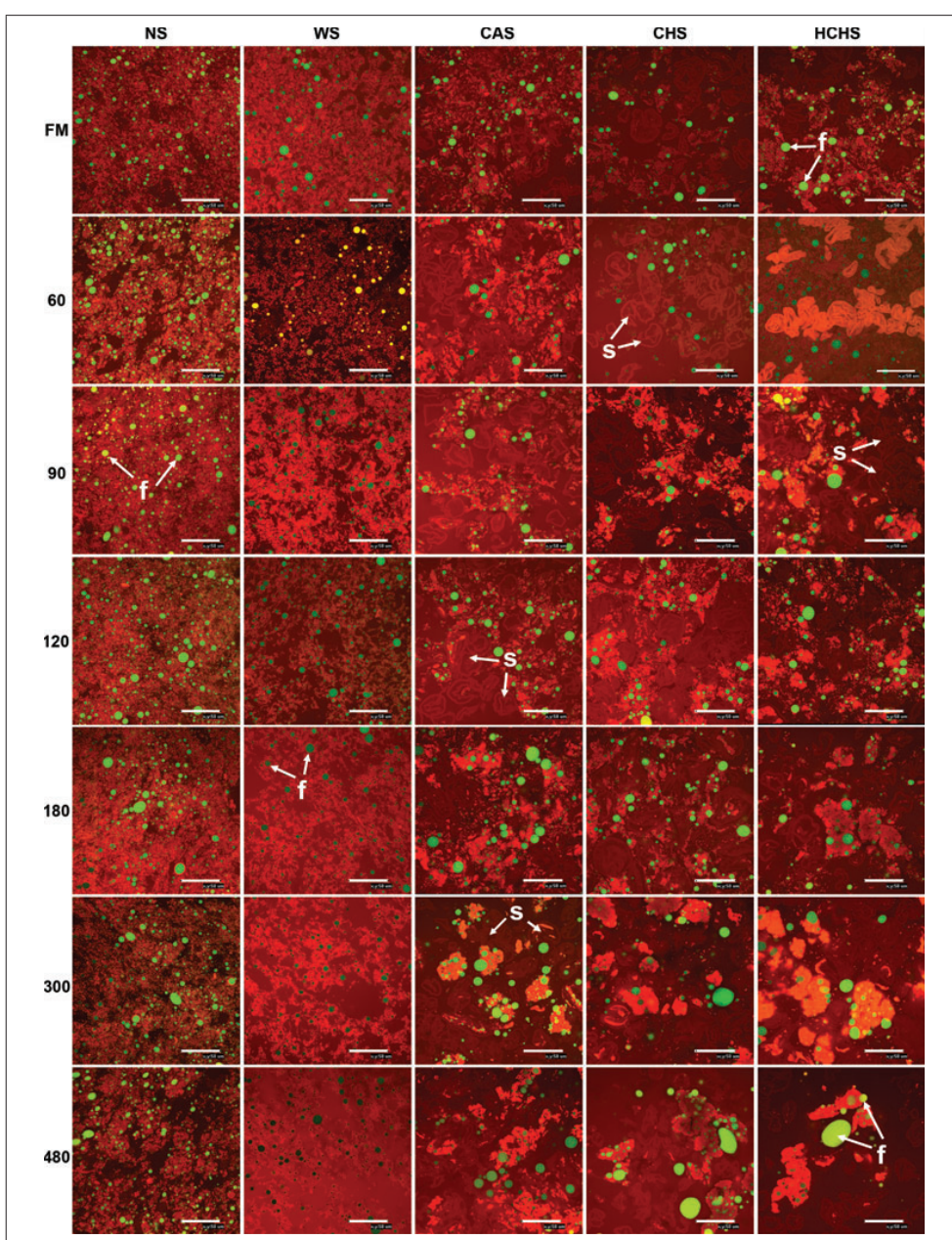


Figure 3—Micrographs of the sauces elaborated with different corn starches after different reheating times. In columns, sauces with different starches: NS, native starch; WS, native waxy starch; CAS, cross-linked acetylated distarch adipate; CHS, cross-linked hydroxypropyl distarch phosphate; HCHS, highly cross-linked hydroxypropyl distarch phosphate. In rows, different reheating times (in seconds). FM: freshly made; f: fat globule; S: starch granule. Scale bar: 50  $\mu$ m.

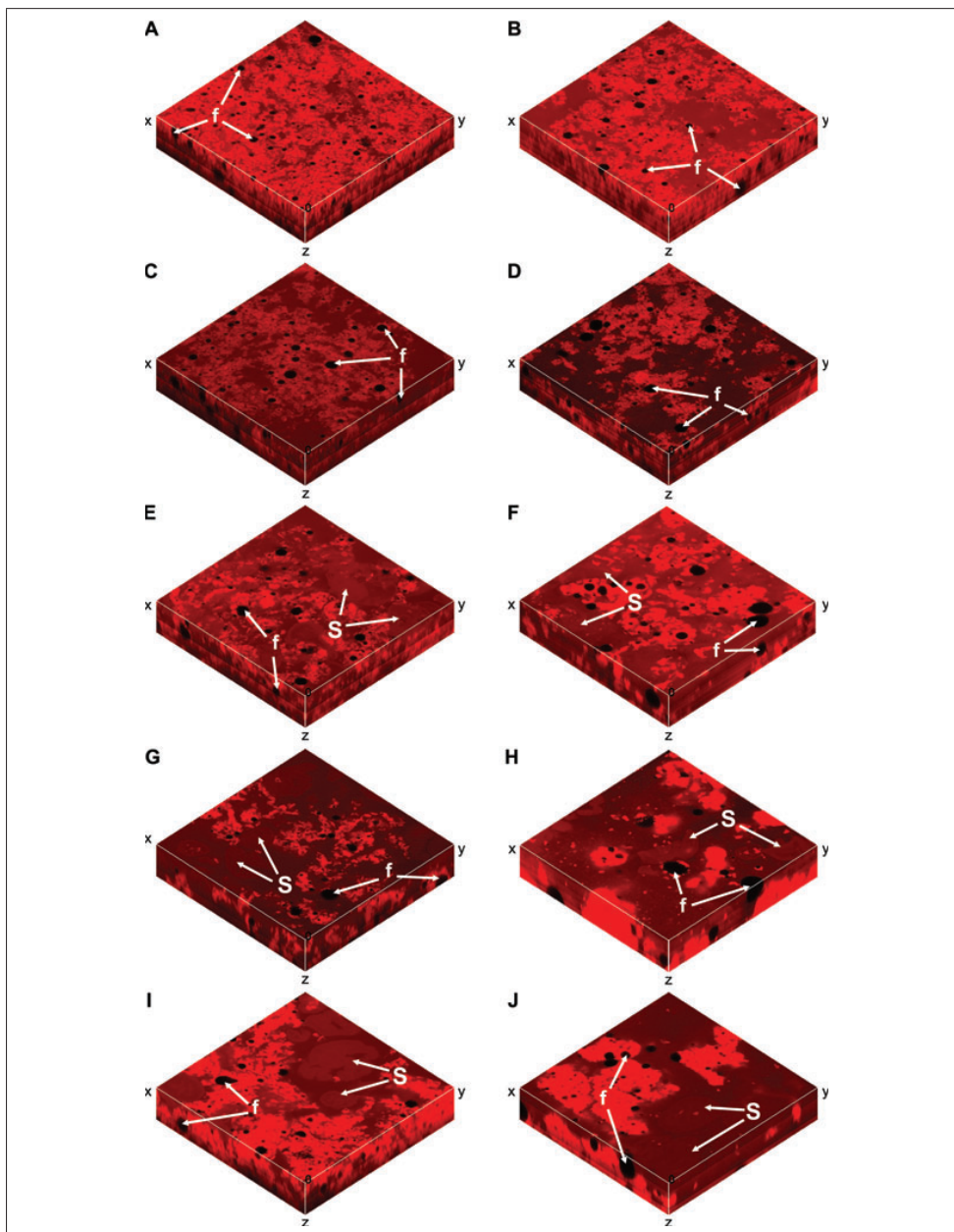


Figure 4—3D reconstruction of image stacks from samples formulated with different corn starches: (A, B) native starch; (C, D) waxy starch; (E, F) cross-linked acetylated distarch adipate; (G, H) cross-linked hydroxypropyl distarch phosphate; (I, J) highly cross-linked hydroxypropyl distarch phosphate. (A, C, E, G, I) Freshly made samples; (B, D, F, H, J) microwave-reheated samples during 300 s. f: Fat globule; S: starch granule. 3D reconstruction dimensions: 100 x 100 x 20  $\mu\text{m}$ .

## Acknowledgments

The authors are grateful for the economic support (project AGL2006-11653-C01 and C02) received from the Ministerio de Ciencia e Innovación and the FPU grant awarded to L.M. Guardoño.

## References

- Aguilera JM. 2005. Why food microstructure? *J Food Eng* 67(1-2):3-11.
- Arltoft D, Ipsen R, Madsen F, de Vries J. 2007a. Interactions between carrageenans and milk proteins: a microstructural and rheological study. *Biomacromolecules* 8(2):729-36.
- Arltoft D, Madsen F, Ipsen R. 2007b. Screening of probes for specific localisation of polysaccharides. *Food Hydrocolloids* 21(7):1062-71.
- Arocas A, Sanz T, Fizman SM. 2009a. Clean label starches as thickeners in white sauces. Shearing, heating and freeze/thaw stability. *Food Hydrocolloids* 23(8):2031-7.
- Arocas A, Sanz T, Fizman SM. 2009b. Influence of corn starch type in the rheological properties of a white sauce after heating and freezing. *Food Hydrocolloids* 23(3):901-7.
- Arocas A, Sanz T, Hernández C, Hernando MI, Fizman SM. 2010. Effect of cooking time and ingredients on the performance of different starches in white sauces. *Eur Food Res Technol* 231(3):395-405.
- Auty MAE, Twomey M, Guinee TP, Mulvihill DM. 2001. Development and application of confocal scanning laser microscopy methods for studying the distribution of fat and protein in selected dairy products. *J Dairy Res* 68(03):417-27.
- Bilbao-Sáinz C, Butler M, Weaver T, Bent J. 2007. Wheat starch gelatinization under microwave irradiation and conduction heating. *Carbohydr Polym* 69(2):224-32.
- de Wijk RA, Terpstra MEJ, Janssen AM, Prinz JF. 2006. Perceived creaminess of semi-solid foods. *Trends Food Sci Technol* 17(8):412-22.
- Dürrenberger MB, Handschin S, Conde-Petit B, Escher F. 2001. Visualization of food structure by confocal laser scanning microscopy (CLSM). *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 34(1):11-7.
- Ferrando M, Spiess WEL. 2000. Review: confocal scanning laser microscopy: A powerful tool in food science revision: microscopía láser confocal de barrido. Una potente herramienta en la ciencia de los alimentos. *Food Sci Technol Int* 6(4):267-84.
- Garnier C, Michon C, Durand S, Cuvelier G, Doublier JL, Launay B. 2003. Iota-carrageenan/casein micelles interactions: evidence at different scales. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* 31(1-4):177-84.
- Goebel NK, Grider J, Davis EA, Gordon J. 1984. The effects of microwave energy and convection heating on wheat starch granule transformations. *Food Microstruct* 3(1):73-82.
- Guardoño LM, Catalá-Givera JM, Plaza-González P, Sanz T, Salvador A, Fizman SM, Hernando I. 2010. Dielectric, microstructural and flow properties of sauce model systems based on starch, gums and salt. *J Food Eng* 98(1):34-43.
- Guararatae A, Corke H. 2007. Effect of hydroxypropylation and alkaline treatment in hydroxypropylation on some structural and physicochemical properties of heat-moisture treated wheat, potato and waxy maize starches. *Carbohydr Polym* 68(2):305-13.
- Gunasekaran S, Ding K. 1999. Three-dimensional characteristics of fat globules in cheddar cheese. *J Dairy Sci* 82(9):1890-6.
- Heilig A, Göggerle A, Hinrichs J. 2009. Multiphase visualization of fat containing [beta]-lactoglobulin-[kappa]-carrageenan gels by confocal scanning laser microscopy, using a novel dye, V03-01136, for fat staining LWT—Food Sci Technol 42(2):646-53.
- Herbert S, Bouchet B, Riaublanc A, Dufour E, Gallant D. 1999. Multiple fluorescence labelling of proteins, lipids and whey in dairy products using confocal microscopy. *Lait* 79(6):567-75.
- Heyman B, Depypere F, Delbaere C, Dewettinck K. 2010. Effects of non-starch hydrocolloids on the physicochemical properties and stability of a commercial béchamel sauce. *J Food Eng* 99(2):115-20.
- Mandala IG, Savvas TP, Kostaropoulos AE. 2004. Xanthan and locust bean gum influence on the rheology and structure of a white model-sauce. *J Food Eng* 64(3):335-42.
- Mason WR. 2009. Starch use in foods. In: James B, Roy W, editors. *Starch*. 3rd ed. San Diego, Calif.: Academic Press. p. 745-95.
- Palav T, Seetharaman K. 2006. Mechanism of starch gelatinization and polymer leaching during microwave heating. *Carbohydr Polym* 65(3):364-70.
- Palav T, Seetharaman K. 2007. Impact of microwave heating on the physico-chemical properties of a starch-water model system. *Carbohydr Polym* 67(4):596-604.
- Pateras IMC, Howells KF, Rosenthal AJ. 1994. Hot-stage microscopy of cake batter bubbles during simulated baking: sucrose replacement by polydextrose. *J Food Sci* 59(1):168-78.
- Richardson N, Booth D, Stanley N. 1993. Effect of homogenization and fat content on oral perception of low and high viscosity model creams. *J Sens Stud* 8(2):133-43.
- Rosalina I, Bhattacharya M. 2002. Dynamic rheological measurements and analysis of starch gels. *Carbohydr Polym* 48(2):191-202.
- Sikora M, Badrie N, Deisingh AK, Kowalski S. 2008. Sauces and dressings: a review of properties and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* 48(1):50-77.
- Tárraga A, Véllez-Ruiz JF, Costell E. 2005. Influence of milk on the rheological behaviour of cross-linked waxy maize and tapioca starch dispersions. *Food Res Int* 38(7):759-68.
- Tattiyakul J, Rao MA, Datta AK. 2002. Heat transfer to three canned fluids of different thermo-rheological behaviour under intermittent agitation. *Food Bioprocess Processing* 80(1):20-7.
- Thebaudin JY, Lefebvre AC, Doublier JL. 1998. Rheology of starch pastes from starches of different origins: applications to starch-based sauces. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 31(4):354-60.
- Tromp RH, van de Velde F, van Riel J, Paques M. 2001. Confocal scanning light microscopy (CSLM) on mixtures of gelatine and polysaccharides. *Food Res Int* 34(10):931-8.
- van de Velde F, van Riel J, Tromp RH. 2002. Visualisation of starch granule morphologies using confocal scanning laser microscopy CSLM. *J Sci Food Agric* 82:1528-36.
- van de Velde F, Weinbreck F, Edelman MW, van der Linden E, Tromp RH. 2003. Visualisation of biopolymer mixtures using confocal scanning laser microscopy (CSLM) and covalent labelling techniques. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* 31(1-4):159-68.
- Vu Dang H, Loisel C, Desrumaux A, Doublier JL. 2009. Rheology and microstructure of cross-linked waxy maize starch/whey protein suspensions. *Food Hydrocolloids* 23(7):1678-86.



## Chemical and Structural Changes in White Sauces Thawed by Microwave or Conventional Oven

L. M. GUARDEÑO, E. LLORCA, I. PÉREZ-MUNUERA, A. QUILES and I. HERNANDO\*

*Grupo de Microestructura y Química de Alimentos, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad Politécnica de Valencia, 46022 Valencia, Spain. \*E-mail: mihernan@tal.upv.es*

**Abstract:** Proteins, lipids and structural changes in white sauces after being stored at  $-18^{\circ}\text{C}$  and thawed by microwave and conventional oven were studied in this work. The total crude and soluble protein fractions were quantified by N-Kjeldahl. The acidity grade and oxidation spectrophotometric parameters ( $k_{232}$  and  $k_{270}$ ) were used to analyse the lipid fraction. In addition, confocal scanning laser microscopy (CSLM) was used to study the structure of the sauce. The results showed that the total crude protein fraction increased in the thawed samples if compared to the freshly-prepared samples, mainly when microwave oven was used. However, the soluble protein fraction did not vary significantly ( $P < 0.05$ ) among the different samples. Regarding the lipid changes, the acidity index did not show significant differences among the samples.  $K_{232}$  values of the microwave-thawed samples differed significantly from the freshly-prepared and the conventional-thawed samples. Furthermore,  $k_{270}$  values were significantly different between the samples thawed using the conventional oven and the freshly-prepared ones. CSLM images showed degradation of the starch granules and an increase of size in the fat globules due to thawing.

**Keywords:** sauce; microwave; thawing; microstructure; CSLM; chemical changes

### INTRODUCTION

Nowadays, ready-to-eat meals have consolidated as a common option to eat, due to the lack of time for cooking. The use of microwave oven (MO) has risen as a quick method to prepare, thaw or reheat foodstuffs. The effects of microwave heating on the food components can differ from those produced by conventional heating. The main studies relating the effects of microwave to changes on food components have been found on oils (ALBI *et al.* 1997; YOSHIDA *et al.* 2003; MALHEIRO *et al.* 2009). It has been speculated that free radicals can be formed by exposure to microwave energy (ALBI *et al.* 1997) and it was found that the rate of oxidation, depends on the polyunsaturated fatty acid content (HASSANEIN *et al.* 2003).

Regarding microstructure, there are some studies about the effect of microwaves on textural and microstructural properties of starch-water model systems (PALAV & SEETHARAMAN 2006; BILBAO-

SÁINZ 2007). Differences in gelatinisation process under conventional or microwave heating are analysed in these studies. However, there is a lack of information about the effect of microwaves on other food matrices.

The objective of this study is to investigate differences on chemical and microstructural characteristics of white sauces under different thawing methods.

### MATERIALS AND METHODS

**Materials and sample preparation.** The white sauce consisted of modified waxy corn starch (3.5% w/w) (hydroxypropyl distarch phosphate, Polar Tex 06748, Cargill, Inc., USA),  $\tau$ -carrageenan (0.50% w/w) (Secovis IS, Hispanagar, Burgos, Spain), skimmed milk powder (9.30% w/w) (Central Lechera Asturiana, Asturias, Spain), sunflower oil (2.55% w/w) (Koipesol, SOS Cuétara S.A., Madrid, Spain), sodium chloride (0.40% w/w) (Panreac



Química SAU, Barcelona, Spain) and water up to 100% w/w. Samples were prepared according to AROCAS *et al.* (2009). Samples (300 g) were frozen at  $-18^{\circ}\text{C}$  for a week. A batch of samples was thawed in a microwave oven (Moulinex Optimo, Paris, France) at 700 W for 6 min, and another batch was thawed in a conventional oven (Fagor 2CF-3V, Guipúzcoa, Spain) at  $220^{\circ}\text{C}$  for 30 min, until the samples were totally thawed.

**Protein fraction.** Both crude and soluble protein were determined by Kjeldahl procedure (AOAC 1998). The extraction of soluble nitrogen fraction was performed from the lyophilised sample by KUCHROO and FOX (1982) modified method. Three centrifugation cycles at 10 000 rpm were carried out at  $4^{\circ}\text{C}$ .

**Lipid fraction.** The acidity index was determined according to AOAC (1998), and  $k_{232}$  and  $k_{270}$  parameters were determined by spectrophotometric analysis (UNE 1973).

**Confocal scanning laser microscopy (CSLM).** A drop of the sample was put on a slide and stained with Rodhamine B (2 g/l) and Nile Red (1 g/l) solutions. Then, the mixture was covered with a cover glass. The samples were observed in a CSLM (Nikon confocal microscope C1 fitted to a Nikon Eclipse E800 microscope, Nikon Co., Ltd., Tokyo, Japan) in single photon mode equipped with an Ar-Kr laser. The excitation wavelength and emission maxima of the applied fluorescent dyes were 568/625 nm for Rhodamine B and 647/675 nm for Nile Red. Images were stored using EZ-C1 software (Nikon Co., Ltd., Tokyo, Japan).

**Statistical analysis.** The statistical analysis was carried out by ANOVA and the least significant differences (LSD) were calculated at significance level  $P < 0.05$ . The statistics software Statgraphics Plus version 5.1 (Manugistics, Inc., Rockville, USA) was used.

## RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the values of the parameters measured in the fresh and thawed sauces. The results show that total protein crude fraction increased when samples were thawed. This increase was significant in samples thawed in the microwave oven (MO) due to the evaporation of water. The internal temperature gradient generated in microwave heating forces the moisture to transfer to the surface (MEDA *et al.* 2005) favouring water evaporation. In the conventional oven (CO), the high temperature at the surface of the product leads to dehydration and forms a crust that could limit this evaporation. The soluble nitrogen fraction was not significantly different in samples thawed by both methods if compared to fresh ones; so, thawing did not cause changes in the solubility of proteins. Regarding to lipid changes, significant differences were not found among the samples when acidity index was analysed. This indicates that not evident lipolysis is produced in the samples during thawing using MO or CO.  $k_{232}$  and  $k_{270}$  parameters mainly indicate the conjugation of trienes and the presence of secondary oxidative products, respectively (MALHEIRO *et al.* 2009).  $K_{232}$  values of microwave-thawed samples differed significantly from the freshly-prepared and the conventional-thawed ones. Furthermore,  $k_{270}$  values were significantly different between samples thawed using conventional oven and freshly-prepared ones. Secondary oxidation products (mainly  $\alpha$ - $\beta$  diketones and  $\alpha$ -unsaturated ketones) are formed during CO thawing due to heat.

CSLM images from freshly made sauces (Figure 1A) showed the starch granules immersed in a protein matrix; these starch granules had partially resisted the heat during the elaboration of the sauce. The starch granules in microwave-thawed samples

Table 1. Means of the protein and lipid fraction parameters analysed in freshly-prepared, microwave-thawed and conventional-thawed samples

Sample	Crude protein (g/100 g)	Soluble protein (g/100 g)	Acidity index <sup>1</sup>	$K_{232}$	$K_{270}$
Fresh	3.35 (0.18) <sup>a</sup>	0.44 (0.09) <sup>a</sup>	0.92 (0.04) <sup>a</sup>	5.67 (0.64) <sup>a</sup>	1.21 (0.58) <sup>a</sup>
Microwave-thawed	3.75 (0.07) <sup>b</sup>	0.50 (0.05) <sup>a</sup>	0.89 (0.03) <sup>a</sup>	4.80 (0.20) <sup>b</sup>	1.61 (0.10) <sup>ab</sup>
Conventional-thawed	3.46 (0.05) <sup>a</sup>	0.50 (0.15) <sup>a</sup>	0.91 (0.07) <sup>a</sup>	5.71 (0.28) <sup>a</sup>	1.88 (0.11) <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Values in parenthesis denote standard deviation among measurements; <sup>abc</sup>different letters in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) according to the LSD multiple range test; <sup>1</sup>expressed as percent of oleic acid

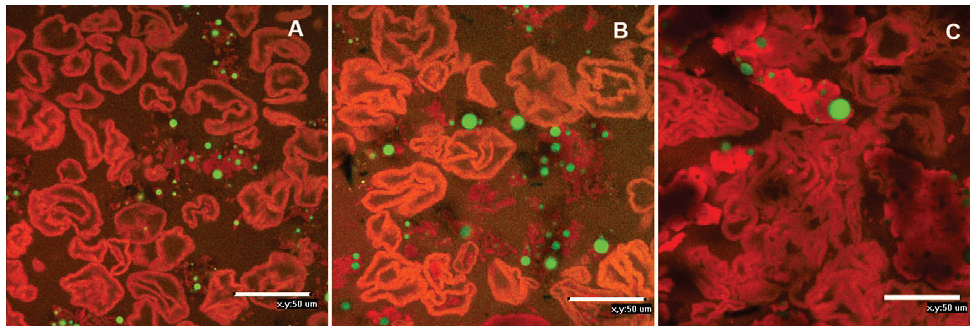


Figure 1. CSLM images of sauces. A: freshly prepared sauce. B: microwave-thawed sauce. C: conventional-thawed sauce. SG starch granules in red, fat globules in green. Magnification 60×

(Figure 1B) showed a slight swelling without evident leaching of the starch components. The starch granules in samples thawed by conventional oven (Figure 1C) were observed gelatinised with leaching of the starch components out of the granule. This difference in the gelatinisation degree must be due to the different thawing times, longer in CO than MO. The fat globules were stabilised by the protein matrix and it can be noticed that the globule size increased when samples were thawed, due to the coalescence produced by heating.

**Acknowledgements:** The authors are grateful for the economic support (Project AGL2006-11653-C02) received from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain).

### References

- ALBI T., LANZÓN A., GUINDA A., PÉREZ-CAMINO M.C., LEÓN M. (1997): Microwave and conventional heating effects on some physical and chemical parameters of edible fats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**: 3000–3003.
- AOAC. (1998): Official Methods of Analysis. 16<sup>th</sup> Ed. Association of Official Analytical Chemist, Washington.
- AROCAS A., SANZ T., FIZSMAN S. (2009). Influence of corn starch type in the rheological properties of a white sauce after heating and freezing. *Food Hydrocolloids*, **23**: 901–909.
- BILBAO-SÁINZ C., BUTLER M., WEAVER T., BENT J. (2007): Wheat starch gelatinisation under microwave irradiation and conduction heating. *Carbohydrate Polymers*, **69**: 224–232.
- HASSANEIN M.M., EL-SHAMI S.M., EL-MALLAH M.H. (2003): Changes occurring in vegetable oils composition due to microwave heating. *Grasas y aceites*, **54**: 343–349.
- KUCHROO C.N., FOX P.F. (1982): Fractionation of the water-soluble-nitrogen from Cheddar cheese: chemical methods. *Milchwissenschaft*, **37**: 651–653.
- MALHEIRO R., OLIVEIRA I., VILAS-BOAS M., FALCÃO S., BENTO A., PEREIRA J.A. (2009): Effect of microwave heating with different exposure times on physical and chemical parameters of olive oil. *Food and Chemical Toxicology*, **47**: 92–97.
- MEDA V., ORSAT V., RAGHAVAN G.S.V. (2005): Microwave heating and dielectric properties of foods. In: SCHUDER H., REGIER M. (eds): *The Microwave Processing of Foods*. CRC Press, Woodhead Publishing, Ltd., Cambridge: 61–75.
- PALAV T., SEETHARAMAN K. (2006): Mechanism of starch gelatinization and polymer leaching during microwave heating. *Carbohydrate Polymers*, **65**: 364–370.
- UNE (1973): Una Norma Española. *Materias Grasas*. No. 55-047-73.
- YOSHIDA H., HIRAKAWA Y., TOMIYAMA Y., MIZUSHINA Y. (2003): Effects of microwave treatment on the oxidative stability of peanut (*Arachis hypogaea*) oils and the molecular species of their triacylglycerols. *European Journals of Lipid Science and Technology*, **105**: 351–358.







Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Food Engineering

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jfoodeng](http://www.elsevier.com/locate/jfoodeng)

## Structural stability of white sauces prepared with different types of fats and thawed in a microwave oven

M. Hernández-Carrión<sup>a</sup>, L.M. Guardado<sup>a</sup>, J.M. Carot<sup>b</sup>, I. Pérez-Munuera<sup>a</sup>, A. Quiles<sup>a</sup>, I. Hernando<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Tecnología de Alimentos, Grupo de Microestructura y Química de Alimentos, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

<sup>b</sup>Departamento de Estadística e Investigación Operativa Aplicadas y Calidad, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 November 2010  
Received in revised form 17 December 2010  
Accepted 15 January 2011  
Available online 22 January 2011

#### Keywords:

Sauces  
Fat  
Microwave  
CLSM  
Dielectric properties  
Image analysis

### ABSTRACT

This paper describes the microstructure and dielectric properties of white sauces prepared with different fats (sunflower oil, olive oil, soy oil, and butter) and agitation speeds (350, 1100 and 3250 rpm). The structural stability of sauces during thawing using conventional oven (CO) and microwave oven (MO) are studied. The results showed that, for fresh samples (not subjected to the freeze–thaw cycle) an increase in agitation speed during elaboration from 350 to 1100 rpm caused a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in the fat globules area – regardless of the type of fat used; in the samples with sunflower and olive oils, a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the fat globules circularity and dielectric properties (dielectric constant and loss factor) was also produced. The thawing method used did not significantly ( $p > 0.05$ ) affect fat globule size and shape, regardless of the agitation speed and type of fat. Sauces that were stable during the freeze–thaw cycle were obtained using speeds of 1100 and 3250 rpm.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The ready-to-eat food sector is an expanding market. Today's lifestyle and smaller family units have contributed to an increase in the supply of food products that are pre-packaged and ready-to-eat. Freezing is a common preservation method for this type of products while many dishes contain sauces. As a result, there is the need to study the stability of these sauces during the freeze–thaw process.

Sauces are oil-in-water emulsions. An emulsion consists of two immiscible liquids with one of the liquids being dispersed as small spherical droplets in the other. Emulsions are thermodynamically unstable systems, and may break down through a variety of different physicochemical processes (Thanasukarn et al., 2004). There are five main mechanisms that can contribute to emulsion instability: creaming, flocculation, Ostwald ripening, coalescence and phase inversion. The rate at which an emulsion breaks down will be strongly influenced by composition, environmental conditions (temperature, pH, etc.) and processing conditions (Rousseau, 2000). The chemical and physical stability of emulsions during freezing and frozen storage is influenced by the polymorphism and degree of crystallinity of the lipids, and the phase behaviour of water. When emulsions freeze, the lipid droplets become pro-

gressively concentrated into the freeze-concentrate phase thereby coming into close contact with one another in the unfrozen aqueous channels between ice crystals. The concentration of the lipid droplets in these narrow channels could promote aggregation, flocculation and/or coalescence during the freeze–thaw process (Thanasukarn et al., 2004).

Many consumers thaw frozen meals in microwave ovens. The way in which food responds to the effect of microwaves depends primarily on its dielectric properties, which determine the interaction between the electromagnetic energy and the food (Guardado et al., 2010). The dielectric constant ( $\epsilon'$ ) quantifies the capacity of a material to store magnetic or electrical energy and to polarise it when subjected to an electrical field (Datta and Anantheswaran, 2001). The loss factor ( $\epsilon''$ ) is related to the ability of a material to dissipate electrical energy as heat. The penetration depth ( $d$ ) can be obtained from these two properties. It is defined as the distance the microwave radiation penetrates the food before its value is reduced to  $1/e$  of the initial field strength, where  $e$  is the neperian number (Miller et al., 1991).

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) offers a number of advantages over conventional techniques in the food products study. Sample preparation is easy and avoids artefacts (Blonk and Vanaalst, 1993). In addition, CLSM offers the possibility to look at different levels inside the sample, which gives three-dimensional information on the microstructure of the sample (Van Lent et al., 2008). This technique has been used in the food research on water-in-oil emulsions (Van Dalen, 2002; Van Lent et al., 2008;

\* Corresponding author. Tel.: +34 963 87 7363; fax: +34 963 87 7369.  
E-mail address: [mihernan@tal.upv.es](mailto:mihernan@tal.upv.es) (I. Hernando).

Vodovotz et al., 1996); and oil-in-water emulsions as sauces (Langton et al., 1999; Moschakis et al., 2005, 2010). Many of these studies use different image analysis softwares to quantify the size of the particles.

The aim of this work was to study the stability of white sauces thawed in a microwave oven by analysing the microstructure and comparing with thawing in a conventional oven. Sauces were elaborated using different types of fat and several agitation speeds. In freshly prepared samples dielectric properties were also examined.

## 2. Material and methods

### 2.1. Materials

Modified waxy corn starch (Hydroxypropyl distarch phosphate, C Polar Tex 06748, Cargill, Inc., Minneapolis, USA); ι-carrageenan (Secovis IS, Hispanagar, Burgos, Spain); skimmed milk powder (Central Asturiana, Asturias, Spain); sunflower oil (Koiipesol, SOS Cuétara SA, Madrid, Spain); extra virgin olive oil (Carbonell, SOS Cuétara SA, Madrid, Spain); virgin soy oil (SL Biolasi Natural Products, Guipúzcoa, Spain); butter (Président, Lactalis Group, Laval, France); and sodium chloride (Panreac Química SAU, Barcelona, Spain).

### 2.2. Sample preparation

Sauces were prepared using modified waxy corn starch (3.5% w/w), ι-carrageenan (0.5% w/w), skimmed milk powder (9.3% w/w), salt (0.4% w/w), fat (2.55% w/w), and distilled water up to 100% w/w. Four types of fat were used to elaborate the sauces: sunflower oil, olive oil, soy oil, and butter. Samples (300 g) were prepared according to Arocas et al. (2009) in a food processor (Thermomix TM 31, Vorwerk, Wuppertal, Germany) at three different speeds, namely, 350, 1100 and 3250 rpm. The sauces were stored in Pyrex glass bottles until reaching room temperature, then part of the samples (freshly prepared samples) were analysed and the rest were frozen at  $-18^{\circ}\text{C}$ . After being frozen for a week, the samples were thawed in a conventional oven (Fagor 2CF-3V, Guipúzcoa, Spain) at  $220^{\circ}\text{C}$  for 30 min; or in a microwave oven (Moulinex Optimo, Paris, France) for 6 min and 30 s at 700 W and analysis were carried out. These conditions were chosen based on previous experiments in order to obtain an optimum consistency of the sauces after thawing.

### 2.3. Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

A Nikon confocal microscope C1 unit that was fitted on a Nikon Eclipse E800 microscope (Nikon, Tokyo, Japan) was used to study the microstructure. An Ar laser line (488 nm) was employed as light source to excite fluorescent dye Nile Red (Fluka, Sigma-Aldrich, Missouri, USA). A drop of the sample was put on a slide, stained with Nile Red (0.1 g/L in PEG 200), covered with a cover glass and visualised using an oil immersion objective lens (60 $\times$ ). 512  $\times$  512 pixel resolution images were randomly acquired.

### 2.4. Image analysis

The images obtained by CLSM were analysed using a ImageJ software (Rasband, W.S., ImageJ v. 1.43s, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) to determine the area, fat globules density (number of fat globules per field,  $fd$ ), and circularity. All the fat globules in four representative images from each sample were analysed.

### 2.5. Dielectric properties

The dielectric constant ( $\epsilon'$ ) and the loss factor ( $\epsilon''$ ) for the freshly prepared samples were determined at 2.45 GHz using an open-ended coaxial probe connected to a network vectorial analyser (Hewlett-Packard 85070M, Hewlett Packard Company, Palo Alto, CA, USA). Each sample was measured in quadruplicate. The network analyser was calibrated with air, a metallic short and water at  $25^{\circ}\text{C}$ . The penetration depth ( $d$ ) was determined according to Eq. (1) (Piyasena et al., 2003):

$$d = \frac{\lambda_0}{2\pi\sqrt{2\epsilon'}} \left[ \sqrt{1 + \left(\frac{\epsilon''}{\epsilon'}\right)^2} - 1 \right]^{-1} \quad (1)$$

where:  $\lambda_0$  = wavelength in free space (0.12237 m at a frequency of 2.45 GHz);  $\epsilon'$  = dielectric constant;  $\epsilon''$  = loss factor.

### 2.6. Experimental design and statistical analysis

A categorical multifactorial experimental design with two factors: type of fat (sunflower oil, olive oil, soy oil, and butter) and agitation speed (350, 1100, and 3250 rpm) was used for the freshly prepared samples. For the frozen-thawed samples a design with three factors was used: type of fat, agitation speed, and thawing treatment (conventional oven, CO and microwave oven, MO). Analysis of variance (ANOVA) was performed on the data using the Statgraphics Plus version 5.1 software package (Statistical Graphics Co., Rockville, MD, USA). The least significant differences (LSD) were calculated at the  $p < 0.05$  significance level to compare the test means.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Freshly prepared samples

#### 3.1.1. Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

The sample preparation with CLSM technique is not time consuming and changes the original structure of the specimen only minimally (Ferrando and Spiess, 2000). Fig. 1 shows the CLSM micrographs of freshly prepared samples in which the fat globules are stained in green by fluorescent dye Nile Red. The figure shows how the size of these globules decreases as agitation speed increases during the sauce elaboration. Similar results were obtained by Langton et al. (1999) when they studied the influence of speed on the fat globules size in the production of mayonnaise. According to the type of fat used in the sauce, it can be seen that the olive oil globules were slightly larger than when the other fats were used in the elaboration of the sauce. This effect was especially noticeable at 350 rpm.

#### 3.1.2. Image analysis

The size (area), fat globules density ( $fd$ ) and shape (circularity) of the fat globules were quantified by using image analysis on CLSM micrographs. As the fat globules areas for each of the samples did not follow a normal distribution, the percentile was considered as the appropriate statistical parameter rather than the arithmetic mean. The percentile 80 ( $p_{80}$ ), which represents the area value below which 80% of the analysed globules in each micrograph are found, was used. The arithmetic mean was used for  $fd$  and circularity.

Fig. 2A and B show the mean plots with LSD intervals for the area, in which no significant interactions ( $p > 0.05$ ) were observed between the agitation speed and the type of fat. The interaction plots with LSD intervals for  $fd$  and circularity, where significant interactions ( $p < 0.05$ ) between factors were observed, are shown

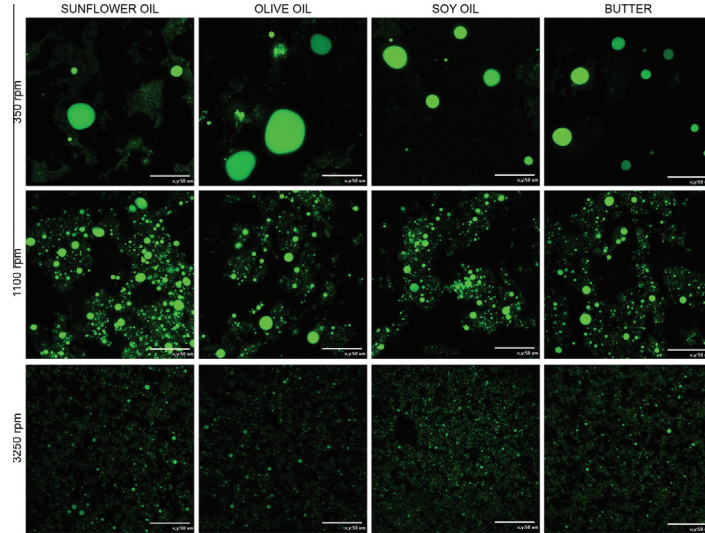


Fig. 1. Confocal laser scanning microscopy (CLSM). Freshly prepared samples elaborated with sunflower oil, olive oil, soy oil, and butter at speeds of 350, 1100, and 3250 rpm. Magnification 60 $\times$ .

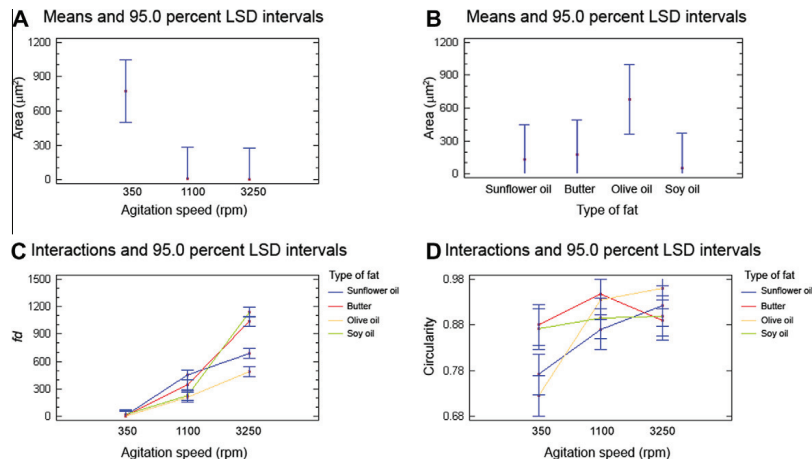


Fig. 2. Mean and interaction plots with LSD intervals. A and B: mean values for the area according to the agitation speed and the type of fat, respectively; C and D: interaction between agitation speed and type of fat for the fat globules density ( $fd$ ) and circularity, respectively.

in Fig. 2C and D. The increase of the agitation speed decreased the fat globules area significantly ( $p < 0.05$ ) from  $p_{80} = 771.20 \mu\text{m}^2$  when the sauces were prepared at 350 rpm, to  $p_{80} = 7.17 \mu\text{m}^2$  and  $2.20 \mu\text{m}^2$  when they were prepared using 1100 and 3250 rpm, respectively (Fig. 2A). No significant differences ( $p > 0.05$ ) were observed in area when different types of fat were used (Fig. 2B), although samples prepared with olive oil had larger globules –  $p_{80} = 679.11 \mu\text{m}^2$  – than the other ones –  $p_{80} = 174.19$ ,

131.99 and  $55.46 \mu\text{m}^2$  for butter, sunflower and soy oil, respectively.

With higher agitation speeds, there was a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the fat globules density ( $fd$ ) as shown in Fig. 2C. This behaviour is because increased agitation speed produces smaller globules – and therefore the number of these per field increases. However, this increase was dependent on the type of fat used in the sauce. In this sense it is found that the  $fd$  of the different fats

analysed was similar at 350 rpm; while the outcome was different at higher speeds and most variable at 3250 rpm. Sunflower oil samples had the highest  $fd$  at 1100 rpm, followed by butter; while olive oil and soy oil had lower but similar values. Soy oil and butter showed the maximum values of  $fd$  at 3250 rpm, while olive oil remained the lowest.

Agitation speed affected significantly ( $p < 0.05$ ) the fat globules circularity (Fig. 2D), although the effects varied according to the type of fat used in the sauce. With the exception of the butter samples, the fat globules circularity increased with increasing speed. However, this increase was only significant ( $p < 0.05$ ) for samples elaborated with sunflower oil (from  $0.77 \pm 0.18$  at 350 rpm to  $0.92 \pm 0.02$  at 3250 rpm) and olive oil (from  $0.72 \pm 0.07$  at 350 rpm to  $0.96 \pm 0.01$  at 3250 rpm), while it was no significant ( $p > 0.05$ ) for samples prepared with soy oil – in which the circularity varied slightly between  $0.87 \pm 0.01$  and  $0.90 \pm 0.02$  for the three speeds tested. These results are consistent with those of Langton et al. (1999), who found that increased speed during the mayonnaise preparation led to more circular fat globules. Similar results were obtained by Brown et al. (1995) who observed smaller and more circular particles in gels of gelatin and agar when the agitation speed was increased. This trend of circularity increasing with speed was not observed when butter was used. In this case, not significant differences ( $p > 0.05$ ) were found.

### 3.1.3. Dielectric properties

Knowledge of dielectric properties is essential for proper understanding of the heating pattern during microwave heating of foods, both in the cooking and in the reheating of precooked foods from frozen or refrigerated conditions (Prakash et al., 1992). Emulsions are colloidal dispersions of liquid particles in another liquid. The major effect of colloidal substances is to exclude more dielectrically active materials (mainly water) from the total volume, thus depressing the dielectric constant (Mudgett, 1995; Bengtsson and Risman, 1971). In multicomponent systems, the dielectric constant decreases by two mechanisms: firstly, the replacement of water by a substance with a lower dielectric constant, as is the case of fats and oils; and secondly, the binding of water molecules (Ryynänen, 2002).

Significant interactions ( $p < 0.05$ ) were found between agitation speed and type of fat when the dielectric constant, loss factor and penetration depth were studied in fresh sauces (Fig. 3).

Fig. 3A shows that the dielectric constant ( $\epsilon'$ ) of all samples (except those made with butter) increased when the agitation speed increased from 350 to 1100 rpm. However, this increase was only significant ( $p < 0.05$ ) for samples elaborated with sunflower or olive oil. When the speed was increased to 3250 rpm,  $\epsilon'$  increased significantly ( $p < 0.05$ ) for sauces made with sunflower oil, whereas no significant differences ( $p > 0.05$ ) were observed for those formulated with olive and soy oil. Butter had a high  $\epsilon'$  even at low agitation speeds (350 rpm) and there were not significant differences ( $p > 0.05$ ) when speed was increased. The increase in  $\epsilon'$  as a result of the increase in the agitation speed could be related to the smaller particle size produced when agitation speed increases. Kaneko and Hirota (1985) found in water-in-oil emulsions that the  $\epsilon'$  of the emulsions containing small suspended particles was greater than in the case of those with larger particles. However, it is known that when the size of suspended particles is much smaller than the wavelength of microwaves, between 0.001 and 1 m (Decareau, 1985), the  $\epsilon'$  of the system depends only on the shape of the particles, not on their size (Ryynänen, 2002). Therefore, an increase in  $\epsilon'$  when increasing the agitation speed could be explained as a result of the increase in the fat globules circularity – as observed by Langton et al. (1999) in mayonnaises. This fact explains the higher  $\epsilon'$  obtained for sauces elaborated with soy oil and butter at speed of 350 rpm, whose globules are more circular than those for sunflower and olive oils (Fig. 2D).

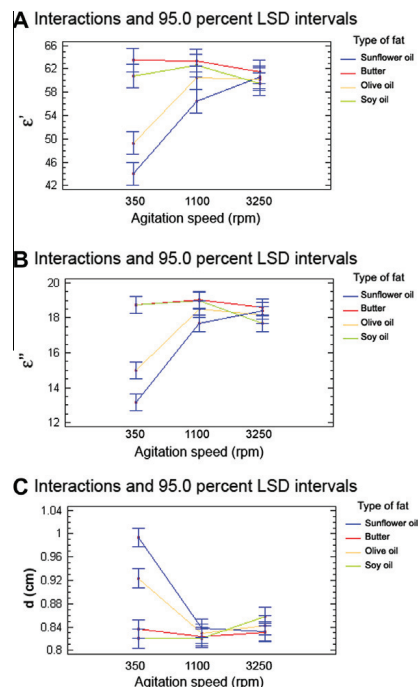
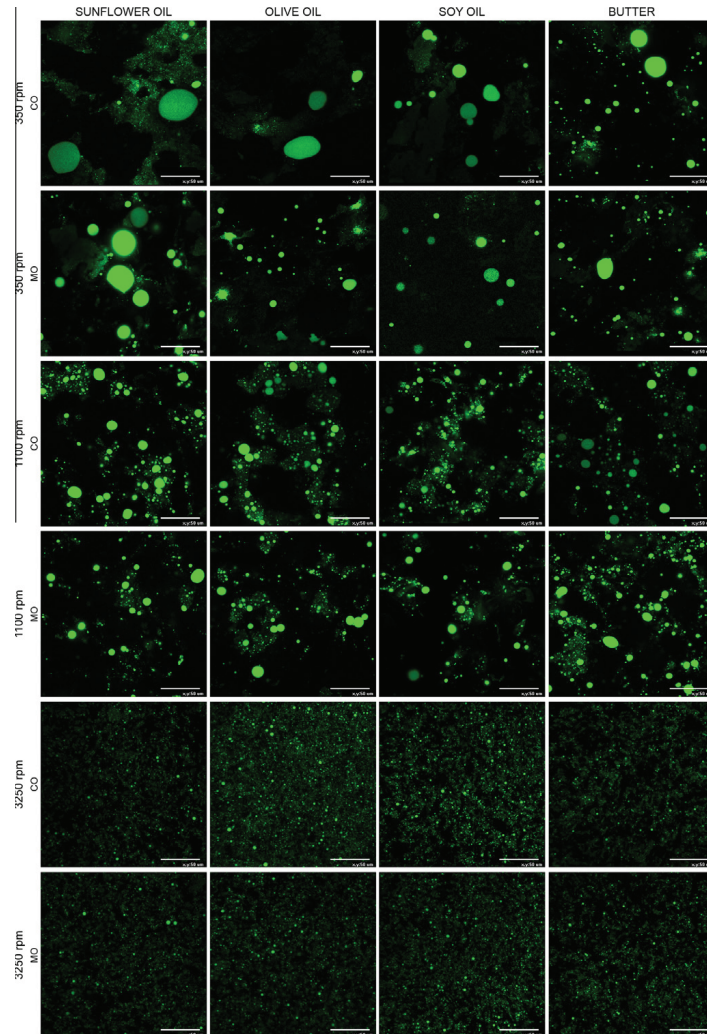


Fig. 3. Interaction plots with LSD intervals. A, B and C: interaction between agitation speed and type of fat for the dielectric constant ( $\epsilon'$ ), loss factor ( $\epsilon''$ ), and penetration depth ( $d$ ), respectively.

Fig. 3B shows that increasing the speed from 350 to 1100 rpm significantly ( $p < 0.05$ ) increased loss factor ( $\epsilon''$ ) for samples prepared with sunflower and olive oils. Moreover, increasing the agitation speed to 3250 rpm produced a significant ( $p < 0.05$ ) decrease in the  $\epsilon''$  for sauces elaborated with soy oil, while no changes were recorded for other fats studied. In the same way as with  $\epsilon'$  it can be seen that  $\epsilon''$  generally increased with speed. The explanation for this behaviour could be the same as for  $\epsilon'$  – namely, that  $\epsilon''$  increases as a result of the increase in the fat globules circularity produced by increased agitation speed. A high loss factor is important for microwave heating, and so it is appropriate to prepare the sauce with the type of fat and the agitation speed that produces a greater  $\epsilon''$ .

The penetration depth ( $d$ ) was determined from the dielectric constant and loss factor. Fig. 3C shows the influence on  $d$  when the agitation speed and the type of fat used in sauce were varied. A speed increase from 350 to 1100 rpm produced a significant ( $p < 0.05$ ) decrease in  $d$  for samples elaborated with sunflower or olive oil, while not affecting those prepared with soy oil or butter. An increase to 3250 rpm produced a significant increase ( $p < 0.05$ ) in  $d$  for samples made with soy oil, while no significant ( $p > 0.05$ ) increase was recorded for the others. Since  $d$  is inversely proportional to the dielectric constant and loss factor, it is logical that if these increase as the agitation speed increases then  $d$  will decrease.

It should be noted that the results were within the range found in the literature (Calay et al., 1995; Ryynänen, 2002) showing that



**Fig. 4.** Confocal laser scanning microscopy (CLSM). Samples thawed using conventional oven (CO) and microwave oven (MO), elaborated with sunflower oil, olive oil, soy oil, and butter at speeds of 350, 1100, and 3250 rpm. Magnification 60 $\times$ .

the most common food products have dielectric constants between 30 and 80; and loss factors of less than 25, which implies penetration depths of 0.8 and 1.5 cm.

### 3.2. Frozen–thawed samples

#### 3.2.1. Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

Fig. 4 shows the micrographs obtained by CLSM for samples thawed by conventional oven and microwave oven after a week

of freezing at  $-18^{\circ}\text{C}$ , when the type of fat and the agitation speed were modified.

As in the case of the freshly prepared samples (Fig. 1) it can be seen that as the agitation speed increased, the fat globules decreased in size and increased in circularity. As a result of this decrease in size, the fat globules density ( $f_d$ ) increased.

At a speed of 350 rpm, the area and the globules circularity differ depending on the type of fat used in sauce. These differences between different types of fat are not as noticeable at higher



speeds (1100–3250 rpm) because of the greater homogeneity shown by the samples when agitation speed increases – meaning that the globules are more similar in size and circularity.

No important differences in size,  $fd$  and circularity of the fat globules were detected when the samples thawed using a conventional oven and the microwave oven were compared.

### 3.2.2. Image analysis

In the same way as for freshly prepared samples, an image analysis was carried out to quantify the area, fat globules density ( $fd$ ) and circularity of the samples subjected to the freeze–thaw cycle. Significant interactions ( $p < 0.05$ ) were observed between agitation speed and type of fat when area,  $fd$  and circularity were studied in frozen–thawed samples (Fig. 5A, C and E). The thawing treatment did not show interactions with agitation speed and type of fat for any parameter; the mean plots with LSD intervals are shown in Fig. 5B, D and F.

Unlike what happened in the freshly prepared samples in which the fat globules area was only affected by the agitation speed (Fig. 2A), in this case, the globules area also depended on the type of fat used in the sauce formulation (Fig. 5A). As the agitation speed increased, the fat globules size decreased. However, this decrease was only significant ( $p < 0.05$ ) when olive oil was used to prepare the sauce. At 350 rpm, it was the olive oil samples that showed the largest fat globules ( $p_{80} = 1627.76 \mu\text{m}^2$ ) – as also occurred for the freshly prepared samples (Fig. 2B). Moreover, it is found that regardless of the type of fat used, at speeds of 1100–3250 rpm there were no significant differences ( $p > 0.05$ ) in the area.

Fig. 5B shows how the fat globules area varies according to the thawing treatment used. There were no significant differences ( $p > 0.05$ ) between the treatments used; although the samples thawed in a microwave oven had a smaller fat globules area –  $p_{80} = 155.99 \mu\text{m}^2$  – than those thawed in a conventional oven –  $p_{80} = 230.78 \mu\text{m}^2$ .

As for the variation in the fat globules density ( $fd$ ), Fig. 5C shows that (as occurred in the freshly prepared samples in Fig. 2C) the agitation speed caused a significant increase ( $p < 0.05$ ) in  $fd$  and this was dependent on the type of fat used. It can be seen that at 350 rpm the  $fd$  of all the fats was similar, while there were slight variations at 1100 and 3250 rpm. At 1100 rpm, the samples formulated with butter had the highest  $fd$  values; while at 3250 rpm the samples with the highest  $fd$  values were made using olive oil – and butter had the lowest values.

The variation in the fat globules density ( $fd$ ) for samples thawed in the conventional oven and the microwave oven is shown in Fig. 5D. It can be seen that the thawing treatment did not significantly affect ( $p > 0.05$ )  $fd$ .

Fig. 5E shows the variation in the fat globules circularity when the agitation speed and the type of fat used in the sauce were varied. It can be seen that the fat globules circularity was significantly affected ( $p < 0.05$ ) by the agitation speed and the type of fat – in the same way as the freshly prepared samples (Fig. 2D). An increase in speed from 350 to 1100 rpm produced an increase in circularity for all samples, but this increase was only significant ( $p < 0.05$ ) for sauces elaborated with sunflower and olive oils. At 3250 rpm there were no significant variations ( $p > 0.05$ ) in the globules circularity

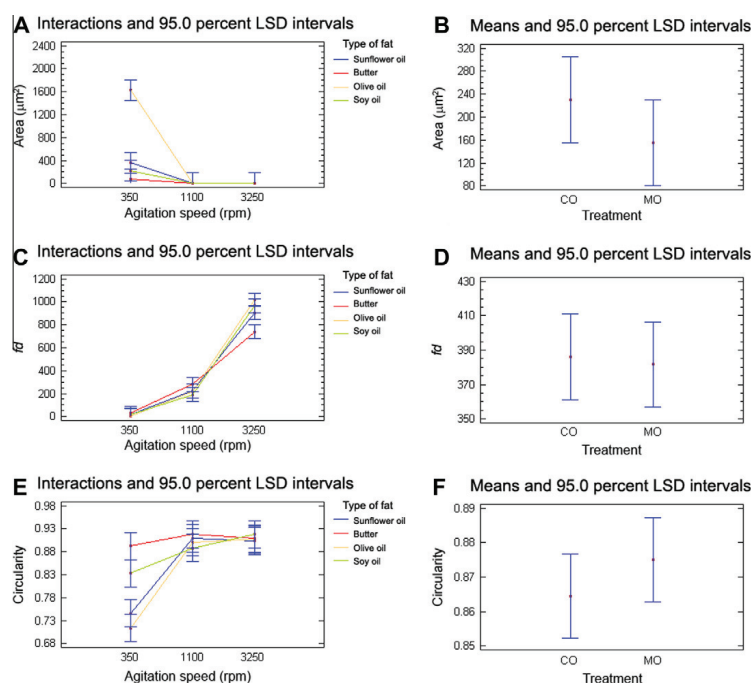


Fig. 5. Interaction and mean plots with LSD intervals. (A, C and E) interaction between agitation speed and type of fat for the area, fat globules density ( $fd$ ), and circularity, respectively. (B, D and F) mean values according to the thawing treatment for the area, fat globules density ( $fd$ ), and circularity, respectively.

– regardless of the type of fat used. Importantly, increased agitation speed decreased variability in the circularity of the samples elaborated with different types of fat – unlike that which occurred in the freshly prepared samples.

Finally, although the fat globules of the samples thawed in the microwave oven were slightly more circular than those thawed in the conventional oven (Fig. 5F), no significant differences ( $p > 0.05$ ) in the globules circularity was found depending on the thawing treatment used.

### 3.3. Comparison between the freshly prepared samples and the frozen-thawed samples

A statistical analysis was performed in order to quantify the changes in the fat globules caused by freezing and thawing. The response variables in this analysis were the difference in the area, fat globules density ( $fd$ ), and circularity between the freshly prepared samples and the frozen and thawed samples. The parameters obtained were  $dif\_area$ ,  $dif\_fd$  and  $dif\_circularity$ . Fig. 6 shows the interaction plots with LSD intervals for cases where there were significant interactions between the thawed and freshly prepared samples.  $dif\_circularity$  variable was not significant ( $p > 0.05$ ) and, therefore, the fat globules circularity was unchanged by the freeze–thaw cycle.

Fig. 6A shows the difference in the fat globules area ( $dif\_area$ ) between the samples after the freeze–thaw cycle and the freshly prepared samples – according to the agitation speed and the type of fat used. The figure shows that at speeds of 1100–3250 rpm the value was near to zero ( $dif\_area = 0$ ) regardless of the type of fat used in the sauce formulation. So there were no significant differences ( $p > 0.05$ ) in the thawed samples area in comparison with the freshly prepared samples; and therefore the sauces were stable in the freeze–thaw cycle when these agitation speeds were used. It is known that the smaller the fat globule, the more stable the emulsion (Rousseau, 2000) because there is a critical size above which a particle cannot be supported at the interface (Bobra, 1991). This fact could explain sauce stability at higher speeds due to the small fat globules. However, there are other theories (Vanapalli et al., 2002) which propose that in certain emulsions, small particle sizes can lead to a partial coalescence of the fat phase and cause the emulsion instability. At 350 rpm there were differences between the frozen–thawed samples and the fresh samples. These differences could be explained because the increased globule size would cause sauce instability. These differences depend on the type of fat used in the sauce preparation. In this respect, it is observed that when sunflower and soy oils were used, the globules area of the frozen–thawed samples did not vary significantly in comparison with the freshly prepared samples; whereas when olive oil and butter were used there was a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in globule size because of the freeze–thaw cycle. Similar results were obtained by Vanapalli et al. (2002) who verified that the oil type had an important effect on the stability of these emulsions during the freeze–thaw cycle. The fact that no coalescence was observed between the globules could be due to the low fat content of the prepared sauces (2.55% w/w). Guinee et al. (2000) demonstrated that as the fat content increased in the food products, clumping and coalescence of the fat globules became more pronounced.

Fig. 6B shows the variation in the fat globules area between the thawed samples and the freshly prepared samples according to the agitation speed and the thawing treatment used. The figure shows that at 1100 and 3250 rpm there were no significant differences ( $p > 0.05$ ) in the fat globules area between the frozen–thawed samples and the freshly prepared samples – regardless of the thawing treatment used. However, at 350 rpm there were significant differences ( $p < 0.05$ ) between thawed samples and freshly prepared

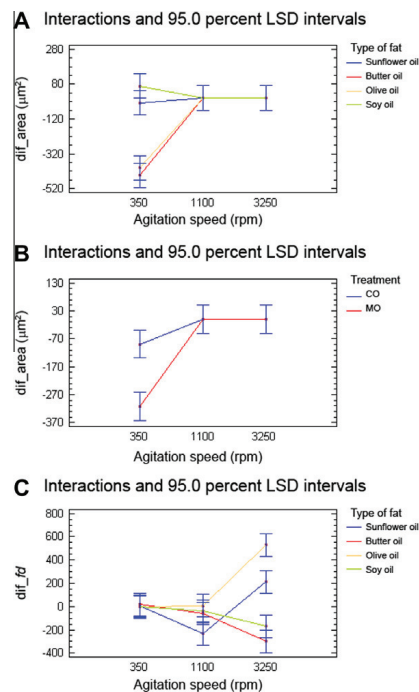


Fig. 6. Interaction plots with LSD intervals. (A) Interaction between agitation speed and type of fat for the  $dif\_area$ . (B) Interaction between agitation speed and thawing treatment for the  $dif\_area$ . (C) Interaction between agitation speed and type of fat for the  $dif\_fd$ .

samples. This difference was greater for microwave thawed samples where the area of the fat globules decreased more than those thawed in the conventional oven. Microwave heating is based on the transformation of alternating electromagnetic field energy into thermal energy (Vadivambal and Jayas, 2010). Heating is due to molecular friction of permanent dipoles within the material as they try to reorient themselves with the oscillating electrical field of the incident wave (Meda et al., 2005). The vibration that molecules undergo during microwave radiation could explain why the fat globules from microwave thawed samples are smaller. The vibration could cause the breakdown of fat globules into smaller globules and so result in a decrease in particle size.

Finally, Fig. 6C shows the variation in the fat globules density ( $fd$ ) between the treated samples and the freshly prepared samples according to the agitation speed and the type of fat. At 350 rpm no significant differences ( $p > 0.05$ ) in  $fd$  were seen between the frozen–thawed samples and the fresh samples – regardless of the type of fat. When the speed was increased to 1100 rpm, a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in the  $fd$  was observed when sunflower oil was used to prepare the sauce. At 3250 rpm, two different trends were observed in the variation of  $fd$  in the frozen–thawed samples in comparison with the fresh samples – regarding to the type of fat. Namely, there was a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in the  $fd$  in the soy oil and butter samples; while the sunflower and olive oil samples showed a significant increase ( $p < 0.05$ ) in  $fd$  after freezing–thawing cycle.

#### 4. Conclusions

In the freshly prepared samples, increasing the agitation speed from 350 to 1100 rpm significantly decreases ( $p < 0.05$ ) the fat globules area regardless of the type of fat used; moreover, the circularity significantly increases for the sunflower and olive oil samples. In relation to the dielectric properties, there is a significant increase in  $\epsilon'$  and  $\epsilon''$  for the sunflower and olive oil samples when the agitation speed is increased from 350 to 1100 rpm. This fact would be related to decreased globular size and increased circularity as the agitation speed increases – thereby leading to a more homogeneous sauce. The maximum values of  $\epsilon'$  and  $\epsilon''$  are obtained at 1100 rpm for butter and soy oil. The appropriate dielectric properties of soy oil that would facilitate microwave heating – along with its nutritional benefits – makes soy oil an ideal choice for sauces in ready-to-eat food products.

Thawing treatments (conventional oven and microwave oven) do not significantly affect ( $p > 0.05$ ) the fat globules size and shape – regardless of the agitation speed and the type of fat. So, microwave thawing could be preferable compared to conventional thawing because of the energy savings, speed and convenience.

Sauces stability during the freeze–thaw cycle is achieved by high agitation speeds (1100 and 3250 rpm); 1100 rpm could be most advisable to prepare the sauces because generating this agitation speed consumes less energy than higher speeds.

#### Acknowledgements

The authors are grateful for the economic support (project AGL2006-11653-C02) received from the Spanish Ministry of Science and Innovation.

#### References

- Arocas, A., Sanz, T., Fiszman, S.M., 2009. Improving effect of xanthan and locust bean gums on the freeze–thaw stability of white sauces made with different native starches. *Food Hydrocolloids* 23 (8), 2478–2484.
- Bengtsson, N.E., Risman, P.O., 1971. Dielectric properties of food at 3 GHz as determined by a cavity perturbation technique. II. Measurements on food materials. *Journal of Microwave Power* 6, 107–123.
- Blonk, J.C.G., Vanaalst, H., 1993. Confocal scanning light microscopy in food research. *Food Research International* 26 (4), 297–311.
- Bobra, M., 1991. Water-in-oil emulsification: a physicochemical study. In: *Proceedings of 1991 International oil spill conference*. American Petroleum Institute, Washington DC.
- Brown, C.R.T., Foster, T.J., Norton, I.T., Underdown, J., 1995. Influence of shear on the microstructure of mixed biopolymer systems. In: Harding, S.E., Hill, J.E., Mitchell, J.R. (Eds.), *Biopolymer Mixtures*. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 65–83.
- Calay, R.K., Newborough, M., Probert, D., Calay, P.S., 1995. Predictive equations for the dielectric properties of foods. *International Journal of Food Science and Technology* 29, 699–713.
- Datta, A.K., Anantheswaran, R.C., 2001. *Handbook of Microwave Technology for Food Applications*. Marcel Dekker, New York.
- Decareau, R.V., 1985. *Microwaves in the Food Processing Industry*. Academic Press Inc. Ltd., London.
- Ferrando, M., Spiess, W.E.L., 2000. Review: confocal scanning laser microscopy. A powerful tool in food science. *Food Science and Technology International* 6 (4), 267–284.
- Guardaño, L.M., Catalá-Civera, J.M., Plaza-González, P., Sanz, T., Salvador, A., Fiszman, S.M., 2010. Dielectric, microstructural and flow properties of sauce model systems based on starch, gums and salt. *Journal of Food Engineering* 98, 34–43.
- Guinee, T.P., Auty, M.A.E., Fenelon, M.A., 2000. The effect of fat content on the rheology, microstructure and heat-induced functional characteristics of Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 10 (4), 277–288.
- Kaneko, H., Hirota, S., 1985. Effects of particle size and stabilizing agents upon dielectric properties of water-in-oil type emulsions. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 33 (12), 5484–5494.
- Langton, M., Jordansson, E., Altskär, A., Sorensen, C., Hermansson, A.M., 1999. Microstructure and image analysis of mayonnaises. *Food Hydrocolloids* 13 (2), 113–125.
- Meda, V., Orsat, V., Raghavan, G.S.V., 2005. Microwave heating and dielectric properties of foods. In: Schuder, H., Reigerm, M. (Eds.), *The Microwave Processing of Foods*. CRC Press, Woodhead Publishing, Ltd., Cambridge, pp. 61–75.
- Miller, L.A., Gordon, J., Davis, E.A., 1991. Dielectric and thermal transition properties of chemically modified starches during heating. *Cereal Chemistry* 68 (5), 441–448.
- Moschakis, T., Murray, B.S., Dickinson, E., 2005. Microstructural evolution of viscoelastic emulsions stabilised by sodium caseinate and xanthan gum. *Journal of Colloid and Interface Science* 284 (2), 714–728.
- Moschakis, T., Murray, B.S., Billaderis, C.G., 2010. Modifications in stability and structure of whey protein-coated o/w emulsions by interacting chitosan and gum arabic mixed dispersions. *Food Hydrocolloids* 24, 8–17.
- Mudgett, R.E., 1995. Electrical properties of foods. In: Rao, M.A., Rizvi, S.S.H. (Eds.), *Engineering Properties of Foods*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 389–455.
- Piyasena, P., Ramaswamy, H.S., Awuah, G.B., Defelice, C., 2003. Dielectric properties of starch solutions as influenced by temperature, concentration, frequency and salt. *Journal of Food Process Engineering* 26, 93–119.
- Prakash, A., Nelson, S.O., Mangino, M.E., Hansen, P.M.T., 1992. Variation of microwave dielectric properties of hydrocolloids with moisture content, temperature and stoichiometric charge. *Food Hydrocolloids* 6 (3), 315–322.
- Rousseau, D., 2000. Fat crystals and emulsion stability: a review. *Food Research International* 33, 3–14.
- Ryynänen, S. (2002). *Microwave heating uniformity of multicomponent prepared foods*. Academic Dissertation, University of Helsinki.
- Thanasakarn, P., Pongsawatmanit, R., McClements, D., 2004. Influence of emulsifier type on freeze–thaw stability of hydrogenated palm oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids* 18 (6), 1033–1043.
- Vadivambal, R., Jayas, D.S., 2010. Non-uniform temperature distribution during microwave heating of food materials – A review. *Food and Bioprocess Technology* 3, 161–171.
- Vanapalli, S.A., Palanuwech, J., Coupland, J.N., 2002. Stability of emulsions to dispersed phase crystallization: effect of oil type, dispersed phase volume fraction and cooling rate. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 204, 227–237.
- Van Dalen, G., 2002. Determination of the water droplet size distribution of fat spreads using confocal scanning laser microscopy. *Journal of Microscopy* 208 (2), 116–133.
- Van Lent, K., Vanlerberghe, B., Van Oostveldt, P., Thas, O., Van der Meer, P., 2008. Determination of water droplet size distribution in butter: pulsed field gradient NMR in comparison with confocal scanning laser microscopy. *International Dairy Journal* 18, 12–22.
- Vodovotz, Y., Vittadini, E., Coupland, J., McClements, D.J., Chinachoti, P., 1996. Bridging the gap: use of confocal microscopy in food research. *Food Technology* 50 (6), 74–82.



