



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**“EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDO SOBRE LAS
PROPIEDADES SUPERFICIALES DE UN EXOPOLISACÁRIDO
OBTENIDO DE KEFIRANOS”**

TESIS

**PARA OBTENER EL DIPLOMADO
ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**LIC. JULIA DE LOS SANTOS TRINIDAD
MATRÍCULA: 2191800014**

DIRECTORA

DRA. ANGÉLICA ROMÁN GUERRERO

CODIRECTOR

DR. SERGIO ANDRÉS ALATORRE SANTAMARÍA

LECTOR

DR. FRANCISCO CRUZ SOSA

IZTAPALAPA, CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2020

ÍNDICE GENERAL

1	Introducción.....	6
2	Antecedentes.....	8
2.1	<i>Kéfir y kefiran</i>	8
2.2	<i>Producción de kéfir</i>	9
2.3	<i>Exopolisácaridos (EPS) del kéfir y aplicaciones</i>	10
2.4	<i>Propiedades funcionales relacionadas con la actividad superficial de EPS</i>	12
2.5	<i>Ultrasonido</i>	13
2.6	<i>Emulsiones</i>	14
3	Justificación.....	16
4	Hipótesis.....	17
5	Objetivo general.....	17
5.1	Objetivos particulares.....	17
6	Metodología.....	17
6.1	<i>Preparación de kéfir y condiciones de cultivo</i>	19
6.2	<i>Purificación del EPS</i>	19
6.3	<i>Caracterización fisicoquímica del EPS</i>	19
6.3.1	Determinación del contenido de azúcares.....	19

6.3.2	Determinación del contenido de proteína.....	19
6.3.3	Determinación del contenido de humedad	20
6.3.4	Determinación del contenido de cenizas	20
6.4	<i>Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)</i>	20
6.5	<i>Determinación del Peso Molecular (PM)</i>	20
6.5.1	PM por Dispersión de Luz Dinámica (DLS)	20
6.5.2	PM por Cromatografía de Permeación en Gel (GPC)	21
6.6	<i>Evaluación de las propiedades térmicas</i>	21
6.7	<i>Evaluación de la actividad superficial</i>	21
6.7.1	Solubilidad de los EPS.....	21
6.7.2	Potencial zeta (ζ)	21
6.7.3	Tensión interfacial dinámica.....	21
6.8	<i>Formación de emulsiones O/W</i>	22
6.9	<i>Caracterización y evaluación de la estabilidad de las emulsiones</i>	22
6.9.1	Morfología y distribución tamaño gota.....	22
6.9.2	Comportamiento reológico de flujo.....	23
6.9.3	Cinética de coalescencia.....	23
6.9.4	Estabilidad contra el cremado.....	23

6.10	<i>Inducción de cambios estructurales por la aplicación de US</i>	24
6.11	<i>Caracterización del EPS tratado con US</i>	25
7	Resultados.....	25
7.1	<i>Caracterización fisicoquímica de EPS</i>	25
7.2	<i>Espectroscopia FT-IR</i>	26
7.3	<i>Peso Molecular</i>	28
7.4	<i>Propiedades térmicas</i>	31
7.5	<i>Potencial Zeta</i>	33
7.6	<i>Tensión interfacial dinámica</i>	35
7.7	<i>Formación y caracterización de emulsiones O/W estabilizadas con EPS</i>	38
7.8	<i>Estabilidad de las emulsiones O/W</i>	44
7.8.1	<i>Cinética de coalescencia</i>	45
7.8.2	<i>Estabilidad contra el cremado</i>	45
7.8.3	<i>Comportamiento reológico</i>	47
8	Conclusiones.....	48
9	Bibliografía.....	48
10	Anexos	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del kefirán propuesta por Micheli et al., (1999).....	11
Figura 2. Principales mecanismos de inestabilidad presentes en emulsiones.....	16
Figura 3. Perfil de FT-IR del EPS S/TRATAR.	27
Figura 4. Espectros de infrarrojo para dispersiones del EPS S/TRATAR y las tratadas: a) EPS (1%-20 y 15MIN-80A), b) EPS (1%-20 y 15MIN-50A), c) EPS (3%-20 y 15MIN-80A) y d) EPS (3%-20 y 15MIN-50A).....	28
Figura 5. Gráfico de Debye para el EPS obtenido de kefirán.....	30
Figura 6. Termograma obtenido por DSC para el EPS S/TRATAR.	31
Figura 7. Termogramas de DSC para el EPS tratado con US y su comparación con el EPS S/TRATAR.	32
Figura 8. Perfiles de Potencial Zeta del EPS tratado con US y sin tratar.	34
Figura 9. Perfiles de tensión interfacial del EPS S/TRATAR comparadas con los EPS tratados con US (EPS 1%)	36
Figura 10. Perfiles de tensión interfacial del EPS S/TRATAR con los EPS tratados con US (EPS 3%)	37
Figura 11. Morfología, PSD, D43 de las emulsiones O/W estabilizadas con EPS S/TRATAR y tratado con US (EPS 1%)	41
Figura 12. Morfología, PSD, D43 de las emulsiones O/W estabilizadas con EPS S/TRATAR y tratado con US (EPS 3%).	43
Figura 13. Evaluación de estabilidad de las emulsiones de EPS: a) EPS (1%-20 y 15MIN- 80 y 50A), b) EPS (3%-20 y 15MIN- 80 y 50A).....	44
Figura 14. Perfiles de transmisión de luz para la estimación de la velocidad de cremado de las emulsiones estabilizadas con EPS S/TRATAR y las tratadas: a) EPS (1%-20 y 15MIN-80 y 50A), b) EPS (3%-20 y 15MIN-80 y 50A).....	46

Figura 15. Curvas de flujo para emulsiones O/W estabilizadas con EPS S/TRATAR y las tratadas: a) EPS (1%-20 y 15MIN-80 y 50A), b) EPS (3%-20 y 15MIN-80 y 50A).	47
---	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Codificación de tratamientos de US aplicados al EPS.....	25
Tabla 2. Caracterización fisicoquímica del EPS	26
Tabla 3. Fraccionamiento y PM del EPS de kefirán por GPC.....	30
Tabla 4. Propiedades térmicas del EPS S/TRATAR y tratado con US.	33
Tabla 5. Constantes cinéticas para la coalescencia de las emulsiones formadas con EPS.	45
Tabla 6. Valores de las constantes cinéticas de estabilidad contra el cremado de las emulsiones estabilizadas con EPS (sin tratamientos y las tratadas).	46

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDO SOBRE LAS PROPIEDADES SUPERFICIALES DE UN EXOPOLISACÁRIDO OBTENIDO DE KEFIRANOS

1 Introducción

En los últimos tiempos, la sociedad ha ido modificando considerablemente sus patrones alimenticios, mostrando mayor demanda por consumir productos alimenticios, que además de su valor nutricional, también ofrezcan beneficios para la salud. En este contexto de transformación de la industria alimentaria, los productos más demandados para la sociedad han sido mejorados considerablemente, por ejemplo, los yogures y otras leches fermentadas, constituyen los principales vehículos de todas las propiedades funcionales que se obtienen de las bacterias inoculadas, además de ser uno de los alimentos que tienen una gran aceptación en los distintos grupos de la población (Sanz, et al., 2003).

En el caso del consumo de leche fermentada, ésta ha sido asociada con efectos beneficiosos para la salud, como la prevención de enfermedades intestinales y el fortalecimiento del sistema inmunológico. En la gran variedad de lácteos fermentados que actualmente existen en el mercado, en las que intervienen un gran número de especies de bacterias lácticas y algunas levaduras (Guzel, et al., 2011). Entre estas leches fermentadas se encuentra el kéfir que es una bebida a base de leche, producida por la acción de bacterias ácido lácticas (BAL), levaduras y bacterias ácido acéticas (BAA) en la leche, la cual es sometida tanto a fermentación láctica como alcohólica, lo que la convierte en un producto muy particular con propiedades únicas (Egan, et al., 1993). Estas BAL tienen la capacidad de desviar una pequeña proporción de azúcares fermentables hacia la biosíntesis de exopolisacáridos (EPS), las cuales desempeñan un papel industrial en la producción de derivados lácteos fermentados, además, los EPS han sido utilizados extensivamente como geles, emulsificantes y suspensiones de estabilización (Laws, et al., 2001).

Los EPS son moléculas sintetizadas por las BAL, las cuales tienen un papel muy importante en la elaboración de productos lácteos fermentados como el yogurt, yogurt bebible, queso, crema agría, y diversos postres lácteos. La producción de los EPS por las BAL es muy variada en términos de cantidad, composición química, peso molecular, carga, estructura lineal o ramificada, así como la flexibilidad de las moléculas. Esta variabilidad estructural está relacionada con las propiedades funcionales que dichos EPS exhiben en los productos lácteos, donde destaca su efecto como agente de textura y de firmeza, donde dichas actividades se deben a la capacidad de estos materiales para incrementar la viscosidad del

fluido, a la capacidad de unión con moléculas de agua y a la interacción que se presenta con otras moléculas como las proteínas y estructuras micelares que permiten incrementar la rigidez de la red de caseínas en la leche (Duboc y Mollet, 2001).

El kéfir es una bebida láctea fermentada autocarbonatada y ligeramente alcohólica originaria del Este de Europa (Tamime, 2006), y puede contener alrededor del 1% de ácido láctico y de 0.1 – 1.0% de etanol, dependiendo de la fermentación por levaduras. La producción artesanal del kéfir se basa en la tradición de la gente del Cáucaso, la cual se ha extendido a otras partes del mundo desde el siglo XIX, y hoy en día integra sus indicaciones tanto nutricionales como terapéuticas en ciertos alimentos seleccionados para la alimentación de diversas poblaciones (Prado et al., 2015; Leite et al., 2013). En este sentido, la leche es inoculada con granos de kefir (1-10 mm de diámetro) que contienen bacterias ácido lácticas homofermentativas y heterofermentativas, levaduras y bacterias ácido acéticas.

El kéfir es un producto biotecnológico en sí, puesto que puede actuar como matriz para la liberación efectiva de microorganismos probióticos en diferentes tipos de productos. Además de los microorganismos vivos que contiene la bebida de kéfir, los exopolisacáridos (EPS) presentes en él, conocidos como “kefirán”, tienen actividad biológica y ciertamente añaden valor a los productos (Prado et al., 2015). Los EPSs tienen propiedades físico-químicas y reológicas que los hacen adecuados como aditivos, pudiendo ser usados como estabilizantes, emulsionantes, agentes gelificantes y mejoradores de la viscosidad. Asimismo, los EPSs poseen propiedades biológicas que sugieren su uso como antioxidantes, agentes antitumorales, agentes antimicrobianos e inmunomoduladores, entre otros papeles (Suresh Kumar et al., 2008; Bensmira et al., 2010; Piermaria et al., 2010).

Todos los nuevos conocimientos en cuanto al mejoramiento de los productos alimenticios, también dependen en gran medida de diversos factores; principalmente, la aceptabilidad de tales procesos depende en gran medida de la calidad sensorial y de las propiedades funcionales, basándose en el método aplicado, por ello, es fundamental realizar diversas pruebas para poder caracterizar el producto final de la investigación.

2 Antecedentes

2.1 Kéfir y kefiran

La palabra kéfir deriva de la palabra turca *keyif*, que significa “sentirse bien” después de su ingestión (Lopitz-Otsoa et al., 2006; Tamime, 2006). La bebida de kéfir, originaria de las montañas del Cáucaso, es hoy en día un producto tradicional enormemente consumido en Europa del este, Rusia y el suroeste asiático. A pesar de que el consumo de kéfir no es tan popular en el mundo como el de otros productos lácteos como el yogurt o el queso, esta bebida, de sabor ligeramente ácido debido a la formación de compuestos orgánicos derivados de la fermentación (ácidos láctico, acético, pirúvico, hipúrico, butírico, y propiónico; diacetilo y acetaldehído) que son responsables del sabor y olor característicos, y de consistencia cremosa, ha comenzado a llamar la atención de debido a que se le han atribuido diversos beneficios a la salud (Arslan, 2014; Farnworth, 2005; Otlés y Cagindi, 2003; Tamime, 2006). En otros países como España, el conocimiento de esta bebida, así como los beneficios de incluir alimentos probióticos en una dieta regular, no están muy extendidos, y la producción de kéfir es casi exclusivamente artesanal (Leite et al., 2013).

El kéfir es una mezcla de microorganismos simbióticos que producen gránulos gelatinosos que crecen, estos contienen bacterias ácido lácticas (BAL) como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Acetobacter* y *Streptococcus* spp., y levaduras como *Kluyveromyces*, *Torula*, *Candida* y *Saccharomyces* spp.). La composición de este consorcio microbiano depende de las características del tipo de leche empleada como sustrato y de las condiciones de manejo para la producción de alimentos lácteos fermentados. Dichos microorganismos se encuentran rodeados por una matriz polisacárido llamada kefirán, un glucogalactano ramificado hidrosoluble (De Antoni, 2005), de textura gomosa y en ocasiones filamentosa, que ayuda a la aglomeración de estos microorganismos, permitiendo así formar los gránulos de kéfir, al cual se le han atribuido distintas actividades antibacteriales, antimicóticas y antitumorales (Micheli et al., 1999; Rodrigues et al., 2005) y de esta forma llevar a cabo el proceso de fermentación de la leche (Parra et al., 2010).

Los gránulos de kéfir pueden definirse como masas gelatinosas de forma irregular, con diámetros que varían de 1 a 6 mm y generalmente de color blanco a beige, que se asemejan a los floretes de la coliflor. Estos gránulos están compuestos de una matriz polisacárida de glucosa y galactosa, llamada kefirán, en la cual coexiste la compleja microbiota en una relación simbiótica (Montauci et al., 2012).

Dicho EPS puede incrementar la viscosidad, retención de agua e interacción con otros componentes de la leche, resultando en un incremento en la rigidez de la matriz de caseína del producto final, y en consecuencia menor sinéresis. Aunque pareciera que los gránulos de kéfir son la única fuente de kefirán, se desconoce si más de un polisacárido o diversos isómeros de kefirán existen en los gránulos de kéfir o en la bebida de kéfir. Algunos estudios afirman que los gránulos de kéfir pueden contener hasta 34% de EPS, mientras que la bebida final contiene 0.2 a 0.7% de EPS, y a pesar de que las bacterias que producen el kefirán, han sido objeto de investigación, en la actualidad no se ha definido cuántos tipos de bacterias sintetizan el kefirán o EPS similares al kefirán (Farnworth, 2005).

2.2 Producción de kéfir

El kéfir generalmente es producido por tres tipos de tecnologías: método artesanal, el método Ruso y el procesamiento comercial. Cabe mencionar que, en este último, la manufactura del kéfir utilizando gránulos como cultivo iniciador resulta muy difícil, debido a la complejidad de la composición microbiológica, la cual depende del origen de los gránulos y las condiciones de almacenamiento y manejo (Boulder, 1993; Garcia-Fontan et al., 2006).

Método tradicional. La producción artesanal tradicional de kéfir consiste en la inoculación de leche con una cantidad de gránulos de kéfir (2 a 10%), fermentando la leche durante 24 h aproximadamente, a un pH predeterminado o hasta obtener un sabor y/o textura deseada. La temperatura de la fermentación se es entre 20°C y 25°C, mientras que, en la etapa de maduración, la temperatura va de 8 °C a 10°C durante 15 a 20 h. Posteriormente los gránulos de kéfir se tamizan y se reutilizan para una nueva fermentación o bien para su conservación en leche fresca hasta por 7 días (Farnworth, 2003).

Método Ruso. Este método generalmente se utiliza un inóculo sin gránulo, el cual se logra al tamizar el producto fermentado y utilizando el percolador para inocular la leche. Además, alrededor del 1 al 3% del cultivo madre se añade previo a la pasteurización de la leche. Algunas variantes de este proceso incluyen el uso de cultivos iniciadores liofilizados. En este caso, las condiciones de fermentación (19-28 °C) favorecen la reducción del pH y el aumento de la viscosidad en el kéfir producido, con cambios mínimos en los contenidos de CO₂ y etanol, mientras que temperaturas entre los 8 y 10°C durante la etapa de maduración permiten que se desarrolle el sabor y aroma (Farnworth, 2003; De Oliveira Leite et al., 2013).

Procesamiento comercial. Respecto a la producción industrial o a gran escala, ésta se ha visto obstaculizada por problemas relacionados con la reproducción de los gránulos de kéfir y la producción de un producto consistente, debido a la complejidad que existe en su composición microbiológica, la cual como ya se ha mencionado, depende del origen de los gránulos y las condiciones de manejo y

almacenamiento. Inicialmente, se utilizó el método conjunto; en este procedimiento, la leche inoculada se introduce en botellas, fermentándose a una temperatura controlada a 54 °C hasta formar un coágulo fuerte, para después ser enfriada. Sin embargo, el kéfir producido era de baja calidad en comparación con el obtenido en menor escala con métodos tradicionales (Farnworth, 2003). En la actualidad, el kéfir se produce por un método de agitación, en el que la fermentación, la formación de coágulos, la agitación, la maduración y refrigeración, ocurre en un mismo recipiente. La composición, características químicas, organolépticas, y microbiológicas del producto final dependen del tipo de leche utilizada, la fuente de los gránulos, la preparación del cultivo lácteo (a menudo producido por trozos grandes tamizados y usando el percolador), la duración de la fermentación, la inclusión de una etapa de enfriamiento, y la inclusión de una etapa de maduración (Farnworth, 2005). Una diferencia importante en este tratamiento es que se incluye la opción de utilizar cualquiera de los gránulos de kéfir o un extracto de gránulo libre de kéfir como cultivo lácteo.

2.3 Exopolisacáridos (EPS) del kéfir y aplicaciones

Debido a que las BAL son reconocidas como “seguros” (GRAS, por sus siglas en inglés), estos microorganismos son candidatos idóneos para la producción de EPS funcionales. Las BAL son caracterizadas por su conversión de una gran proporción de su fuente de carbono, azúcares fermentables, a la producción de ácido láctico, y son capaces de desviar una pequeña proporción de azúcares fermentables hacia la biosíntesis de EPS (Rodríguez, 2002).

En este sentido, el kefirán, un polisacárido extracelular producido por los microorganismos presentes en los gránulos de kéfir, especialmente por BAL, es un biopolímero comestible, hidrosoluble y con estructura ramificada de glucogalactanos, con cantidades equivalentes de D-glucosa y D-galactosa en la secuencia de sus cadenas (Laws et al., 2001). El análisis de la estructura química del kefirán ha demostrado que es un hexa o hepta-sacárido, compuesto de una unidad regular tipo pentasacárido, la cual tiene uno o dos residuos de azúcares unidos de forma aleatoria (Moradi y Kalanpour, 2019); además se ha establecido que la cadena principal está compuesta de (1 → 6)-Glc, (1 → 3)-Gal, (1 → 4)- Gal, (1 → 4)- Glc y (1 → 2, 6)- Gal, ramificada a residuos O-2 de Gal y Glc situados al final de la estructura, como se muestra en la Figura 1 (Ahmed et al., 2013; Ghasemlou et al., 2012). Estas características estructurales hacen que no sea hidrolizable por las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal, pero sí permiten que sea fermentado por las bacterias colónicas, como lo describe Serafini et al., (2014).

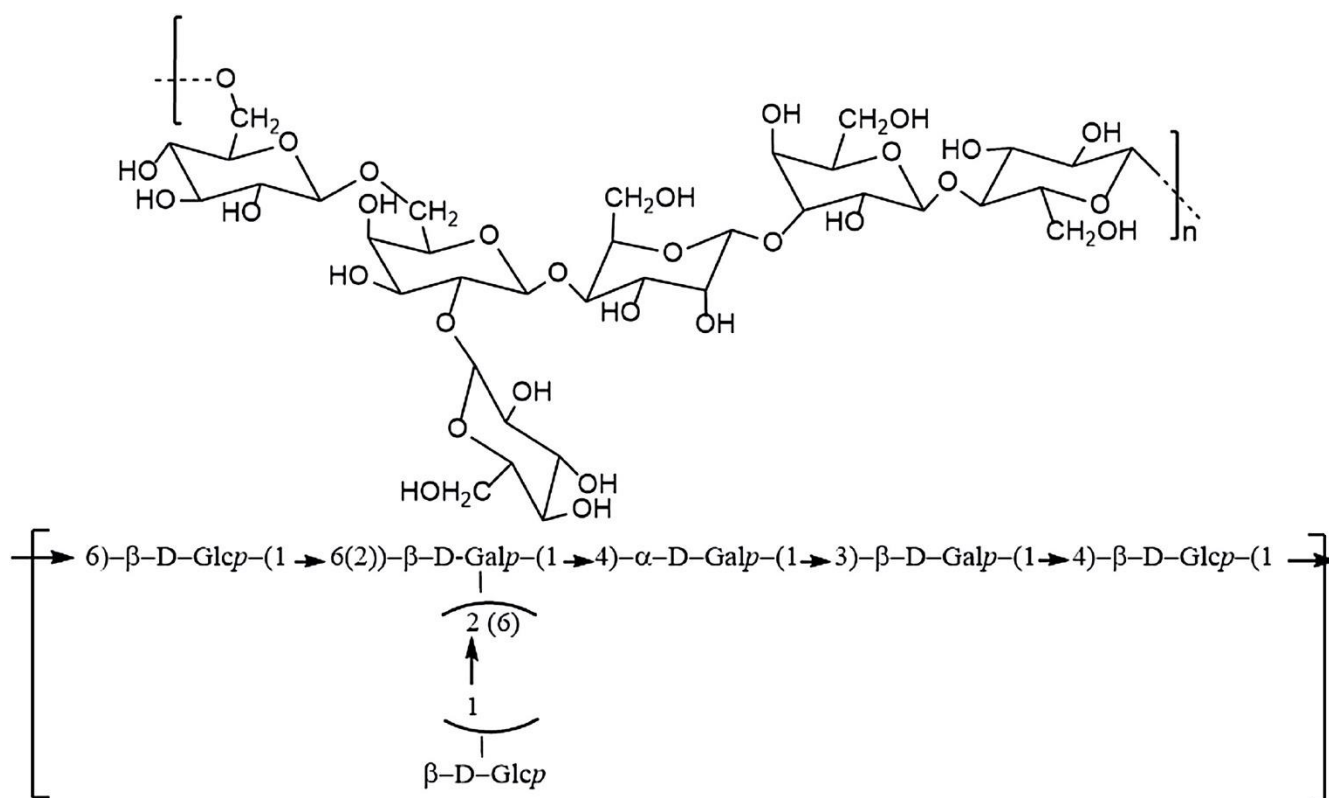


Figura 1. Estructura química del kefirán propuesta por Micheli et al., (1999).

Es por esto, que el EPS del kéfir ha atraído la atención de científicos y tecnólogos de los alimentos debido a sus características únicas, relacionadas su comportamiento reológico (Rimada y Abraham, 2006), biodegradabilidad (Ghasemlou et al., 2011), biocompatibilidad (Shahabi-Ghahfarrokhi et al., 2015), seguridad (Piermaría et al., 2016), efecto emulsionante y estabilizante (Zhang et al., 2011; Botelho et al., 2014), resistencia contra la hidrólisis (Micheli et al., 1999), y propiedades de barrera, mecánicas y de permeabilidad de agua (Ghasemlou et al., 2011). En este sentido, la producción *in situ* de los EPS en fermentados lácteos como el yogurt, ha resultado en una alternativa potencial para reducir o evitar la adición de agentes estabilizantes como la gelatina o caseína, o algunos hidrocoloides modificados como los almidones, pectina y goma guar.

Además, el biopolímero de kefirán ha mostrado actividades biológicas como la actividad antimicrobiana, cicatrizante (Rodrigues et al., 2005), antibacteriana, antitumoral, antiinflamatoria, antioxidante y biocida, además de su actividad en la modulación del sistema inmune del intestino, la reducción en la hipertensión inducida por hipertensión arterial, protección de células epiteliales contra toxinas microbianas (Blandón et al., 2018) y actividad hipotensiva (Maeda et al., 2004).

Además, el avance en nanotecnología y el descubrimiento de nuevos nanomateriales, ha conducido al desarrollo de biomateriales con fines nanotecnológicos, por lo que algunos autores han reportado el uso de nanocompositos de kefirán y nanofibras para ser usados efectivamente en varios campos científicos (Naghizadeh y Adabi, 2014; Sreenivasan et al., 2010; Moradi y Kalanpour, 2019).

2.4 Propiedades funcionales relacionadas con la actividad superficial de EPS

El biopolímero del kefirán ha destacado tecnológicamente en la industria alimentaria como un aditivo, debido a que es capaz de formar geles a bajas temperaturas y con ello coadyuvar en las propiedades tecnosensoriales de los productos alimentarios (Zavala et al., 2015), a la actividad antimicrobiana que lo ha colocado como un potencial agente conservador de alimentos, además de que es posible utilizarlo como material para la fabricación de recubrimientos y películas comestibles con propiedades mecánicas y de barrera adecuadas para mejorar el tiempo de vida de anaquel, mejorar la calidad de los alimentos así como propiedades fisicoquímicas satisfactorias (Piermaria et al., 2009; Zolfi et al., 2015; Moradi y Kalanpour, 2019).

Algunos estudios han mostrado que las propiedades de flujo del kefirán cuando se utiliza como un agente espesante, han mostrado que a altas velocidades de corte, este biopolímero se comporta como un fluido tipo Newtoniano, y que después de ser sometido a procesos de congelación, la textura del biopolímero en solución no se modifica (Exarhopoulos et al., 2018), y que además mejora las propiedades reológicas en masas de panificación (Soleimani Fard et al., 2017).

Wang et al. (2008), reportaron que el EPS obtenido de un cultivo de *L. kefiranofaciens* ZW3 mostró actividad emulsionante semejante a la que exhibieron algunos polisacáridos como la goma xantana, guar y algarrobo. Prasanna et al. (2012) reportaron que los EPS obtenidos de cultivos de las BAL *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CCUG 52486 y *Bifidobacterium infantis* NCIMB 702205, estabilizaron emulsiones tipo aceite-en-agua empleando diferentes aceites comestibles por mayor tiempo que aquella obtenida con goma de xantana.

Cabe mencionar, que los trabajos reportados en la literatura en los cuáles se evalúa el potencial de los EPS de kefirán como moléculas con actividad superficial son pocos, ya que la mayoría se centra en establecer las condiciones de producción y purificación de los EPS, y una cantidad menor evalúa las propiedades reológicas del EPS en dispersión. Por lo que resulta importante realizar la caracterización de la actividad superficial de estas biomoléculas, ya que, aunque algunos autores la clasifican como “moderada”, otros autores han reportado que la inducción de modificaciones estructurales en este tipo de

macromoléculas por medio de la aplicación de cambios de temperatura, pH, fuerza iónica o bien el uso de microondas, ultrasonido, altas presiones, etc., puede potenciar y mejorar sus propiedades funcionales.

2.5 Ultrasonido

El ultrasonido (US) representa una tecnología novedosa, con aplicaciones promisorias en las áreas de procesamiento y conservación de alimentos; sin embargo, su uso extensivo en el procesamiento comercial no ha sido promovido debido a algunas restricciones en el escalamiento (Badui, 2006).

El US ha sido utilizado bajo condiciones de baja intensidad y frecuencia alta, con la finalidad de analizar la estructura y composición de los alimentos; mientras que a altas intensidades y frecuencias bajas su aplicación se ha centrado en la modificación estructural de los ingredientes. En la industria de alimentos, el US ha demostrado ser efectivo para el procesamiento y la preservación de los alimentos, donde su empleo simultáneo con o sin calor, se ha aprovechado para desnaturalizar enzimas, facilitar la extracción de compuestos bioactivos de plantas y semillas, promover el ablandamiento de carne y homogeneizar o dispersar sistemas bifásicos tales como emulsiones o suspensiones (Murillo et al., 2011). En este sentido, el US es considerado como un tratamiento más conveniente, sencillo y seguro, que el resto de tecnologías que involucran la radiación de los alimentos.

Desde el punto de vista de su uso para modificar la estructura de los componentes de los alimentos, el US permite modificar parcial o totalmente la estructura de diversas macromoléculas, como proteínas, y polisacáridos como el almidón, quitosano, dextrán y carragenina, entre otros (Iida et al., 2008; Liu et al., 2006; Lorimer et al., 1995; Lii et al., 1999).

La modificación estructural por US inducida en los biopolímeros es debida principalmente a la cavitación acústica, la cual implica la rápida expansión y contracción de nano/micro burbujas de gas en un líquido sometido a US; esto genera cambios rápidos en el tamaño de la burbuja debido a una difusión neta de moléculas de gas en la burbuja que hace que crezca hasta un rango de tamaño de resonancia, donde cualquier expansión adicional bajo el efecto de las ondas de sonido provocan el colapso repentino e instantáneo, generar un punto caliente “hot-spot” con una temperatura superior a 5000 K y una presión superior a 1000 atm, dichas implosiones se producen en varios sitios dentro del líquido y, a medida que aumenta su número, también lo hacen las fuerzas de cizallamiento físicas y el número de radicales químicamente activos. De esta manera, cuando se aplica el ultrasonido a un sistema sólido-líquido, el colapso de la burbuja de cavitación difiere del de un sistema de líquido puro y debido a la proximidad de la superficie sólida, las burbujas a menudo colapsan asimétricamente. Se ha demostrado que esto provoca

una entrada de líquido desde la burbuja hacia la superficie del medio sólido, un fenómeno conocido como micro-chorro, donde este efecto conduce a una rápida transferencia de calor y masa en la superficie sólida a medida que se rompe la capa límite, modificando o destruyendo las estructuras superficiales (Mason et al., 2005). De esta manera, la modificación estructural por US inducida en los biopolímeros es debida principalmente a las fuerzas de corte hidrodinámico que se originan de la cavitación acústica y/o de la energía liberada de la implosión de la cavitación de las burbujas formadas en el medio líquido irradiado, ocasionando que la molécula del biopolímero modifique su distribución de peso molecular, los grupos funcionales expuestos en su superficie, o bien su arreglo conformacional, permitiendo con ello mejorar las propiedades funcionales y tecnológicas de los materiales (McClements, 1995; Li et al., 2004; O'Brien, 2007; Petit et al., 2007; Camino et al., 2009; Wong et al., 2009; Wang et al., 2010).

2.6 Emulsiones

Una emulsión se define como una mezcla coloidal que consta de dos fluidos inmiscibles, los cuales se mezclan íntimamente para formar una fase casi homogénea, donde una de las fases líquidas se encuentra dispersa en forma de pequeñas gotas o glóbulos dentro del otro líquido, estabilizado mediante un agente emulsionante (Badui, 2006). La primera fase normalmente es denominada como fase interna, discontinua o dispersa, mientras que la segunda fase se denomina como fase externa, continua o dispersante (Zdzislaw, 2001). En la mayoría de las emulsiones los dos líquidos involucrados consisten en una fase acuosa (W) compuesta por soluciones salinas, de azúcares, colorantes y/o materiales coloidales hidrofílicos, y una fase oleosa (O) compuesta por aceites y/o compuestos liposolubles. Las emulsiones generalmente se clasifican dependiendo de la disposición de las fases dispersa y continua, teniendo así emulsiones de tipo agua-en-aceite definidas comúnmente como W/O, o bien aceite-en-agua definidas como O/W y el emulsionante, siendo éstas las más empleadas en el área de alimentos, fármacos, cosméticos, entre otros; debido principalmente a que la mayoría de los productos de estas áreas tienden a ser de carácter hidrofílico (Martínez, 2002).

Un emulsionante actúa adsorbiéndose en la superficie de las gotas recién formadas, disminuyendo la tensión interfacial y permitiendo la formación de más gotas y de menor tamaño. Esto implica que a menor tensión superficial o interfacial entre la fase oleosa y la acuosa, más fácilmente se llevará a cabo el rompimiento de ellas para la formación de las gotas de la emulsión. Cabe mencionar que todos los emulsionantes son surfactantes o moléculas con actividad superficial, debido a que son capaces de adsorberse en la superficie de las gotas y reducir la tensión superficial; sin embargo, no todos los surfactantes pueden considerarse como buenos emulsionantes, debido a que no todos son capaces de

formar películas interfaciales estables capaces de evitar la coalescencia de las gotas. En general, las macromoléculas como las proteínas y algunos polisacáridos forman películas interfaciales más fuertes que aquellas moléculas de menor tamaño, debido a que estos biopolímeros presentan propiedades químicas que les permiten interactuar con otros grupos funcionales dentro de su propia molécula, o bien con grupos funcionales de otras moléculas vecinas, formando estructuras viscoelásticas como recubrimiento de las gotas de la emulsión, aunado a que estas macromoléculas modifican las propiedades reológicas y electrostáticas del medio que rodea las gotas, favoreciendo la estabilidad de las gotas formadas y prolongando la vida útil de las emulsiones (Vaclavik y Christian, 2014).

Por otra parte, la estabilidad de las emulsiones se refiere a la capacidad de una emulsión para resistir cambios en sus propiedades respecto del tiempo, es decir, una emulsión puede romperse debido a cambios físicos como los cambios relacionados con la ubicación de sus fases y componentes, o químicos si existen cambios en la química de sus componentes. Existen varios mecanismos fisicoquímicos responsables de las alteraciones en las propiedades de una emulsión, la Figura 2 los muestra de forma esquemática.

El cremado y la sedimentación son dos formas de separación gravitacional, donde el primero involucra el movimiento de las gotas hacia la superficie debido a que éstas tienen menor densidad que el líquido que las rodea, mientras que en el segundo las gotas se desplazan hacia la parte inferior debido a que son más densas que la fase continua. Por otra parte, la floculación ocurre cuando dos o más gotas se juntan para formar un agregado en el que las gotas mantienen su integridad individual, mientras que la coalescencia está relacionada con el proceso por el cual dos o más gotas se unen para dar origen a una gota de mayor tamaño; la presencia de este fenómeno en gran escala dentro de la emulsión puede llevar a la separación de las fases. El mecanismo de inversión de fase es el proceso donde una emulsión O/W se convierte en una emulsión W/O, o viceversa (McClements, 2016).

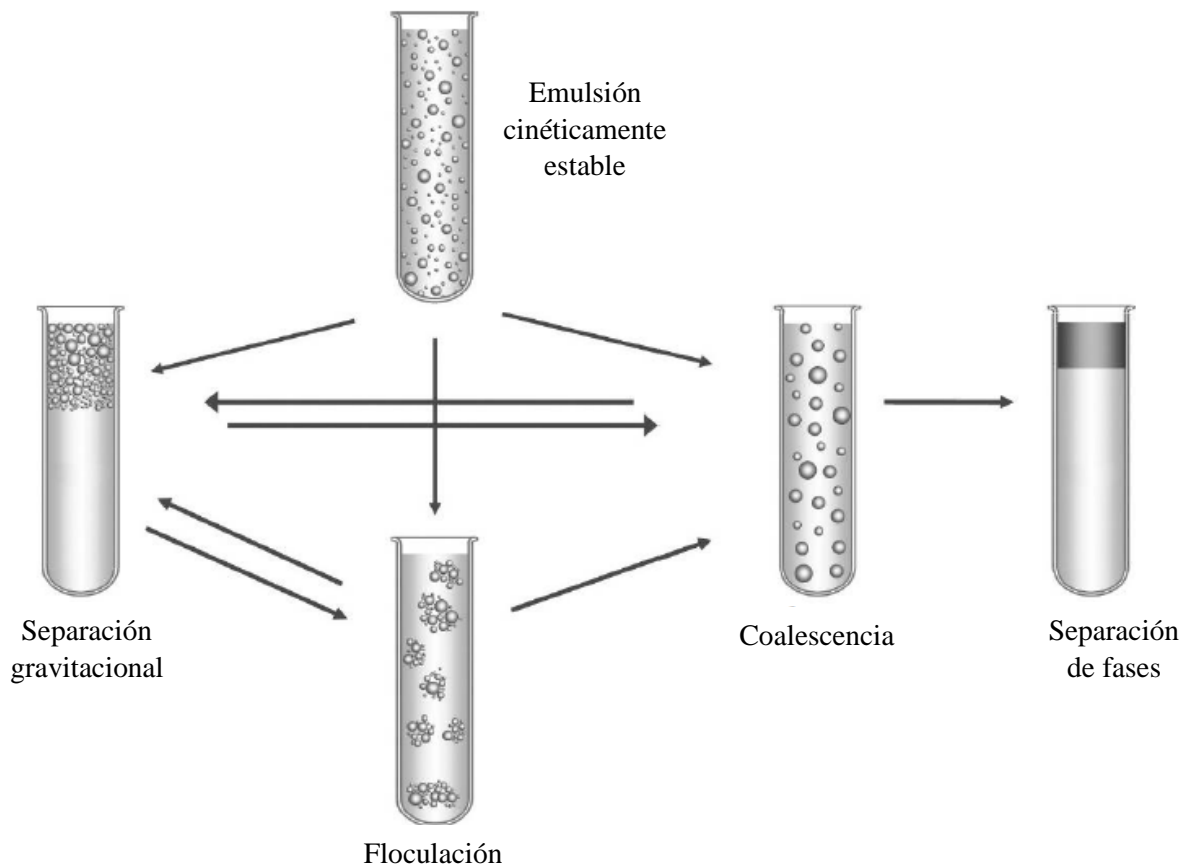


Figura 2. Principales mecanismos de inestabilidad presentes en emulsiones (Tomado de McClements, 2016)

Aunado a los mecanismos previamente descritos, en las emulsiones pueden ocurrir diversos procesos químicos, bioquímicos y microbiológicos, que pueden afectar negativamente la calidad y estabilidad de las emulsiones, por este motivo, el uso de estabilizantes con buenas propiedades superficiales, puede contrarrestar estas desventajas.

3 Justificación

Debido a la creciente búsqueda de aditivos alimentarios que contribuyan a la estabilidad fisicoquímica de los alimentos para alargar la vida de anaquel y hacerlos más apetecibles al consumidor y no para ocultar defectos de fabricación y en casos extremos las condiciones insalubres de elaboración, y que a su vez sean seguros para el consumidor, el uso de biopolímeros como compuestos con actividad superficial para cubrir estas necesidades, ha mostrado que existe una gran gama de biopolímeros de origen animal y vegetal que han demostrado ser apropiados para diversas aplicaciones de la industria de los alimentos. Por otra parte, el uso de biopolímeros de origen microbiano ha sido poco explotado debido a que algunos

de los microorganismos productores de EPS con actividad emulsionante no están catalogados como seguros “GRAS”. No obstante, existen algunas fuentes de EPS con actividad superficial que sí cumplen con esta clasificación, y corresponden a aquellos sintetizados por BAL. El kefirán, EPS producido por las BAL presentes en el producto lácteo fermentado denominado kéfir, ha sido reportado como un compuesto que presenta actividad superficial y capaz de estabilizar emulsiones, sin embargo, la estabilidad cinética de las emulsiones es corta. Por lo que una forma de incrementar esta actividad es a través de la aplicación de US, el cual se ha reportado que es capaz de inducir cambios estructurales en la molécula de los biopolímeros que favorecen la actividad superficial de estos.

4 Hipótesis

El EPS de kefirán es un material que presenta actividad superficial y es capaz de estabilizar emulsiones tipo O/W; sin embargo, la aplicación de US permitirá mejorar su actividad superficial y funcionalidad para su uso como agente emulsionante y estabilizante de emulsiones tipo O/W.

5 Objetivo general

Evaluar el efecto de la aplicación de US sobre las propiedades superficiales de EPS obtenido del kefirán para la estabilización de emulsiones de tipo O/W.

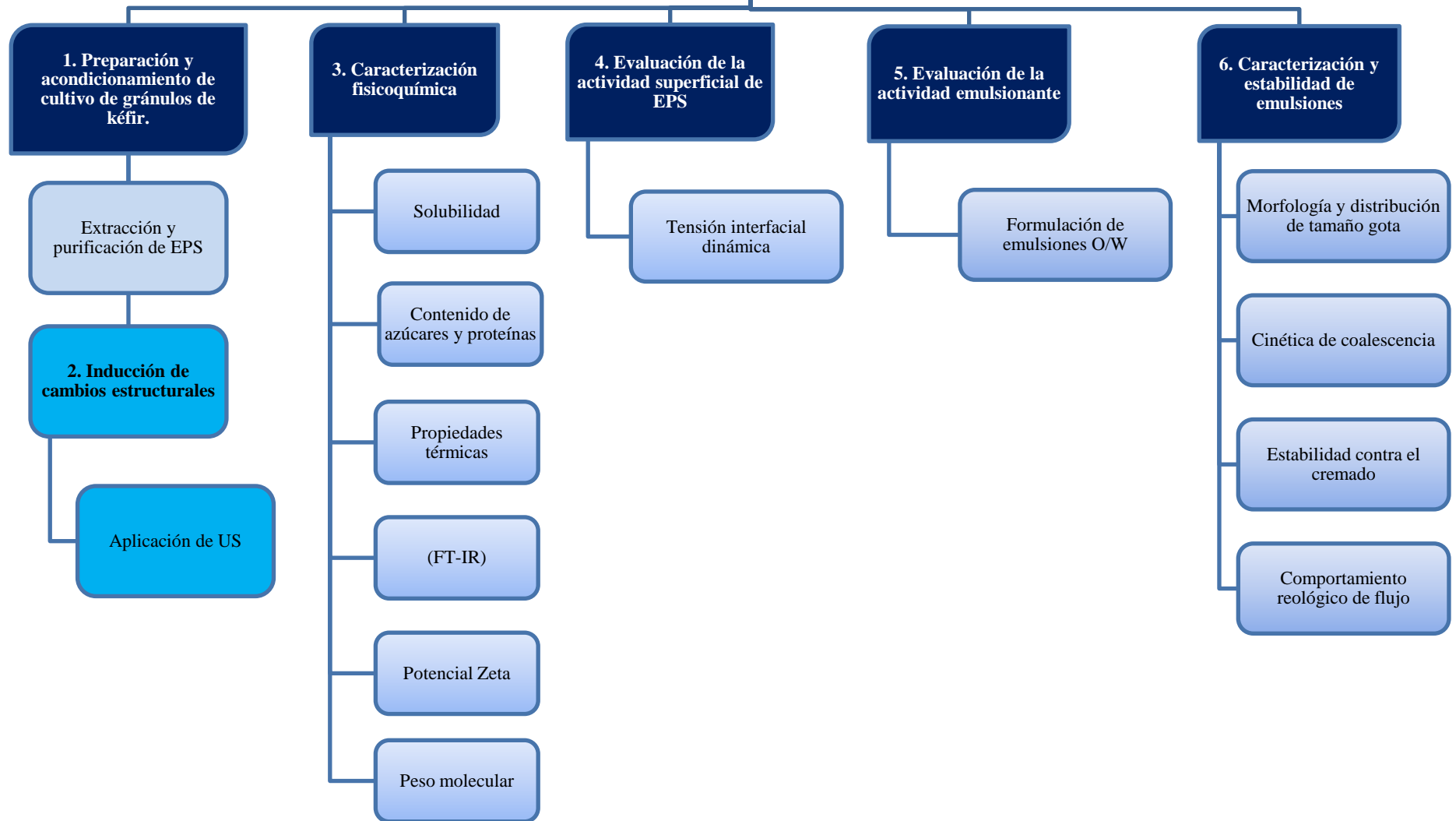
5.1 Objetivos particulares

- Establecer las condiciones de producción y purificación del EPS a partir de cultivos lácticos de kéfir.
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas del EPS de kefirán obtenido a partir de cultivos lácticos de kéfir.
- Evaluar la funcionalidad del EPS de kefirán, a través de formación y estabilización de emulsiones tipo O/W.
- Establecer las condiciones de US bajo las cuáles se mejoran las propiedades superficiales del EPS de kefirán.

6 Metodología

La estrategia experimental seguida para el cumplimiento de los objetivos se muestra en el siguiente diagrama:

Diseño experimental



6.1 Preparación de kéfir y condiciones de cultivo.

Matraces de 500 mL fueron adicionados de 150 mL de agua destilada y esterilizados en autoclave a 121 °C por 15 min; posteriormente se agregaron 19.5 g de leche entera en polvo (Alpura ®). Un gramo de gránulo de kéfir se adicionó e incubó a temperatura ambiente (25°C) por 24 h. La leche fermentada (LF) fue filtrada para separar la biomasa y se almacenó en refrigeración (4°C). Este procedimiento se repitió hasta obtener una cantidad suficiente de EPS para los análisis y tratamientos posteriores.

6.2 Purificación del EPS.

A 500 mL de LF se le adicionaron 83.5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 80% (p/v), la mezcla fue centrifugada a 10,000 rpm por 30 min en una centrifuga refrigerada Hermle Z323K (Hermle Labortechnik GmbH, Alemania). El sobrenadante se recolectó y se ajustó el pH a 7.0 mediante la adición de hidróxido de sodio (NaOH) 4N. Posteriormente, se agregaron tres volúmenes de etanol absoluto, mezclando y dejando reposar por 20 min. Pasado este tiempo, la muestra se centrifugó a 4,000 rpm durante 20 min, el precipitado se resuspendió en 40 mL de agua destilada y se dializó en membranas de nylon (MWCO 12,400 Da) por 48 h a 4°C contra agua desionizada y agitación continua, haciendo lavados cada 3-4 h. El EPS purificado se liofilizó y almacenó en refrigeración hasta su posterior uso.

6.3 Caracterización fisicoquímica del EPS

6.3.1 Determinación del contenido de azúcares.

El contenido de azúcares en el EPS fue determinado mediante el método de Fenol-Sulfúrico (Dubois et al., 1956). 1 mg de EPS se agregaron en 10 mL de agua destilada, posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL y se mezcló con 1 mL de fenol al 5% (p/v), agitando con un vórtex. Posteriormente se agregaron 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y se mezcló con un vórtex. La mezcla se dejó reposar en un baño de agua fría hasta alcanzar la temperatura ambiente. La muestra fue colocada en un espectrofotómetro UV-Vis Genesys 2 (Spectronics), y se tomó la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm. La concentración de carbohidratos fue estimada después de realizar una curva patrón de glucosa [0-100 µg/mL] siguiendo el mismo procedimiento.

6.3.2 Determinación del contenido de proteína.

El contenido de proteína se determinó siguiendo el procedimiento descrito por Jiang et al. (2015). Brevemente, 10 mg de EPS se colocaron en 5 mL de una solución amortiguadora de fosfatos (PBS, 10 mM) a pH 7.0, y dejó reposar durante 24 h a 25 °C para permitir su completa hidratación. Posteriormente, 1 mL de EPS se mezcló con 1 mL del reactivo de Bradford y se dejó reposar por 5 min en oscuridad, la absorbancia de la muestra fue leída en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. Los

resultados obtenidos fueron comparados contra una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) en un intervalo de concentración de 0 a 60 $\mu\text{g/mL}$.

6.3.3 Determinación del contenido de humedad

Veinte miligramos de EPS se colocaron en charolas de aluminio llevadas previamente a peso constante, las muestras se colocaron en un horno a 110 °C durante 3 h, posteriormente se colocaron en un desecador hasta que alcanzaron la temperatura ambiente y el peso de la muestra se registró. La relación entre el peso de la muestra inicial y el de la muestra seca se utilizó para determinar el contenido de humedad (Kirk et al., 1996).

6.3.4 Determinación del contenido de cenizas

Veinte miligramos de EPS se colocaron en crisoles llevados previamente a peso constante. Las muestras fueron colocadas en una mufla y calcinadas a 550 °C durante 3 h. Las muestras fueron retiradas una vez que se observó la presencia de cenizas blancas o ligeramente grises. Los crisoles fueron colocados en un desecador para permitirles llegar a temperatura ambiente (25°C). Posteriormente se registró el peso de cada muestra (Kirk et al., 1996).

6.4 Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)

El EPS fue analizado por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) en un espectro FT-IR Frontier (Perkin Elmer, E.U.A) acoplado a un accesorio ATR. Se leyó el espectro de 4000 hasta 400 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} , donde los principales grupos funcionales presentes en la estructura del EPS fueron elucidados (Radhouane et al., 2018).

6.5 Determinación del Peso Molecular (PM)

6.5.1 PM por Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

Para la determinación del PM del EPS por la técnica de DLS se utilizó un equipo ZetaSizer NS (Malvern, Malvern Instruments, Reino Unido), siguiendo el procedimiento basado en las recomendaciones del fabricante. Se prepararon distintas concentraciones de EPS en un solvente adecuado, registrando el incremento del índice de refracción diferencia ($d\tilde{n}/dC$). Las muestras fueron colocadas en la celda de medición del equipo de acuerdo con el procedimiento de operación estándar del equipo con la finalidad de obtener el diagrama de Debye correspondiente, a partir del cual se estimó el valor del peso molecular como el inverso de la pendiente, y el segundo coeficiente virial como la ordenada al origen del gráfico.

6.5.2 PM por Cromatografía de Permeación en Gel (GPC)

Para la estimación del PM por GPC se utilizó un sistema HPLC con una columna PLaquagel-OH 8 μ m 300 x 7.5 mm (Polymer Laboratories Varian Inc), y agua desionizada como fase móvil, con un flujo de 0.4 mL/mL a una temperatura de 40°C. 1 mL de solución de EPS en el PBS (pH 3.0, 0.01M) previamente filtrada en una membrana de nylon de 0.45 μ m, se inyectó una alícuota de 1 μ L al sistema cromatográfico (Abid et al., 2018). El PM fue estimado al comparar el tiempo de retención de las señales observadas con una curva estándar de peso molecular de dextranos [738-788,000 Da].

6.6 Evaluación de las propiedades térmicas

5 mg de EPS se colocaron en una celda hermética de aluminio previamente pesada y sellada. La muestra se colocó en el portamuestras de un calorímetro diferencial de barrido (DSC) Q1000 (TA Instruments, E.U.A.). El EPS fue sometido a un barrido de temperatura de 25 a 200 °C a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min, registrando el flujo de calor generado de dicho calentamiento, con la finalidad de obtener el punto de transición térmica (T_m).

6.7 Evaluación de la actividad superficial

6.7.1 Solubilidad de los EPS

Cien miligramos de EPS se dispersaron en 2 mL de agua desionizada empleando agitación magnética. Posteriormente, el pH de la dispersión se ajustó en un intervalo de 3-7 mediante la adición de HCl (0.1N) o NaOH (0.1N), dejando la muestra bajo condiciones de agitación durante al menos 12 h para permitir la completa hidratación del EPS. Posteriormente, las muestras resultantes fueron centrifugadas en una centrífuga refrigerada Hermle Z323K (Hermle Labortechnik GmbH, Alemania) a 10,000 rpm por 10 min. La fase del sobrenadante fue decantada y secada en un horno a 50°C hasta llegar a peso constante. El porcentaje de EPS soluble fue determinado como la fracción másica del EPS presente en el sobrenadante respecto a la cantidad de EPS utilizado al inicio (Abid et al., 2018).

6.7.2 Potencial zeta (ζ)

La determinación de la carga superficial del EPS en solución fue determinada en un Zetasizer Nano NS (Malvern Instruments, Malvern, R.U.), para ello se prepararon dispersiones al 1% (p/p) del EPS en agua desionizada, y se les ajustó el pH en un intervalo de 3.0 a 8.0. El potencial zeta (ζ) de las muestras fue registrado.

6.7.3 Tensión interfacial dinámica

La tensión interfacial dinámica se determinó usando el método descrito por Tang y Shen (2015) con ligeras modificaciones, se utilizó un tensiómetro de gota pendiente OCA-20 (Dataphysics Instrument

GmbH, Alemania). El montaje de la interfase agua-aceite consistió en colocar aceite de canola (AC) previamente filtrado en una celda de vidrio óptico. Por otra parte, la dispersión de EPS al 1.0 % (p/p), previamente filtrada, se colocó en una jeringa de dosificación. Posteriormente, la aguja de la jeringa se sumergió en la celda que contenía el AC y se procedió a formar una gota de la dispersión acuosa con un volumen 30 μ L. La determinación de la tensión interfacial fue monitoreada durante el tiempo máximo que resistió la gota pendiente y graficada respecto al tiempo.

6.8 Formación de emulsiones O/W

Para evaluar la funcionalidad del EPS como agente emulsionante, se procedió a formular emulsiones de tipo aceite-en-agua (O/W). Brevemente, se prepararon dispersiones de EPS a una concentración del 10% (p/p), las cuales se mantuvieron bajo agitación durante 4 h a temperatura ambiente (25°C) y se almacenaron a 4°C por 12 h más para asegurar la completa hidratación. Las emulsiones se prepararon con una fracción másica de fase dispersa de 5% ($\phi=0.05$), donde la fase dispersa consistió en AC que se adicionó a la fase continua (W, dispersión de EPS) por goteo a una velocidad de homogeneización de 7, 900 rpm en un homogeneizador Ultra-Turrax T10 basic (IKA Works, Staufen, Alemania), al concluir con la adición de la fase oleosa la velocidad del homogeneizador se llevó a 11,400 rpm durante 10 min. Todo el procedimiento de mezclado se realizó colocando la muestra en un baño de hielo para evitar el sobrecalentamiento de la misma.

6.9 Caracterización y evaluación de la estabilidad de las emulsiones

6.9.1 Morfología y distribución tamaño gota.

La morfología de las emulsiones O/W se examinó con un microscopio óptico OLYMPUS BX4S, bajo objetivos de 10X y 100X, acoplado a una cámara AxioCam (ERc5s). Las emulsiones frescas se diluyeron a razón de 1:10 en agua desionizada, fueron depositadas entre las láminas de un portaobjetos y cubreobjetos. Se obtuvieron las respectivas micrografías para las muestras y a través del software de análisis de imágenes ZEN 2012 (Blueedition, System) se determinó el diámetro (d_{10}) de las gotas de la emulsión.

Para el caso de la distribución de tamaño de gota ($D_{4,3}$) se empleó un analizador de tamaño de partícula por difracción de rayo láser Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido), se utilizó un índice de refracción de 1.333 para el medio dispersante.

6.9.2 Comportamiento reológico de flujo

Para la evaluación del comportamiento reológico de las emulsiones formadas con EPS se empleó un reómetro se empleó un reómetro MCR 300 (Physica Messtechnik, Stuttgart, Germany), con una geometría cono-plato, donde el cono tenía 50 mm d diámetro y un ángulo de 2°. La temperatura fue mantenida a 25 °C mediante un peltier TEK 150P. Las emulsiones fueron colocadas en cantidad suficiente en el sistema de medición y se dejaron reposar durante 2 min antes de comenzar, la prueba se realizó empleando un intervalo de velocidad de corte (shear rate, $\dot{\gamma}$) de 0.001 a 100 s⁻¹, evaluando la viscosidad aparente (η_{ap}) (Murillo, et al, 2011).

6.9.3 Cinética de coalescencia

La estabilidad de las emulsiones se evaluó a través de la determinación de la velocidad de coalescencia. Para este fin se monitoreó el cambio en el diámetro promedio volumétrico ($D_{4,3}$) durante el tiempo de almacenamiento. Cabe mencionar que Sherman (1969) y Walstra (1987) reportaron que la coalescencia de gotas en una emulsión sencilla puede representarse mediante una cinética de primer orden (Ecuación 1):

$$\frac{N_t}{N_0} = e^{-k_c \cdot t} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde N_t representa la concentración del número de gotas al tiempo t , N_0 es la concentración del número de gotas en la emulsión fresca ($t=0$), y k_c es la constante de velocidad de coalescencia que relaciona la probabilidad de que exista un rompimiento en la película interfacial de la emulsión durante el tiempo, conduciendo a la coalescencia de gotas pequeñas en otras de mayor tamaño (Román-Guerrero, et al., 2009). Asimismo, cuando el volumen de las gotas en la emulsión se mantiene constante y no hay expulsión de aceite en las emulsiones, la relación entre N y el diámetro promedio volumétrico ($D_{4,3}$) puede representarse como se muestra en la Ecuación 2.

$$\frac{N_t}{N_0} = \left[\frac{(D_{4,3})_{t=0}}{(D_{4,3})_{t=t}} \right]^3 \quad (\text{Ecuación 2})$$

Por lo que el tratamiento de datos consistió en graficar $\ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right)$ vs el tiempo de almacenamiento para las emulsiones resultando en una línea recta cuya pendiente corresponde a k_c .

6.9.4 Estabilidad contra el cremado

Debido a que otro el cremado es uno de los mecanismos de inestabilidad más comunes en las emulsiones O/W, este mecanismo fue evaluado en un equipo LUMiSizer (L.U.M. GmbH, Berlín, Alemania), la cual es una técnica novedosa que emplea la sedimentación centrífuga para acelerar la presencia de fenómenos

de inestabilidad como la sedimentación, floculación o el cremado. La integración de los gráficos correspondientes a la separación de fases, representados como el porcentaje de adsorción de luz por hora, permite establecer la velocidad con la que se presenta el fenómeno de cremado. Esta velocidad está correlacionada con la estabilidad de la emulsión de EPS, es decir, a mayor velocidad de cremado menor será la estabilidad del sistema. Los parámetros instrumentales que se emplean son: velocidad rotacional de 2000 rpm, temperatura de 25 °C, 250 mediciones cada 30 por 2 h. Las gráficas de la velocidad de cremado (% transmisión integrada/h) que se obtuvo de las pendientes fueron proporcionadas por un software de análisis del equipo (Zhao, et al., 2015).

6.10 Inducción de cambios estructurales por la aplicación de US

Se prepararon dispersiones de EPS a concentraciones de 1 y 3 % (p/v), alícuotas de 20 g de dispersión fueron irradiadas con US a través de un Ultrasonic Processor UP400S (Hielscher Ultrasonics GmbH, Alemania) con un sonotrodo de 7 mm de diámetro, se utilizó una frecuencia de US fija de 24 kHz, con dos niveles de amplitud de 80% y 50%, y tiempos de sonicación de 15, y 20 min respectivamente, procurando la aplicación de 5 min continuos de US por 1 min de reposo de la muestra, lo anterior con la finalidad de evitar un calentamiento excesivo de la muestra tratada, donde las temperaturas inicial y final del tratamiento fueron monitoreadas. Las muestras resultantes fueron codificadas de acuerdo con el nivel de concentración y las condiciones de US descritas anteriormente (Tabla 2). Cada tratamiento se secó en una estufa a 40°C durante 48 h hasta alcanzar peso constante, las muestras resultantes se trituraron en un mortero, se tamizaron en una malla y se almacenaron en recipientes de plástico para su posterior caracterización. Cada tratamiento fue realizado por triplicado.

Tabla 1. Codificación de tratamientos de US aplicados al EPS.

Concentración EPS (%)	Amplitud de US (%)	Tiempo de tratamiento (min)	Codificación
-	-	-	EPS S/TRATAR
1	80	15	EPS(1%-15MIN-80A)
		20	EPS(1%-20MIN-80A)
	50	15	EPS(1%-15MIN-50A)
		20	EPS(1%-20MIN-50A)
3	80	15	EPS(3%-15MIN-80A)
		20	EPS(3%-20MIN-80A)
	50	15	EPS(3%-15MIN-50A)
		20	EPS(3%-20MIN-50A)

6.11 Caracterización del EPS tratado con US

El EPS tratado con US bajo las distintas condiciones fueron caracterizadas fisicoquímicamente y evaluadas en su actividad superficial de acuerdo con las metodologías descritas en secciones previas, para establecer las condiciones de US en las cuales se puede mejorar su actividad como agente emulsionante.

7 Resultados

7.1 Caracterización fisicoquímica de EPS

A partir de las condiciones utilizadas para la producción de kéfir y kefirán, el EPS purificado presentó un rendimiento de 1 g de EPS por cada 500 mL de kéfir producido, a pesar de que puede llegar a pensarse que es un rendimiento bajo, es importante mencionar que este EPS puede considerarse como un co-producto de valor agregado, ya que la leche fermentada ya cuenta con un valor comercial propio. La

caracterización fisicoquímica obtenida de este EPS se muestra en la Tabla 2 donde los contenidos obtenidos son semejantes a los reportados por Martínez Díaz, 2019; Botelho, et al., 2014.

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica del EPS

	Contenido (mg/gEPS)
Carbohidratos	332.52±0.02
Proteína	187.36±0.01
Humedad	170.0±60
Cenizas	13.55 ±3.56

Datos expresados en base seca.

Cabe mencionar que las posibles diferencias en esta composición y rendimiento del EPS de kéfir depende en gran medida de las condiciones utilizadas durante la fermentación de la leche, el origen del cultivo láctico, las condiciones de almacenamiento, entre otras.

A continuación, se detallarán los resultados obtenidos de la caracterización estructural y de actividad superficial del EPS, y debido a que el objetivo del trabajo es evaluar el efecto del tratamiento del US sobre estas propiedades, las siguientes secciones se presentarán a través de la comparación de los comportamientos de los distintos tratamientos de US respecto al EPS S/TRATAR.

7.2 Espectroscopia FT-IR

Una de las técnicas más empleadas para la caracterización de los cambios estructurales de biopolímeros es la espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier. Esta herramienta permite obtener información estructural de los grupos funcionales que componen un determinado polímero. En la Figura 3 se muestra el espectro de IR del EPS S/TRATAR.

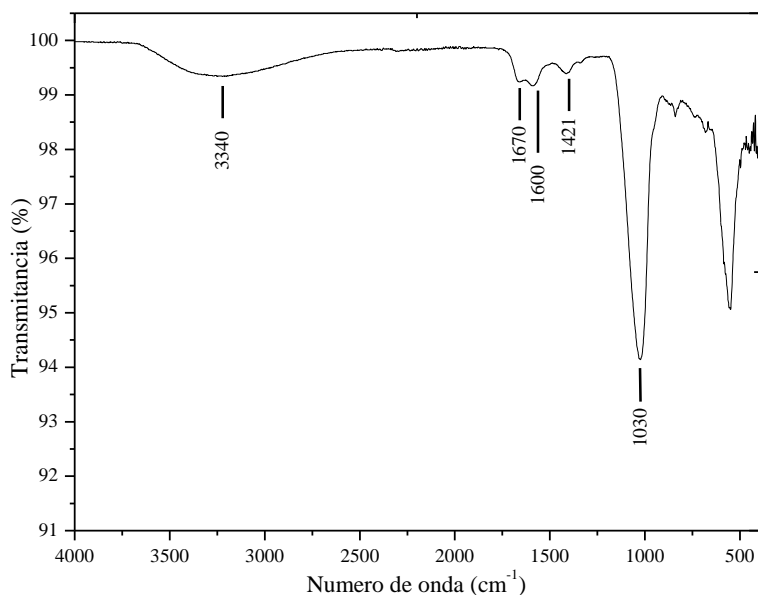


Figura 3. Perfil de FT-IR del EPS S/TRATAR.

En la Figura 3, el espectro de IR presentó las siguientes señales, en la banda 3340 cm^{-1} que corresponde a la presencia de grupos hidroxilo (OH), en la zona de 1650 cm^{-1} (indicativo de vibración de estiramiento C=O, amida I); 1421 cm^{-1} (indicativo de COO-aniones), la región de $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ para C-O-C y C-O de grupos alcohol, en el caso de la región $1200\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$, características asimétricas y simétricas de estiramiento de enlaces C-O, además de una banda intensa en 1030 cm^{-1} (indicativo de estiramiento de -OH), la cual es una señal característica de los polisacáridos y corresponde con lo reportado por diversos autores para este tipo de EPS (Wang et al., 2010; Zajsek, et al, 2011; Feng et al., 2012).

Para el caso de los tratamientos con US, los resultados obtenidos para EPS (1%-20MIN-80A) y EPS (1%-15MIN-80A), se observó que el US sí tuvo efectos sobre la estructura de los EPS. En la Figura 4a se puede observar en ambas bandas de las muestras tratadas se empieza a resaltar dos pequeñas frecuencias en la región C-O-C, al principio y al final de la frecuencia característica de los polisacáridos(1030 cm^{-1}), las cuales no se identifica en el EPS sin tratamiento, de igual manera en la región de C-O se observan frecuencias pronunciadas que el nativo no muestra y esto se debe en gran medida a los cambios obtenidos al someter al EPS a los tratamientos.

Para la Figura 4b (EPS-1%-20 y 15MIN-50A) estas bandas de frecuencias son aún más notables, aunque en estos dos tratamientos las frecuencias observadas en la Figura 4a de la región C-O-C se desplazaron ligeramente, de la misma manera las demás frecuencias de la región de estiramiento de enlaces C-O las frecuencias fueron más pronunciadas en comparación con el EPS S/TRATAR y los primeros tratamientos.

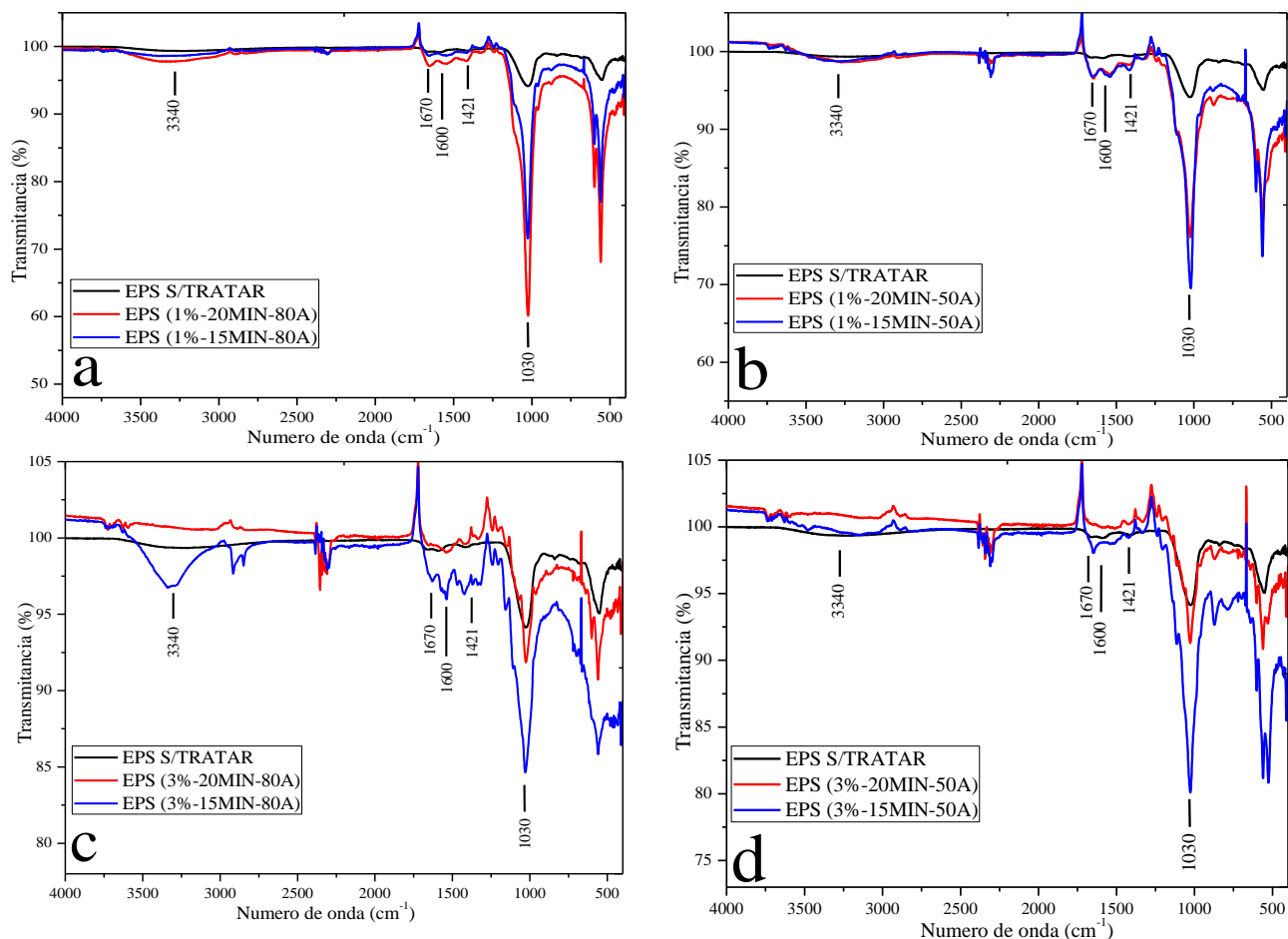


Figura 4. Espectros de infrarrojo para dispersiones del EPS S/TRATAR y las tratadas: a) EPS (1%-20 y 15MIN-80A), b) EPS (1%-20 y 15MIN-50A), c) EPS (3%-20 y 15MIN-80A) y d) EPS (3%-20 y 15MIN-50A).

Para los tratamientos EPS (3%-20-80A) y EPS (3%-15MIN-80A) en la Figura 4c los espectros mostraron mayor pronunciación de las bandas y una mayor cantidad de frecuencias para ambas regiones de los exopolisacáridos, aunque en caso de estos tratamientos, la frecuencia de la banda en 1030 cm^{-1} disminuyó en comparación con los demás tratamientos, siendo similar a la del EPS S/TRATAR.

Por último, los resultados obtenidos para EPS 3% y 50A, sin importar el tiempo de US (Figura 4d) también mostraron un comportamiento muy parecido que los tratamientos anteriores de la Figura 4c, lo cual nos muestran cambios considerables en la estructura del EPS al aplicar distintos tratamientos de US.

7.3 *Peso Molecular*

La estimación del PM de biopolímeros como los EPS, puede realizarse por diversas técnicas, las cuales presentan ventajas y desventajas que van desde el tiempo requerido para el análisis como el uso de grandes cantidades de reactivos. La técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) es una técnica rápida,

no invasiva que permite la medición de muestras sin la necesidad de involucrar diluciones en la muestra, y permite su recuperación al no ser destructiva. La DLS mide las fluctuaciones dependientes del tiempo en la luz dispersa de las moléculas en solución debido al movimiento browniano, lo que permite determinar el coeficiente de difusión traslacional y, posteriormente, el radio hidrodinámico (R_h) por medio de la ecuación de Stokes-Einstein. En este sentido, el R_h es asociado al radio de una esfera que se difunde a la misma velocidad en el medio dispersante, como una molécula en solución (Zetasizer Nano Application Note MRK528-01).

A partir de las determinaciones del R_h de las distintas concentraciones de EPS utilizadas se obtuvo el gráfico de Debye (KC/R_θ vs concentración) para el EPS (Figura 5), donde es importante resaltar que a partir de la regresión lineal de los datos ajustados por el software del equipo proporciona los valores del PM como el inverso de la intersección y el 2do coeficiente virial (A_2) como la mitad del valor de la pendiente, de acuerdo con la Ecuación 3 (Zetasizer Nano Application Note MRK528-01).

$$\frac{KC}{R_\theta} = \frac{1}{PM} + 2A_2C \quad (3)$$

Por lo que el PM estimado para el EPS fue de 491.89 ± 23 kDa, con un valor A_2 de 0.149 mL mol/g^2 , este valor representa la fuerza con la que las moléculas del EPS interaccionan y se ha relacionado con la solubilidad de la muestra, es decir, valores de A_2 negativos indican que la molécula de estudio tiende hacia la agregación y no a la solvatación.

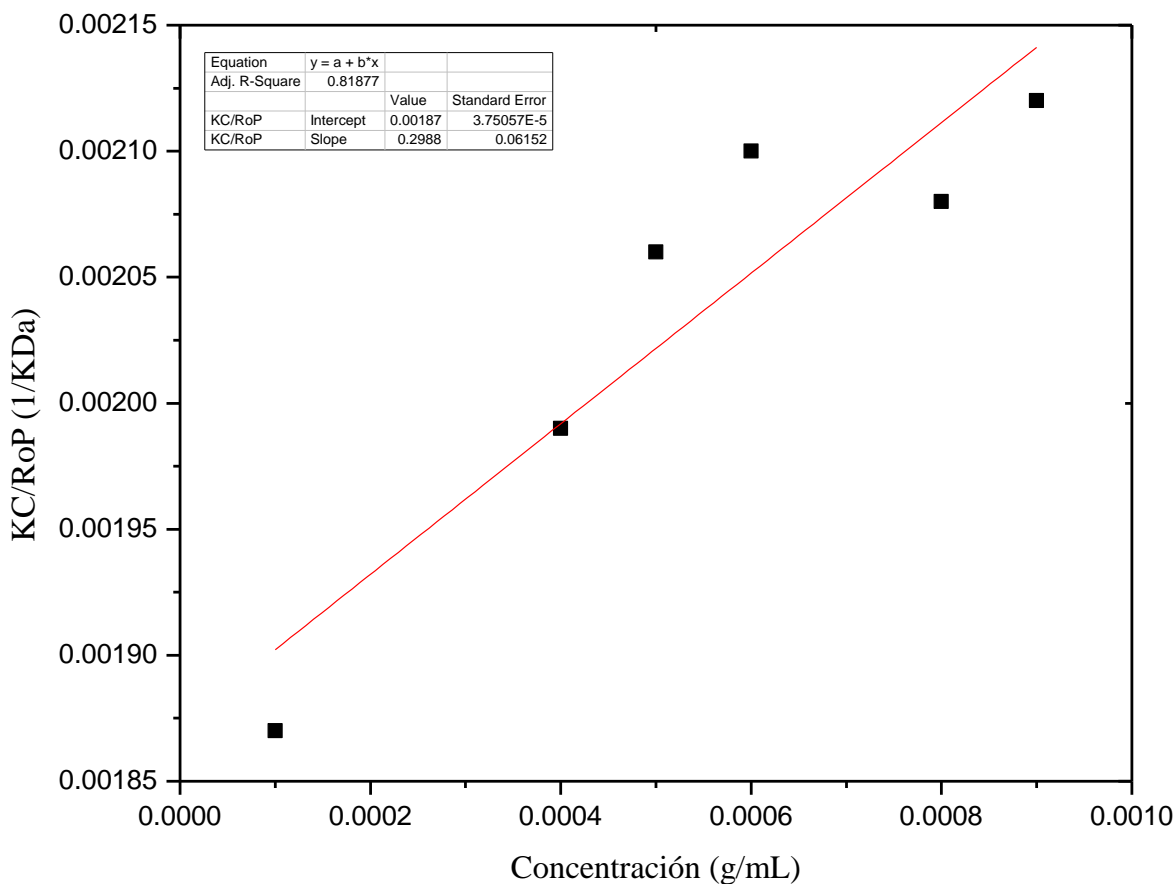


Figura 5. Gráfico de Debye para el EPS obtenido de kefirán.

Para confirmar este dato, se realizaron pruebas por GPC en un sistema de HPLC, comparando los tiempos de elución del EPS contra una curva patrón de carbohidratos de PM conocido. La Tabla 3 muestra los tiempos de elución que se obtuvieron para las distintas señales y su respectivo PM, donde puede observarse que el EPS está constituido por 4 fracciones principales, siendo la señal número 4 la que presenta un PM semejante al obtenido por la técnica de DLS y la que representa la mayor área integrada en el cromatograma (dato no mostrado).

Tabla 3. Fraccionamiento y PM del EPS de kefirán por GPC

Señal	t_R (min)	Área (%)	PM (kDa)
1	23.66	5.1	54.59
2	23.53	10.4	60.63
3	23.14	20.8	83.08

7.4 Propiedades térmicas

La evaluación de las propiedades térmicas de materiales como los biopolímeros, el análisis de propiedades como las temperaturas de transición vítrea, cristalización y descomposición resultan relevantes para las aplicaciones tecnofuncionales de estos materiales. La calorimetría de barrido diferencial (DSC) es una técnica de caracterización física utilizada para evaluar el comportamiento térmico de polímeros puros, copolímeros y mezclas de polímeros y compuestos, y lo realiza basado en las diferencias obtenidas del flujo de calor entre la muestra analizada y una referencia. Cabe mencionar que las propiedades térmicas de los biopolímeros dependen de diversos factores como su origen, pureza, composición, procesamiento, tratamiento térmico, estrés mecánico y el envejecimiento. En este sentido, la determinación de la temperatura de fusión (T_m) y de la entalpía específica de fusión (ΔH_m), pueden aportar información sobre el grado de cristalinidad y ordenamiento estructural en el biopolímero (Gregorova, 2013).

La Figura 6 muestra el termograma obtenido para el EPS S/TRATAR y la Figura 7 muestra el comparativo de esta muestra control respecto a los diferentes tratamientos de US.

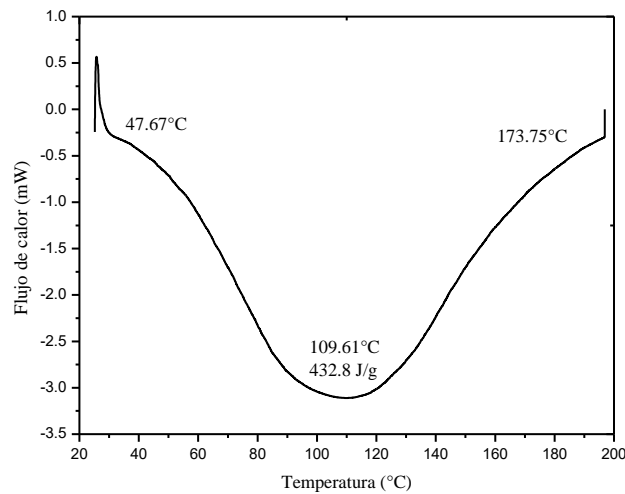


Figura 6. Termograma obtenido por DSC para el EPS S/TRATAR.

Como puede observarse en la Figura 6 para el EPS S/TRATAR, la T_m fue de 109.61 °C, y de acuerdo con la metodología reportada por Gregorova et al. (2011), el valor de la entalpía específica fue de 432.8 J/g.

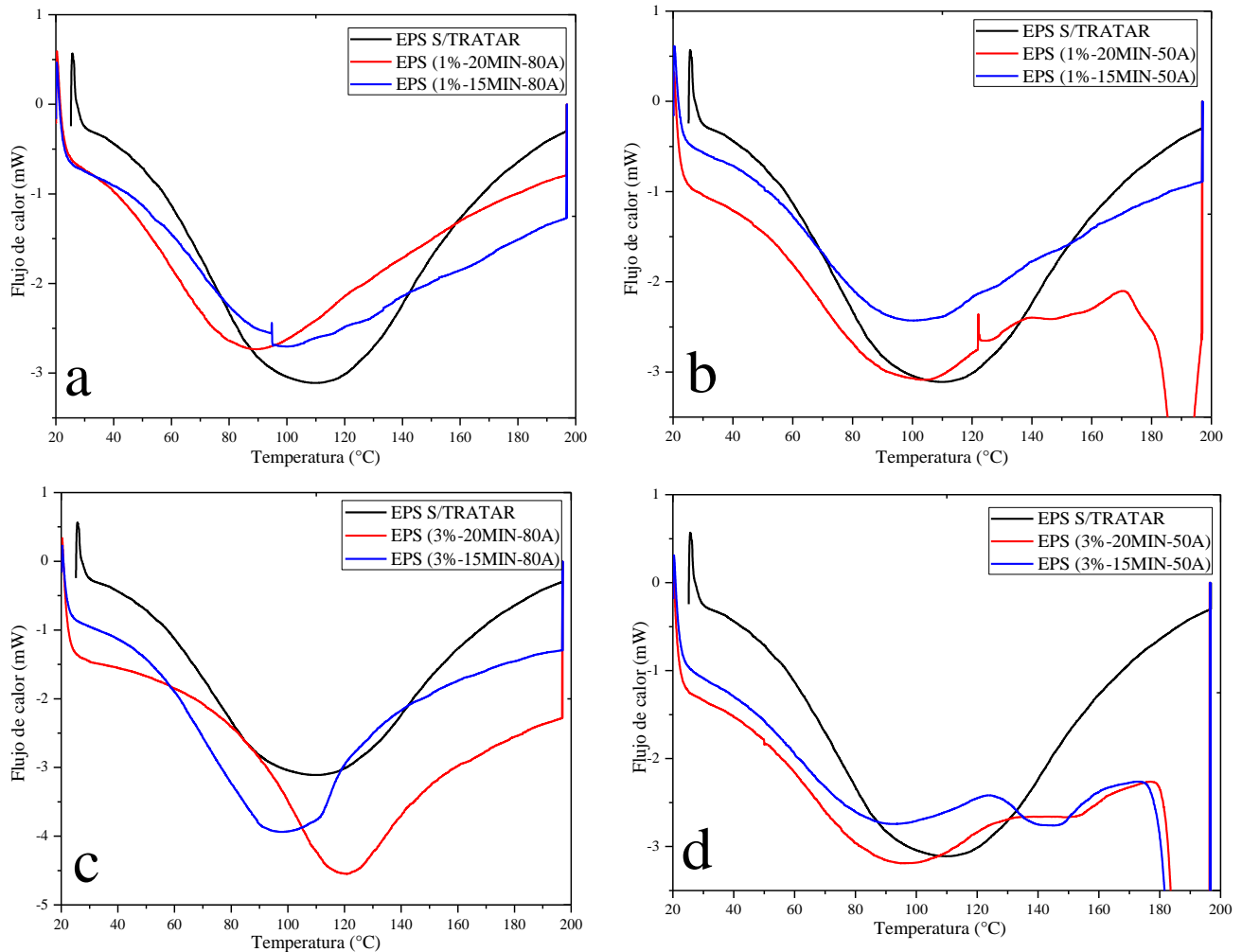


Figura 7. Termogramas de DSC para el EPS tratado con US y su comparación con el EPS S/TRATAR.

En la Figura 7a se muestran los termogramas obtenidos para los tratamientos de US a 1% de concentración de EPS, con 80% de Amplitud, donde se puede observar que, para estas condiciones, la aplicación de 20 min de US provocó que el punto mínimo en la curva se desplazara hacia valores de temperatura menores que los encontrados para la muestra control (línea negra), fenómeno que no fue apreciado cuando la amplitud de US fue de 50% (Figura 7b). Cuando la concentración de EPS se incrementó a 3% y usando 80% de amplitud (Figura 7c), se observaron diferencias significativas en la ubicación del punto mínimo de flujo de calor, y que además el tiempo sí tuvo efecto en este comportamiento, siendo que la aplicación de 20 min de US provocó un incremento en la T_m respecto a la muestra control (línea negra), mientras que 15 min de US provocó un ligero desplazamiento hacia valores de T_m por debajo de la muestra control. Finalmente, en la Figura 7d se observa que el incremento de concentración a 3% de EPS presentó un efecto significativo sobre el perfil térmico de la muestra control, a pesar de que la amplitud fue menor que en la Figura 7c. Finalmente, los cambios

en T_m observados pueden estar relacionados con cambios estructurales que sufre el EPS bajo las distintas condiciones de US; Gregorova (2013) reportó que este valor de T_m puede relacionarse con el nivel de organización estructural, y con ello definir si un biopolímero tiene estructura cristalina o amorfa, y dado que el tratamiento EPS(3%-20MIN-80) fue el que desplazó el valor de T_m hacia valores mayores de temperatura, tal vez sea posible indicar que el US indujo arreglos estructurales en el EPS que mejoraron su estabilidad térmica. En la Tabla 4 se muestran los valores de T_m y ΔH obtenidos para cada uno de los tratamientos.

Tabla 4. Propiedades térmicas del EPS S/TRATAR y tratado con US.

Muestra	T_m (°C)	ΔH (J/g)	Muestra	T_m (°C)	ΔH (J/g)
EPS S/TRATAR	109.61	432.8	-	-	-
EPS(1%-20MIN-80A)	88.09	392.7	EPS (1%-20MIN-50A)	99.32	302.01
EPS (1%-15MIN-80A)	95.36	386.9	EPS (1%-15MIN-50A)	81.49	343.4
EPS (3%-20MIN-80A)	119.93	412.3	EPS (3%-20MIN-50A)	90.71	310.73
EPS (3%-15MIN-80A)	95.38	373.5	EPS (3%-15MIN-50A)	87.74	315.08

7.5 *Potencial Zeta*

En la Figura 8 se muestran los perfiles del potencial Zeta (ζ) de los tratamientos de US aplicados al EPS de kefirán. De manera general, el EPS tratado con US o sin tratar se comportó como un electrolito aniónico en un intervalo de pH de 3 a 8. La determinación del potencial Zeta, como una herramienta para llevar a cabo la medición de la carga electrocinética o potencial electrocinético en las dispersiones coloidales, puede brindar información sobre los cambios conformacionales y la exposición de mayor o menor número de grupos de carácter electrostático (Szewczuk, 2014).

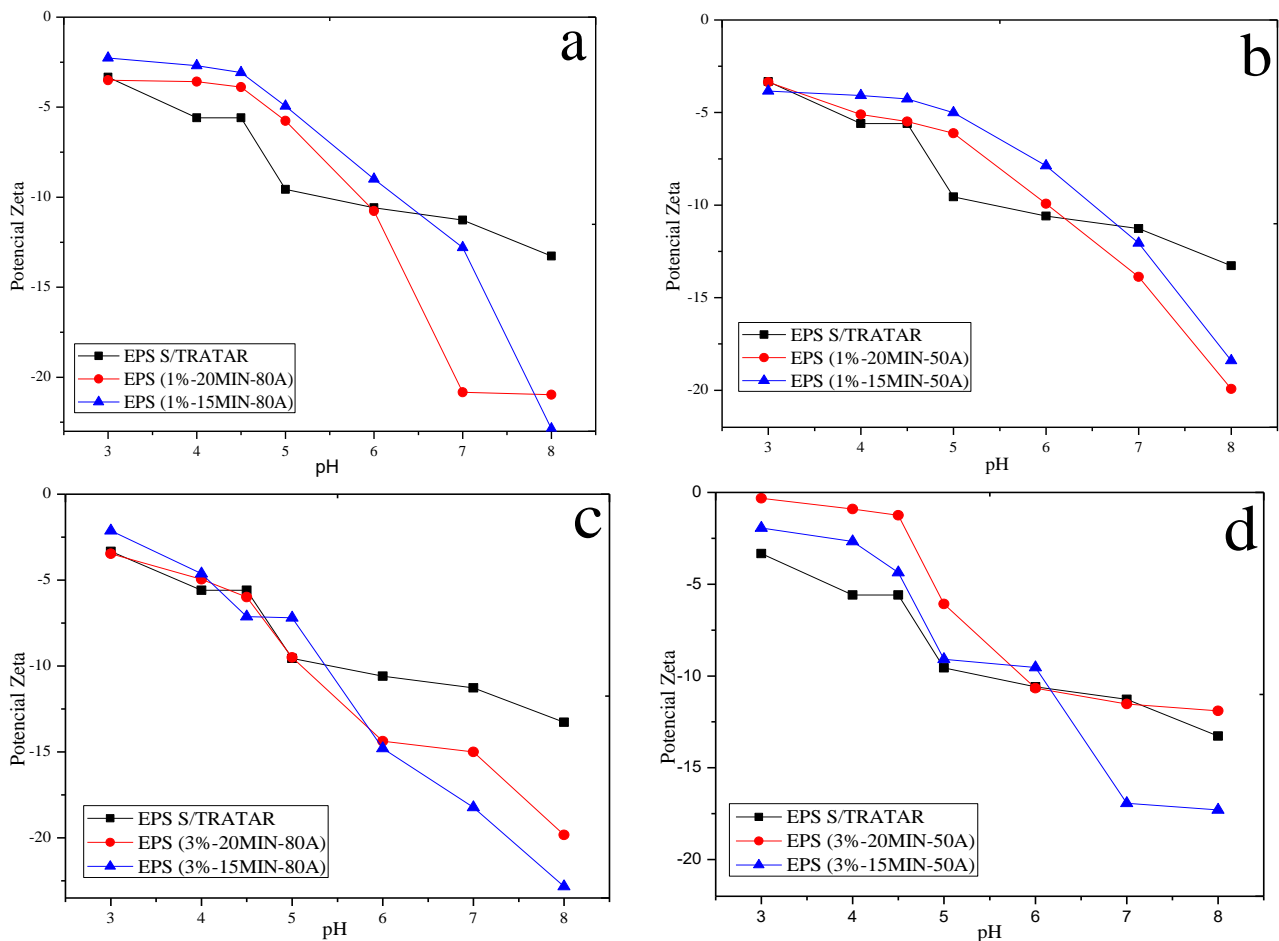


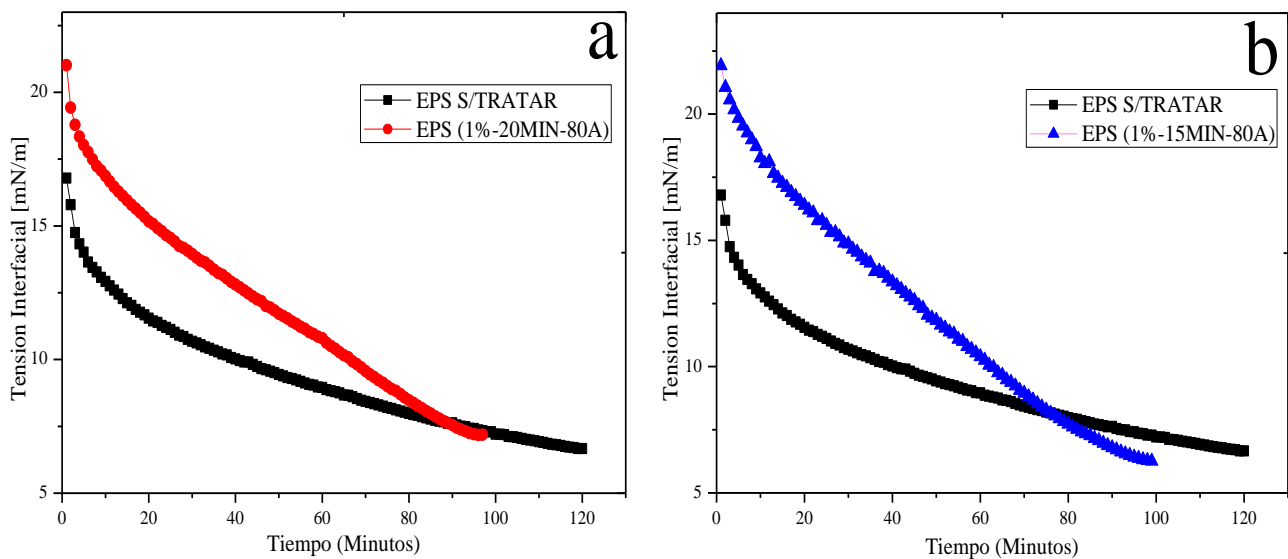
Figura 8. Perfiles de Potencial Zeta del EPS tratado con US y sin tratar.

De forma general, se puede observar que las muestras tratadas con US presentaron perfiles de potencial Zeta ligeramente diferentes respecto a la muestra control, y en la mayoría de ellos se observa que los tratamientos de US mostraron valores de potencial más negativos en valores de pH neutros y cargas menos negativas que el control, a valores de pH por debajo de 5.0, excepto los tratamientos de la Figura 8c, que mostraron perfiles muy semejantes a la muestra control. Estos cambios en los perfiles, contribuyen a la hipótesis sobre los efectos que el US tiene sobre la estructura de la molécula de EPS, ya que el hecho de que el tratamiento EPS (3%-20MIN-80A) y EPS (3%-15MIN-80A) exhiban valores de potencial Zeta más negativos que el control, puede deberse a la exposición de un número mayor de grupos ionizables, y en conjunto con los datos observados en FT-IR y DSC, pareciera que estas condiciones de US sí permiten mejorar algunas propiedades tecnofuncionales del EPS S/TRATAR.

7.6 Tensión interfacial dinámica

La reducción de la tensión superficial o interfacial es representativo para moléculas anfifílicas en soluciones acuosas, lo cual puede atribuirse a la composición fisicoquímica (contenido de proteína: carbohidrato), esto quiere decir que las moléculas con actividad superficial tienen dentro de su estructura, fracciones o residuos tanto hidrofílicos como lipofílicos y que le permite tener la capacidad para reducir las fuerzas de cohesión de las fases agua y aceite, permitiendo que la interacción entre éstas se favorezca (Pilotzi, 2015).

En la Figura 9 se observan los perfiles de reducción de tensión interfacial (aceite-agua) para los distintos tratamientos de US y el EPS S/TRATAR. En la Figura 9a y 9b, donde el EPS al 1% se trató con US a 80% de amplitud, se observa que la muestra tratada si bien disminuía la tensión interfacial, la reducción no era menor que la que mostró el control hasta tiempos de contacto superiores a los 75 y 90 min para tiempos de aplicación de US de 15 y 20 min. Estos resultados también demuestran que, para estas condiciones de concentración y amplitud, el tiempo de aplicación de US es importante, ya que bajo estas condiciones tiempos menores mejoran la adsorción del EPS en la interfase y con ello la saturación de la interfase.



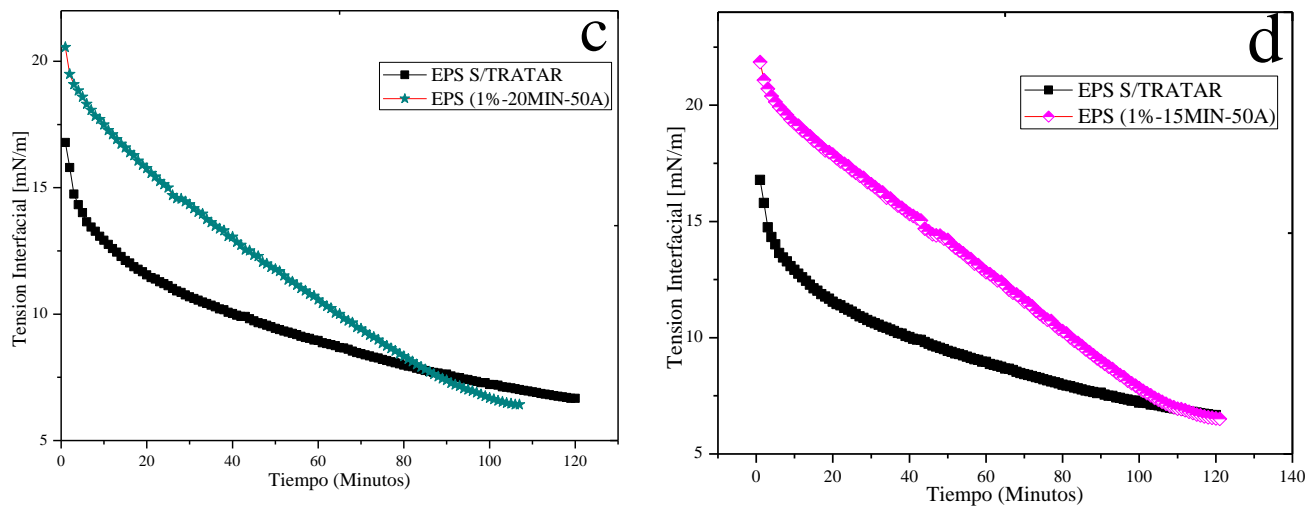


Figura 9. Perfiles de tensión interfacial del EPS S/TRATAR comparadas con los EPS (1%) tratados con US.

Para el caso de la aplicación de US a 50% de amplitud (Figuras 9 c y d), el perfil de reducción de la tensión interfacial fue semejante al de las Figuras 8a y 8b, donde las muestras tratadas no exhiben una reducción mejor que la mostrada por el EPS S/TRATAR, sin embargo, se puede observar que bajo estas condiciones, la aplicación de tiempos cortos de US requiere de tiempos más largos para poder obtener una reducción comparable con la muestra sin tratar. Lo anterior indica que esta capacidad de disminución de la tensión interfacial se ve afectada por las condiciones de US utilizadas para una concentración de 1% de EPS.

Por otra parte, en la Figura 10a se muestran los perfiles de reducción de tensión interfacial del EPS a una concentración del 3%. En este caso, se puede observar que el EPS(3%-20MIN-80A) a pesar de presentar una menor reducción de la tensión interfacial respecto al EPS S/TRATAR, la diferencia que existe en los perfiles es mínima, logrando igualar la reducción alrededor de 40 min, para exhibir valores de tensión interfacial más pequeños que aquellos que exhibe la muestra control, lo cual concuerda con los resultados previos, donde parece ser que esta condición de tratamiento de US mejora las propiedades funcionales y superficiales del EPS de kefirán. Contrario al perfil de la Figura 10b, donde el EPS (3%-15MIN-80A) no se observaron mejoras con la aplicación del tratamiento.

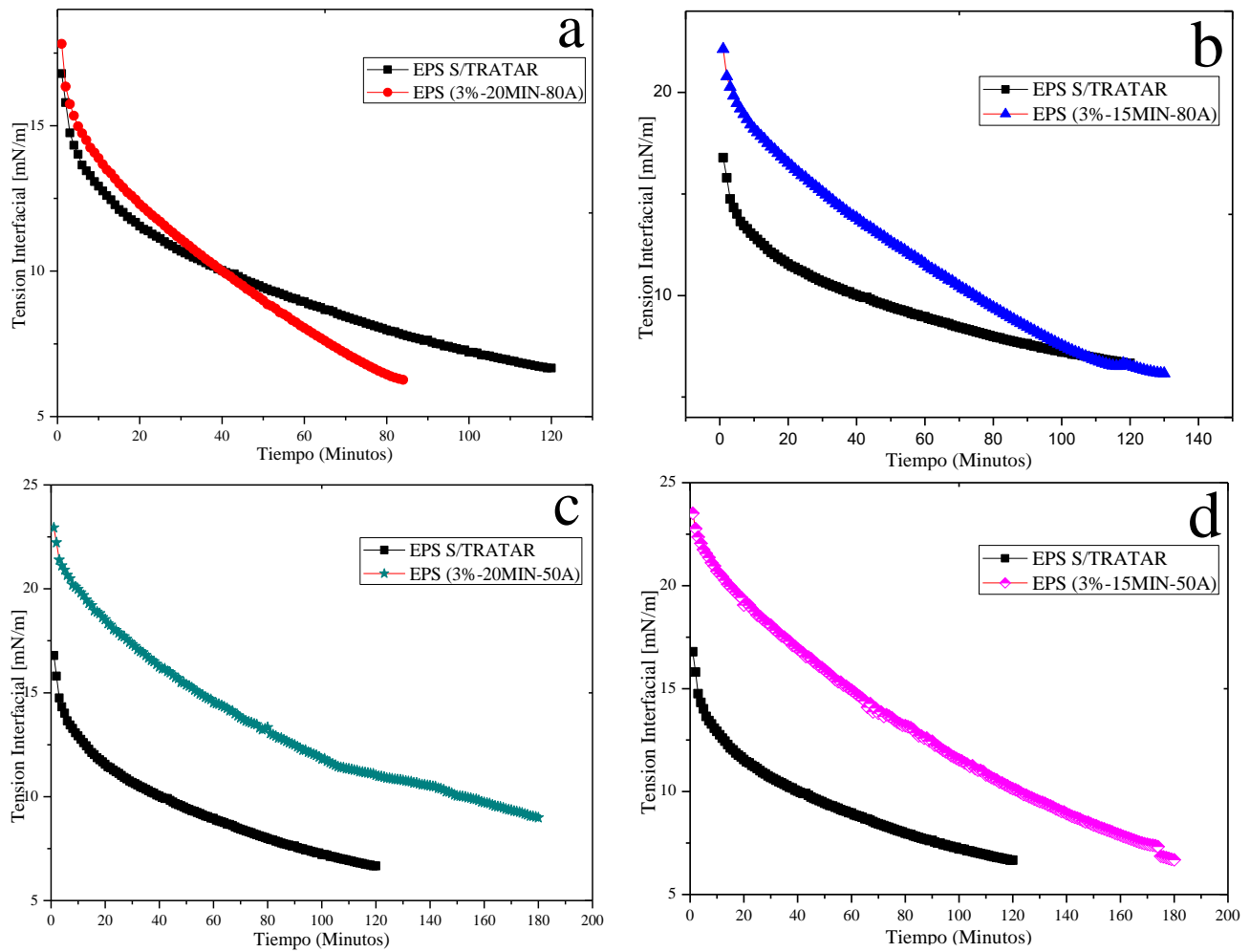


Figura 10. Perfiles de tensión interfacial del EPS S/TRATAR con los EPS tratados (3%) con US.

Para las muestras de EPS al 3% y 50% de amplitud de US, no se encontró ninguna mejora en la actividad superficial, ya que los perfiles correspondientes a ambos tiempos de tratamiento no lograron igualar ni puntual ni parcialmente el perfil de reducción de la muestra control (Figuras 10c-d).

7.7 Formación y caracterización de emulsiones O/W estabilizadas con EPS

Las emulsiones obtenidas fueron observadas en un microscopio óptico para evaluar la morfología de los sistemas dispersos y a través de una técnica basada en la difracción de rayo láser se obtuvo el tamaño de gota promedio (D_{43}).

Los resultados de la morfología de las emulsiones mostraron que todos los sistemas presentaban cierta polidispersidad, debido a que el tamaño de las gotas no era completamente homogéneo, mismo que fue corroborado con la distribución de tamaño de gota.

En la Figura 11 se observan las micrografías de las emulsiones con una magnificación de 100X, la curva de distribución de tamaño de gota (PSD) y el valor del diámetro volumétrico de momento (D_{43}) de las emulsiones frescas ($t=0$ h) estabilizadas con el EPS S/TRATAR y tratado con US para EPS 1%.

De acuerdo a las imágenes el tratamiento de US para EPS 1%, se observa que el tamaño de gota no fue homogéneo, obteniendo una PSD multimodal (lado derecho). A pesar de que la mayoría de las emulsiones presentó cierta heterogeneidad en los tamaños de gota de las emulsiones, los valores del diámetro D_{43} muestran que las emulsiones estabilizadas con EPS tratado con US son significativamente mayores de las de la muestra control, sin importar la amplitud o tiempo de tratamiento.

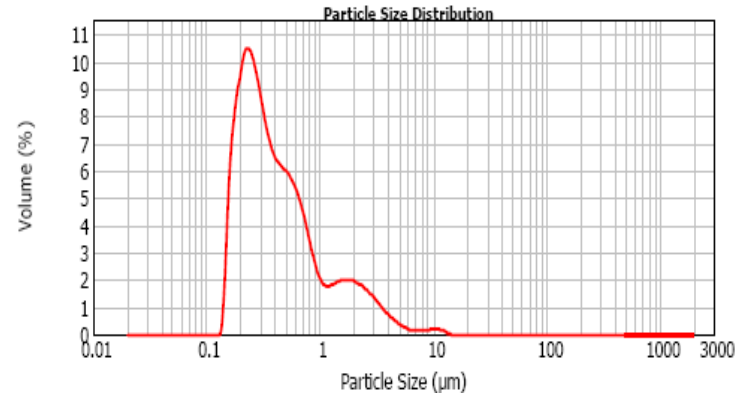
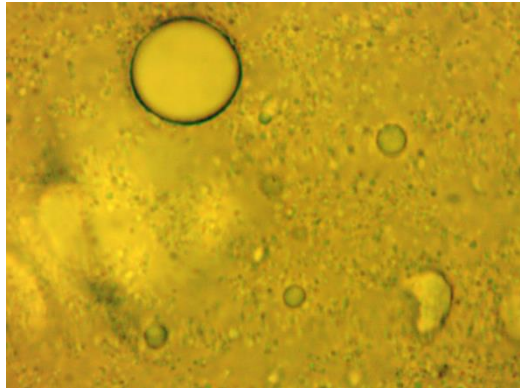
Tratamiento

Micrografía (100X)

PSD

D₄₃ [μm]

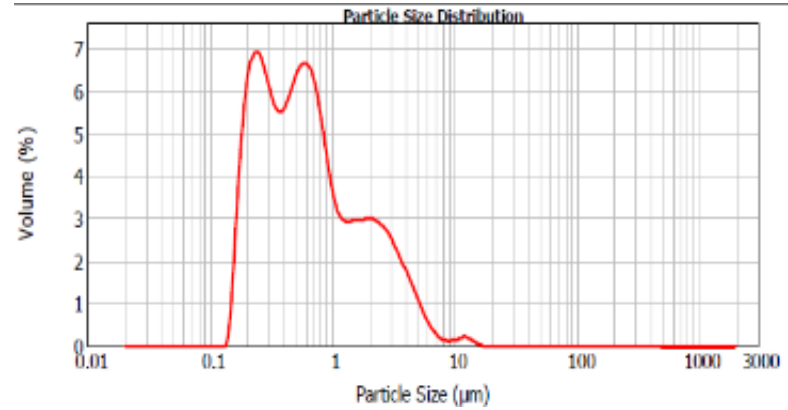
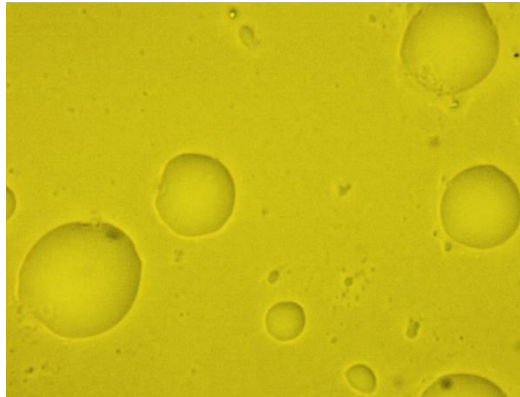
EPS S/TRATAR



0.838±0.098

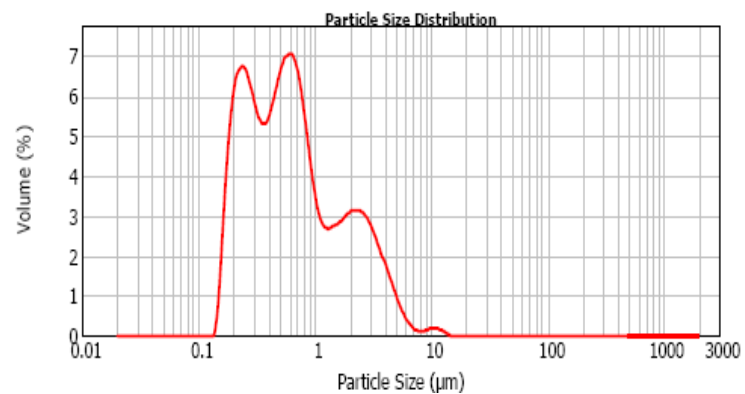
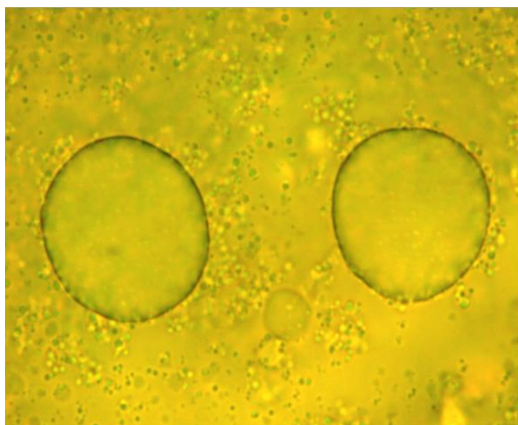
**EPS
(1%-20MIN-80A)**

,



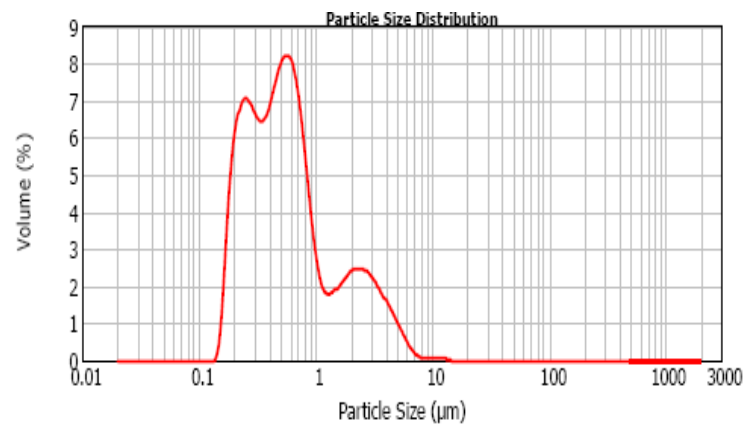
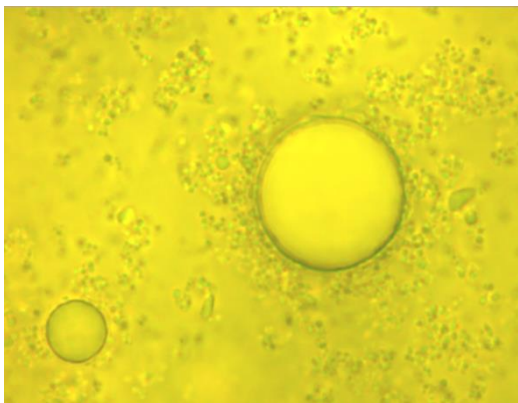
1.094±0.22

**EPS (1%-15MIN-
80A),**



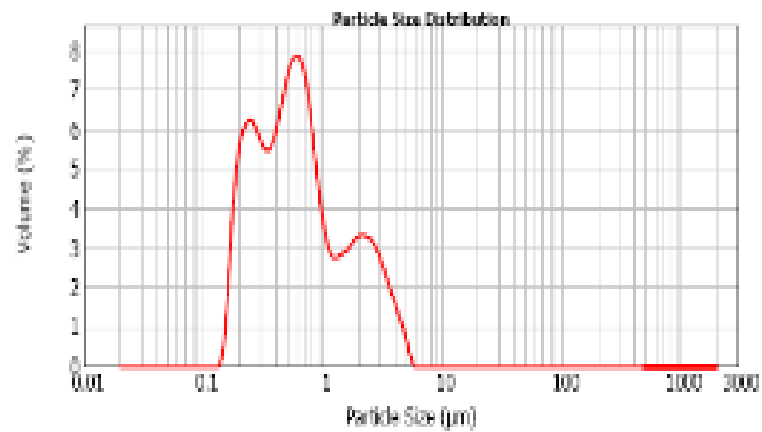
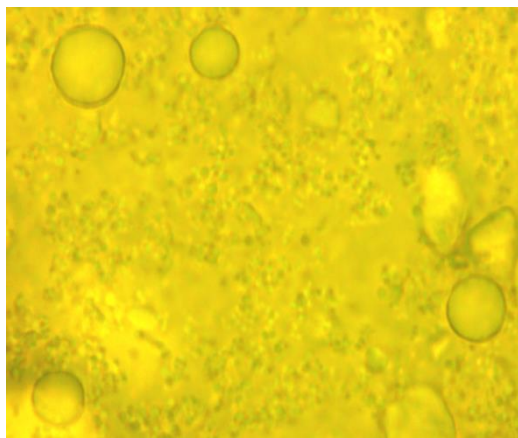
1.074±0.25

**EPS(1%-20MIN-
50A),**



1.064±0.22

**EPS (1%-15MIN-
50A**



1.167±0.25

Figura 11. Morfología, PSD, D43 de las emulsiones O/W estabilizadas con EPS S/TRATAR y tratado con US (EPS 1%)

Para el caso de las emulsiones estabilizadas con EPS (3%) tratado con US, se observa que las gotas son más homogéneas en tamaño, a pesar de que las curvas de PSD siguen mostrando perfiles multimodales y por tanto polidispersos (Figura 12).

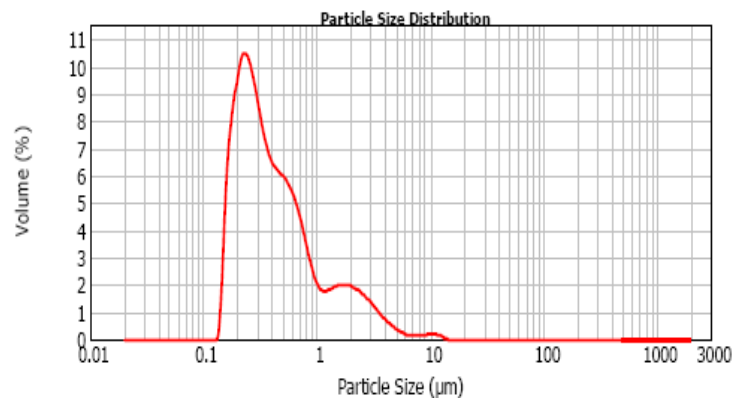
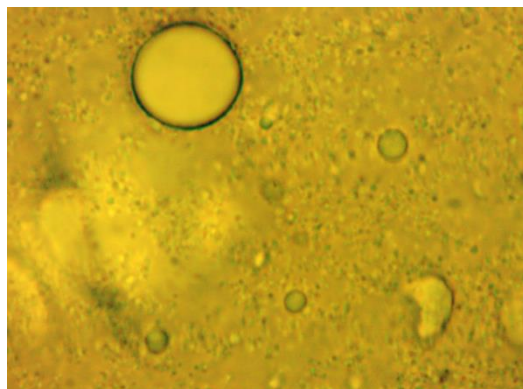
Tratamiento

Micrografía (100X)

PSD

D43 [µm]

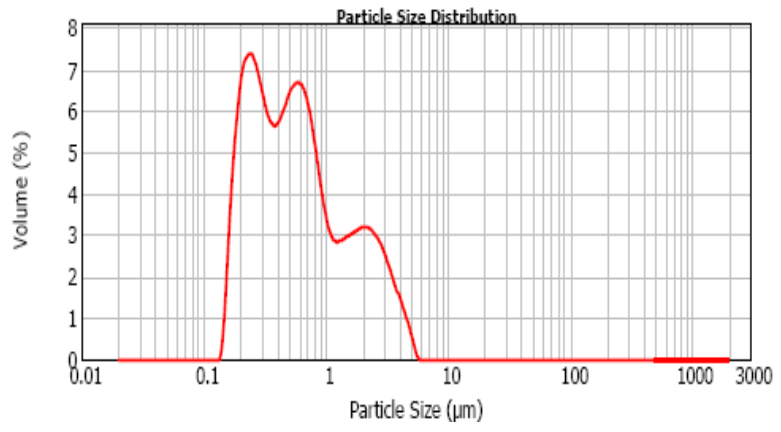
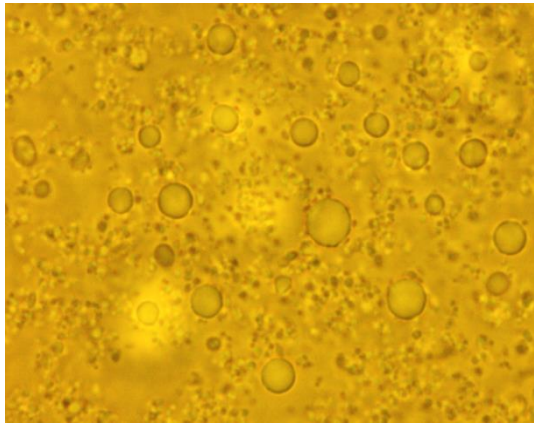
EPS S/TRATAR



0.838±0.098

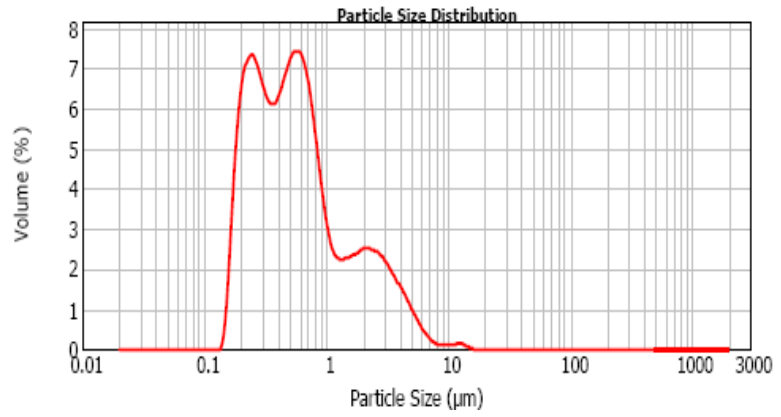
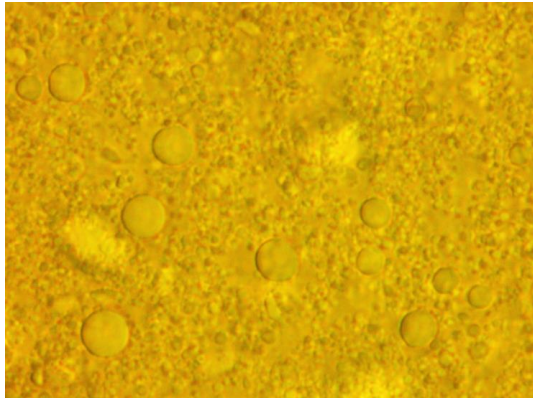
**EPS
(3%-20MIN-80A)**

,



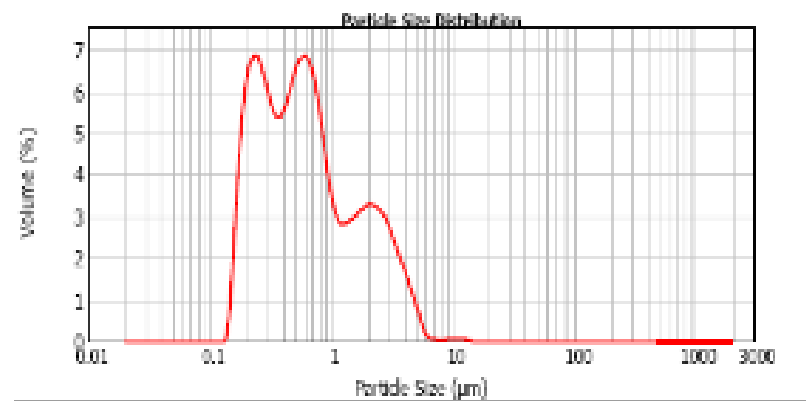
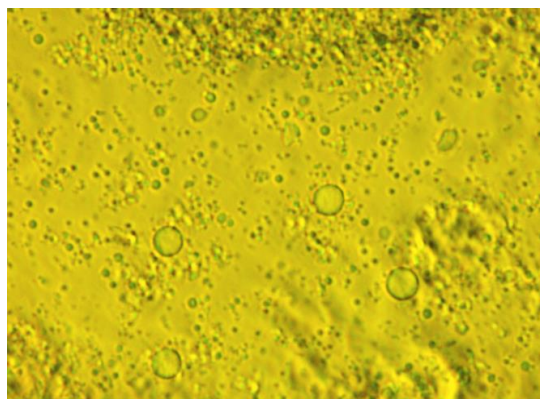
0.944 ± 0.025

**EPS (3%-15MIN-
80A),**



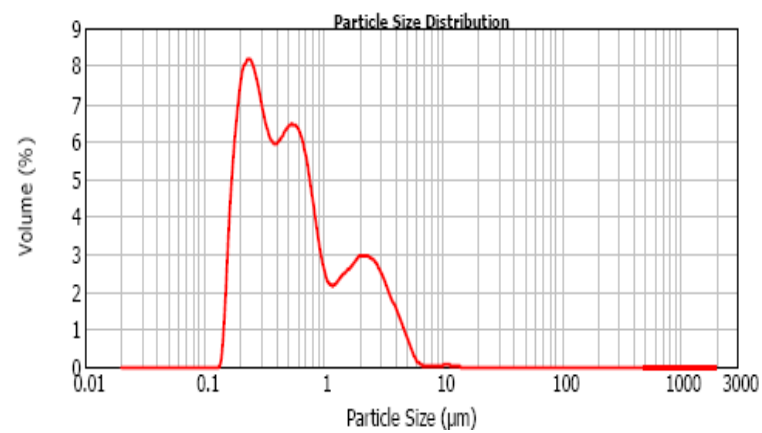
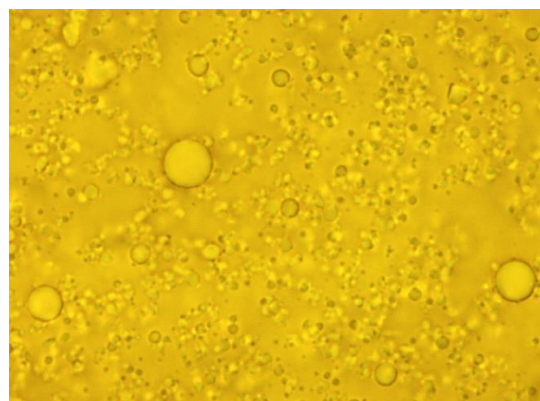
0.973 ± 0.146

**EPS(3%-20MIN-
50A),**



1.012±0.26

**EPS (3%-15MIN-
50A**



0.941±0.19

Figura 12. Morfología, PSD, D43 de las emulsiones O/W estabilizadas con EPS S/TRATAR y tratado con US (EPS 3%).

Las emulsiones formadas de EPS con los diferentes tratamientos y comparándolas con el EPS sin tratamiento presentaron mayor D_{43} , pero menor polidispersidad lo que puede proveer una mayor estabilidad de la emulsión.

7.8 Estabilidad de las emulsiones O/W

El tamaño de partícula es uno de los factores ligados a la funcionalidad de los sistemas dispersos como las emulsiones (Damodaran, 2008), debido a que está relacionada con la estabilidad física de estos sistemas, por lo que esta característica de los sistemas dispersos fue monitoreada durante el almacenamiento para estimar la constante de velocidad de coalescencia y con ello la estabilidad de las emulsiones O/W estabilizadas con los EPS tratados con US.

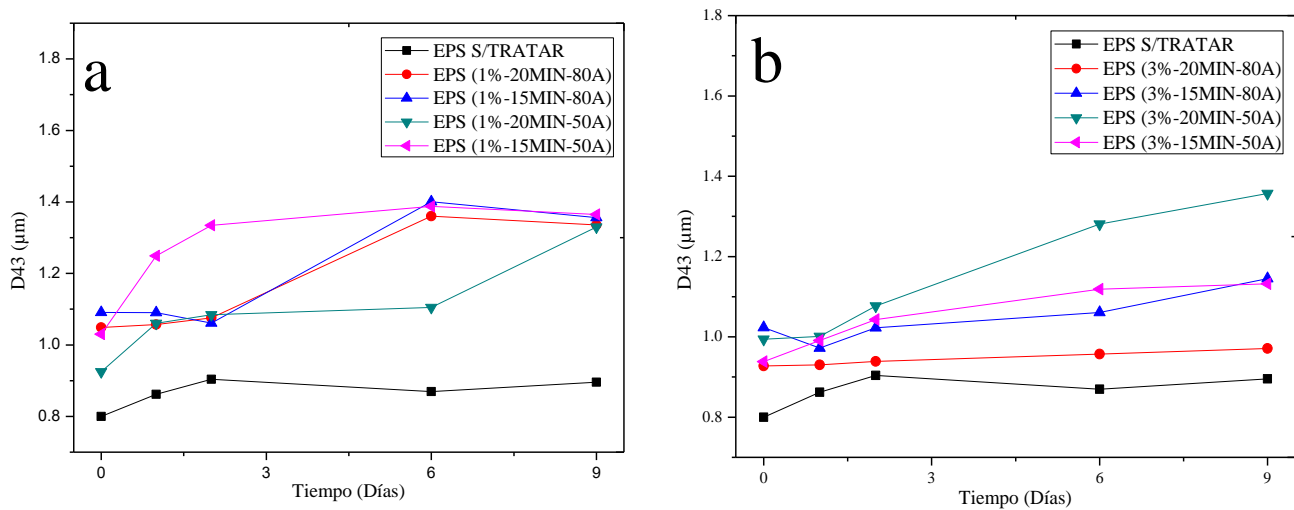


Figura 13. Evaluación de estabilidad de las emulsiones de EPS: a) EPS (1%-20 y 15MIN- 80 y 50A), b) EPS (3%-20 y 15MIN- 80 y 50A).

La evaluación del cambio en el tamaño de gota durante el almacenamiento de las emulsiones mostró cambios al término del almacenamiento que fue el caso de las muestras al 1%, se sabe que un menor cambio en el tamaño de gota indica mayor estabilidad en la emulsión y eso se pudo observar con el EPS (3%-20MIN-80A) comparándola con la muestra sin tratamiento (Figura 13b). La Figura 13 se observa que los demás tratamientos no tuvieron tanta estabilidad en el tiempo de almacenamiento dado que estas

cambiaban constantemente los valores y en el día 9 éstos tuvieron un mayor valor de tamaño lo cual dicho comportamiento puede estar relacionada a la coalescencia de la emulsión.

7.8.1 Cinética de coalescencia

Las emulsiones O/W presentaron morfologías típicas para los sistemas dispersos, con gotas de aceite ligeramente homogéneas y diámetros de gota menores a 5µm mostrados en la Figura 13, por lo tanto, la emulsión se mantuvo ligeramente estable en alguno de los tratamientos durante el tiempo de almacenamiento y de acuerdo a la constante cinética de coalescencia los resultados están en el intervalo de valores para la estabilización de emulsiones (Ruiz-Ramos et al., 2006). En la Tabla 5 se muestran los valores calculados para la constante de velocidad de coalescencia, donde se observa que el tratamiento EPS (3%-20MIN-80A) presenta una constante menor que la obtenida por la muestra control (EPS S/TRATAR), lo cual se refleja en una estabilidad mayor.

Tabla 5. Constantes cinéticas para la coalescencia de las emulsiones formadas con EPS.

Muestra	Tratamiento			k_c (s ⁻¹)
EPS	S/TRATAR			2.41E-10
	1%	80A	20MIN	1.05 x 10 ⁻⁹
			15MIN	5.90 x 10 ⁻¹⁰
		50A	20MIN	2.54 x 10 ⁻⁹
			15MIN	1.45 x 10 ⁻⁹
	3%	80A	20MIN	4.19 x 10⁻¹²
			15MIN	1.58 x 10 ⁻¹⁰
		50A	20MIN	1.02 x 10 ⁻⁹
			15MIN	3.12 x 10 ⁻¹⁰

7.8.2 Estabilidad contra el cremado

La evaluación de estabilidad de las emulsiones contra el cremado se muestra en la Figura 14 para las emulsiones estabilizadas con EPS al 1% y al 3%, junto con sus respectivos tratamientos.

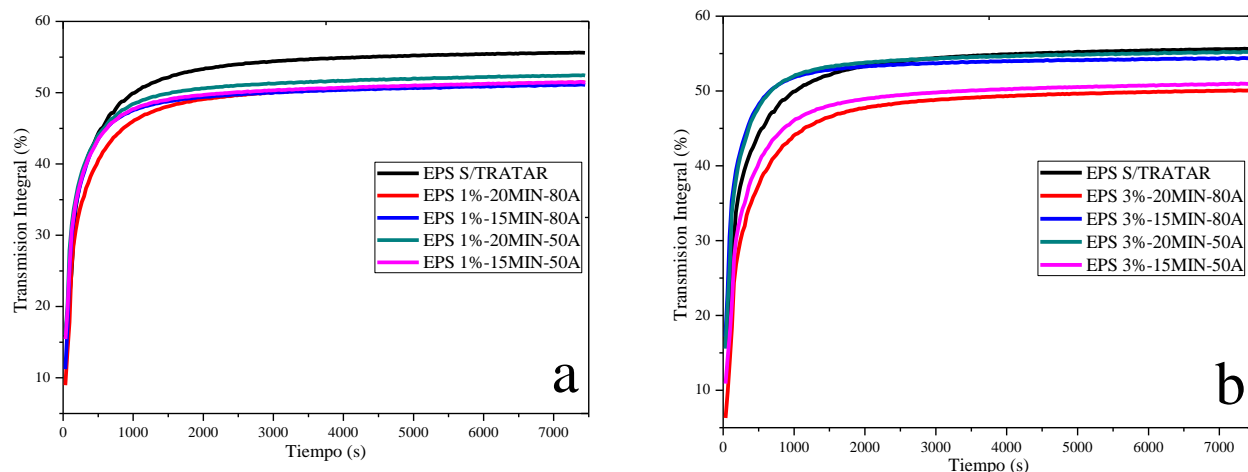


Figura 14. Perfiles de transmisión de luz para la estimación de la velocidad de cremado de las emulsiones estabilizadas con EPS S/TRATAR y las tratadas: a) EPS (1%-20 y 15MIN-80 y 50A), b) EPS (3%-20 y 15MIN-80 y 50A).

La velocidad de cremado fue cuantificada al graficar los perfiles de transmisión integral contra el tiempo de medición para la pendiente de la curva resultante (Tabla 7) de acuerdo con lo reportado por Cuevas-Bernardino et al., (2019).

De acuerdo a los resultados en los perfiles se observó que algunos de los tratamientos si mejoraron ligeramente la estabilidad de las emulsiones como es el caso del EPS (3%-20MIN-80A), que fue la que mostro mayor resistencia al cremado en comparación con los demás tratamientos, la constante de cremado para este tratamiento fue de 3.65×10^{-2} , siendo la más baja de todos los tratamientos.

Tabla 6. Valores de las constantes cinéticas de estabilidad contra el cremado de las emulsiones estabilizadas con EPS (sin tratamientos y las tratadas).

Muestra	Tratamiento			k_{Crem} [s ⁻¹]
EPS	S/TRATAR			4.46×10^{-2}
	1%	80A	20MIN	4.40×10^{-2}
			15MIN	4.63×10^{-2}
		50A	20MIN	4.62×10^{-2}
			15MIN	4.71×10^{-2}

	3%	80A	20MIN	3.65×10^{-2}
			15MIN	4.96×10^{-2}
		50A	20MIN	5.07×10^{-2}
			15MIN	4.26×10^{-2}

7.8.3 Comportamiento reológico

De forma general, las emulsiones se comportan reológicamente fluidos pseudoplásticos, es decir que se caracterizan por una disminución de la viscosidad a medida que el cizallamiento aumenta. Desde el punto de vista físico esto significa que la resistencia a fluir disminuye cuando la velocidad de arrastre aumenta. Este comportamiento se ha relacionado con la forma en que se orientan las heterogeneidades contenidas en fluidos complejos como dispersiones y emulsiones ((Rojas, 2012; McClements, 2006). En la Figura 15 se muestran los perfiles de las curvas de flujo obtenidas para las emulsiones estabilizadas con el EPS S/TRATAR y los tratamientos, respectivamente.

Como se mencionó anteriormente, en términos de las curvas de flujo las emulsiones estabilizadas con ambas concentraciones (1% y 3% de concentración) presentan un comportamiento no newtoniano de tipo pseudoplástico, donde puede apreciarse que la viscosidad del sistema decrece al aumentar la velocidad de corte o cizalla.

En la Figura 15 se puede observar, que tanto los EPS tratados con el EPS sin tratamiento tuvieron el mismo comportamiento, los resultados mostraron que no hubo cambios significativos en las muestras tratadas en comparación con el EPS S/TRATAR.

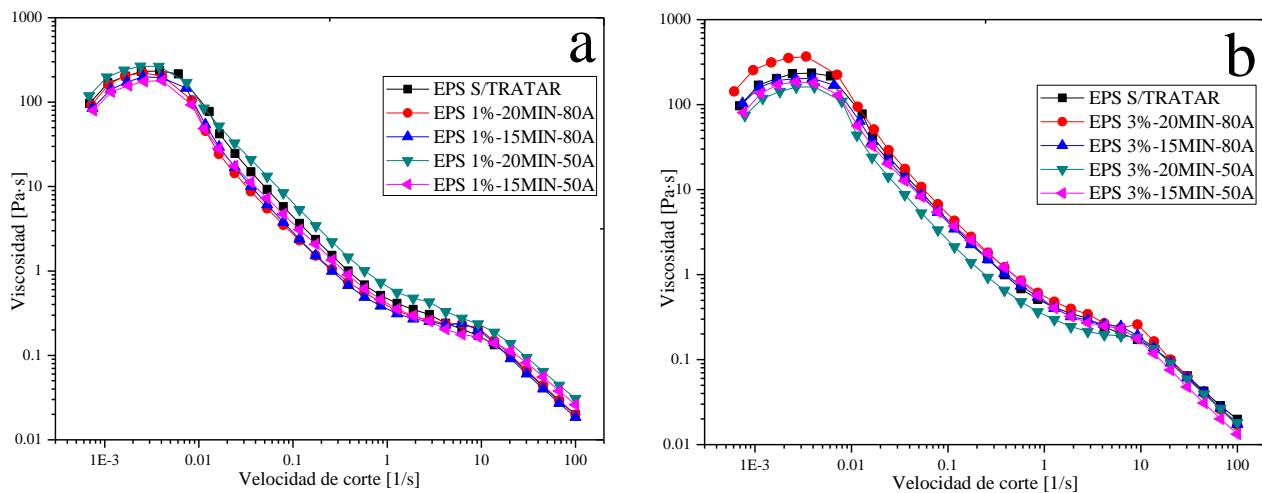


Figura 15. Curvas de flujo para emulsiones O/W estabilizadas con EPS S/TRATAR y las tratadas: a) EPS (1%-20 y 15MIN-80 y 50A), b) EPS (3%-20 y 15MIN-80 y 50A).

8 Conclusiones

- ◆ La aplicación de altas presiones al EPS nativo induce cambios estructurales las cuales se pueden identificar en las pruebas de FT-IR, los perfiles de los diferentes tratamientos mostraron modificaciones en la estructura al presentarse cambios de frecuencia en las bandas correspondientes a las regiones; $1200-1660\text{ cm}^{-1}$ que son características asimétricas y simétricas de estiramiento de enlaces C-O y para C-O-C y C-O de grupos alcohol en la región de $1000-1200\text{ cm}^{-1}$.
- ◆ De la misma manera se observaron cambios de comportamiento en las pruebas calorimétricas y tensión interfacial dinámica de los tratamientos en comparación con el EPS S/TRATAR.
- ◆ De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que el EPS obtenido a partir de la fermentación de leche mediante el uso de gránulos de kéfir, exhibe actividad superficial adecuada para formar y estabilizar emulsiones de tipo O/W.
- ◆ La aplicación de US si mejora la capacidad emulsificante del EPS, siendo el EPS (3%-20MIN-80A) la que mostró mejores resultados en comparación con el exopolisacárido sin tratamiento, tanto en las pruebas superficiales como en la caracterización de las emulsiones. Las condiciones del tratamiento a la que fue sometida el EPS influyeron considerablemente en los resultados obtenidos.

9 Bibliografía

- Ahmed, Z. Y., Wang, Y., Anjum, N., Ahmad, A. S.T. Khan, S.T. (2013). Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir - Part II. *Food Hydrocolloids*, 30 (1), pp. 343-350.
- Arslan S. (2014). A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. *CyTA - Journal of Food*. 13(3), pp. 340–345.
- Badui, S. (2006). Química de los alimentos. *PEARSON. México*. pp. 187-198.
- Bensmira M., Nsabimana C., Jiang B. (2010) Effects of fermentation conditions and homogenization pressure on the rheological properties of Kefir. *Journal of Food Science and Technology*. 43, pp. 1180-1184.

- Blandón, L.M., Nosedá, M.D., Islan, G.A., Castro, G.R., de Melo Pereira, G.V., Thomaz-Soccol, V., Soccol, C.R. (2018). Optimization of culture conditions for kefir production in whey: The structural and biocidal properties of the resulting polysaccharide. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 16, pp. 14-21.
- Botelho, P. S., Maciel, M. I., A Bueno, L., Marques, M. F., Marques, D. N., Sarmiento, T. M. (2014). Characterisation of a New Exopolysaccharide Obtained From of Fermented Kefir Grains in Soymilk. *Carbohydrate Polymers*, 107, pp. 1-6. [doi: 10.1016/j.carbpol.2014.02.036](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.036).
- Boulder, J.F. (1993). Leche y productos lácteos: vaca-oveja-cabra. *Productos frescos Transformación y tecnologías*. Editorial Acribia. 2.
- Camino, A., Pérez, O. E., Pilosof, A. M. (2009). Molecular and functional modification of hydroxypropylmethylcellulose by high-intensity ultrasound. *Food Hydrocolloids*. 23 (4), pp. 1089-1095. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X08002130?casa_token=To-rehe9b7kgAAAAA:XnPDvDWf5DydNVMjezySzquhAzVXWqxjkHey_9AChqz5_rhAOiUNFYp6PPglj-hr3Nynb7YkJfeD.
- Cuevas-Bernardino, J. C., Pérez-Alonso, C., Nieto-Ángel, R., & Aguirre-Mandujano, E. (2019). Microencapsulation of grape seed oil by spray drying using whey protein and hawthorn pectin. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 11(2). [doi: 10.5154/r.inagbi.2019.01.005](https://doi.org/10.5154/r.inagbi.2019.01.005).
- Damodaran, S. (2008). Amino acids, Peptides and Proteins. *Fennema's Food Chemistry*, 4 (5).
- Damodaran, S. (1997). Protein-stabilized foams and emulsions. *Food Proteins and Their Applications*. pp. 57-110.
- De Antoni, G.L. (2005). Aspectos tecnológicos y probióticos de productos fermentados con microorganismos aislados de gránulos de kéfir. *X Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de alimentos*. Buenos Aires, Argentina.
- De Oliveira Leite, A.M., Miguel, M.A.C., Peixoto, R.S., Rosado, A.S., Silva, J.T., Paschoalin flosi, V.M. (2013). Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a

- natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44 (2), pp. 341-349. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200001>.
- Duboc, P., Mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11(9), pp. 759–768. [doi:10.1016/S0958-6946\(01\)00119-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00119-4).
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Journal of Cleaner Production*, 190, pp. 315-329. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.04.149>.
- Egan, H.; Kirk, R. y Sawyer R. (1993). Análisis Químico de Alimentos de Pearson (5ª reimpresión). *México: Editorial Continental S.A. de C.V.*
- Exarhopoulos, S., Raphaelides, S.N., Kontominas, M.G. (2018). Flow behavior studies of kefir systems. *Food Hydrocolloids*, 79, pp. 282-290.
- Farnworth, E.R. (2003). Handbook of Fermented Functional Foods. *Functional foods and nutraceuticals series. CRC Press.*
- Farnworth, E.R. (2005). Kefir – a complex probiotic. Food Science and Technology – Bulletin. *Food research and development center, agricultura and agricultura and agri-food Canada*, 2, pp. 1-17.
- Feng, M., Chen, X., Li, C. Nurgul, R., Dong M. (2012). Isolation and Identification of an Exopolysaccharide-Producing Lactic Acid Bacterium Strain from Chinese Paocai and Biosorption of Pb (II) by Its Exopolysaccharide. *Journal of Food Science*, 77 (6), pp. T111-T117.
- García Fontán, M., Martínez, S., Franco, I., Carballo, J. (2006) Microbiological and chemical changes during the manufacture of Kefir made from cows' milk, using a commercial starter culture. *International Dairy Journal*, 16, pp. 762-767.
- García, S. Hernández, R. (2015). Fermentación de leche descremada UHT a partir de gránulos de kéfir. *Universidad de El Salvador. Facultad de Química y Farmacia.*
- Ghasemlou M., Khodaiyan F., Oromiehie A., Yarmand M.S. (2011). Development and characterisation of a new biodegradable edible film made from kefiran, an

- exopolysaccharide obtained from kefir grains. *Food Chemistry*, 127 (4), pp. 1496-1502.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.003>.
- Ghasemlou, M., Khodaiyan, F., Jahanbin, K., Gharibzahedi, S.M.T., Taheri, S. (2012). Structural investigation and response surface optimisation for improvement of kefir production yield from a low-cost culture medium. *Food Chemistry*, 133 (2), pp. 383-389.
- Gregorova, A. (2013). Application of Differential Scanning Calorimetry to the Characterization of Biopolymers. In: *Applications of Calorimetry in a Wide Context – Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry*. pp. 2-20.
<https://doi.org/dx.doi.org/10.5772/53822>.
- Gregorova, A., Sedlarik, V., Pastorek, M., Jachandra, H., Stelzer, F. (2011). Effect of compatibilizing agent on the properties of highly crystalline composites based on poly (lactic acid) and wood flour and/or mica. *Journal of Polymers and the Environment*, 19(2), pp. 372-381.
- Guzel, Z., kok-tas, T., Filiz, E., Seydim, A.C. (2011) Effect of different growth condition on biomass increase in kéfir grains. *Journal dairy science American Dairy Science Association. Department of Food Engineering, Engineering Faculty, Suleyman Demire University*. pp. 1239-1243.
- Jiang Z., Sontag-Strohm, T., Salovaara, H., Sibakov, J., Kanerva, P., Loponen, J. (2015). Oat protein solubility and emulsion properties improved by enzymatic deamidation. *Journal of Cereal Science*, 64, pp. 126-132.
- Kirk, R.S., Sawyer, R., Egan, H. (1996). *Composición y Análisis de Alimentos de Pearson. Editorial CECSA, 2.*
- Laws, Y., Gu, Y., y Marshall, V. (2001). Biosynthesis, characterization, and desing of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*, 19, pp. 597-625.
- Leite A., Miguel M., Peixoto R., Rosado A., Silva J., Paschoalin V. (2013) Microbial, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44 (2), pp. 341-349.

- Li, S.P., Tsim, K.W.K. (2004). The biological and pharmacological properties of *Cordyceps sinensis*, a traditional Chinese medicine that has broad clinical applications. *Herbal and Traditional Medicine: Molecular Aspects of Health*, pp. 657-683.
- Lida, Y., Tuziuti, T., Yasui, K., Towata, A., Kozuka, T. (2008). Control of viscosity in starch and polysaccharide solutions with ultrasound after gelatinization. *Innov. Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, pp. 140-146.
- Lii, C.Y., Chen, C.H., Yeh, A.I., Lai, V.M.F. (1999). Preliminary study on the degradation kinetics of agarose and carrageenans by ultrasound. *Food Hydrocolloid*, 13, pp. 477-481.
- Liu, H., Bao, J., Du, Y., Zhou, X., Kennedy, J.F. (2006). Effect of ultrasonic treatment on the biochemophysical properties of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 64, pp. 553-559.
- Lopitz-Otsoa F., Rementeria A., Elguezabal N., Garaizar (2006) Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23, pp. 67-74.
- Lorimer, J.P., Mason, T.J., Cuthbert, T.C., Brookfield, E.A. (1995). Effect of ultrasound on the degradation of aqueous native dextran. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2, pp. 55-57.
- Maeda, H., Zhu, X., Omura, K., Suzuki, S., Kitamura, S. (2004). Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. *BioFactors*, 22 (1-4), pp. 197-200.
- Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*, 87, pp. 206-210.
- Martínez Díaz I.M. (2019). Expolisacáridos de kéfir como agentes emulsionantes de moléculas biológicamente activas. *Tesis de especialización en Biotecnología*, UAMI.
- Martínez, G. (2002). Estudio de los cambios reológicos y morfológicos de emulsiones múltiples del tipo agua-aceite-agua (W/O/W) en el tiempo. *Universidad Autónoma Metropolitana*.
- Mason, T. J., Riera, E., Vercet, A., & Lopez-Buesa, P. (2005). Application of ultrasound. In *Emerging technologies for food processing*. Academic Press, pp. 323-351.

- McClements, D.J. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science & Technology*, 6 (9), pp. 293-299, [doi:10.1016/S0924-2244\(00\)89139-6](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)89139-6).
- McClements D.J. (2016). Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques. 3rd Edition. CRC Press.
- Micheli L, Uccelletti D, Palleschi C, Crescenzi, V. (1999). Isolation and characterisation of a ropy lactobacillus strain producing the exopolysaccharide quefiran. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, pp. 69–74.
- Mnif, I. & Ghribi, D. (2015) High molecular weight bioemulsifiers, main properties and potential environmental and biomedical applications. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 31, pp. 691–706
- Moradi Z., Kalanpour N. (2019). Kefiran, a branched polysaccharide: Preparation, properties and applications: A review. *Carbohydrate Polymers*, 223, pp. 100-115.
- Murillo, M.M.M., Pedroza, I.R., Lobato, C. C., Martínez, F. A., Vernon, C. E. J. (2011). Designing W1/O/W2 double emulsions stabilized by protein polysaccharide complexes for producing edible films: Rheological, mechanical and water vapour properties. *Food Hydrocolloids*, 25, pp. 577-585.
- Naghbizadeh, M., Adabi, M. (2014). Evaluation of effective electrospinning parameters controlling gelatin nanofibers diameter via modelling artificial neural networks. *Fibers and Polymers*, 15 (4), pp. 767-777.
- Norma de Codex para leches fermentadas CODEX STAN 243-2003. Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/.../CXS_243s.pdf.
- O'Brien, W.D. (2007). Ultrasound-biophysics mechanisms. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 93 (1–3), pp. 212-255, [doi:10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.010](https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.010).
- Otles S., Cagindi O. (2003) Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2, pp. 54-59.

- Parra Huertas, R.A. (2010). Bacterias Acidoláticas, papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 8, pp. 96-105.
- Patel S., Majumder A., Goyal A. (2009). Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *Indian Journal of Microbiology*, pp. 2-11.
- Petit A-C, Noiret N, Guezennec J., et al. (2007) Ultrasonic depolymerisation of an exopolysaccharide produced by a bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14, pp. 107–112.
- Piermaría, J., Bengoechea, C., Abraham, A.G., Guerrero, A. (2016). Shear and extensional properties of kefiran. *Carbohydrate Polymers*, 152, pp. 97-104.
- Piermaria, J.A., Pinotti, A., Garcia, M.A., Abraham, A.G. (2009). Films based on kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization. *Food Hydrocolloids*, 23 (3), pp. 684-690.
- Pilotzi, A. (2015). Comportamiento de la tensión superficial en la interfase agua-aceite y su influencia sobre la estabilidad de emulsiones. *Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*.
- Prado, M., Blandón, L., Vandenberghe, L., Rodrigues, C., Castro, G., Thomaz-Soccol, V., Soccol, C. (2015). Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in Microbiology*. 6, 1177.
- Prasanna, P., Bell, A., Grandison, A., Charalampopoulos, D. (2012). Emulsifying, rheological and physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CCUG 52486 and *Bifidobacterium infantis* NCIMB 702205. *Carbohydrate Polymers*, 90, pp. 533– 540.
- Rimada, P.S., Abraham, A.G. (2006). Kefiran improves rheological properties of glucono- δ -lactone induced skim milk gels. *International Dairy Journal*, 16 (1), pp. 33-39.
- Rodrigues, K. L., Caputo, L. R. G., Carvalho, J. C. T., Evangelista, J., & Schneedorf, J. M. (2005). Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. *International*

- Rodríguez, J. (2003). Review Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 80, pp. 101-116.
- Rodríguez, M. (2002). Manual técnico de derivados lácteos. *Bogotá: Universidad Nacional Abierta y a Distancia*, 3, pp. 39-43
- Roman-Guerrero, A., Orozco-Villafuerte, J., Pérez-Orozco, J., Cruz-Sosa, F., Jiménez-Alvarado, R., Vernon-Carter, E., (2009). Application and evaluation of mesquite gum and its fractions as interfacial film formers and emulsifiers of orange peel-oil. *Food Hydrocolloids*, 23, pp. 708-713.
- Ruíz-Ramos, J.O., Pérez-Orozco, J.P., Báez-González, J.G., Bósquez-Molina, E., Pérez-Alonso, C., Vernon-Carter, E.J. (2006). Interrelationship between the viscoelastic properties and effective moisture diffusivity of emulsions with the water vapor permeability of edible films stabilized by mesquite gum–chitosan complexes. *Carbohydrate Polymers*, 64, pp.355–363.
- Sanz Y. Collado M.C. Dalmau J. (2003). Probioticos: criterios de calidad y orientaciones para la consumo. *Acta pediátrica Española*. Vol. 16. Núm. 9.
- Serafini, F., Turrone, F., Ruas-Madiedo, P., Lugli, G.A., Milani, C., Duranti, S., Ventura, M. (2014). Kefir fermented milk and kefiran promote growth of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 and modulate its gene expression. *International Journal of Food Microbiology*, 178, pp. 50-59.
- Shahabi-Ghahfarrokhi, F., Khodaiyan, M., Mousavi, H., Yousefi. (2015). Effect of γ -irradiation on the physical and mechanical properties of kefiran biopolymer film. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, pp. 343-350.
- Sherman, P. (1969). Rheology of emulsions. *Emulsion science*. *Academic Press*, pp. 237-243.
- Sreenivasan, R., Ghosh, S., Abraham, E.T. (2010). Preparation and characterization of guar gum nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, pp. 267-269.

- Soleimani Fard, M., Alami, M., Sadeghi Mahoonak, A., Omidnejad, M., Rahimi, M. (2017). Effect of kefir on mixolab thermomechanical properties of weak wheat dough. *Journal of Nutritional Health & Food Engineering*, 6 (6), pp. 174-178.
- Suresh Kumar A., Mody K., Jha B. (2008). Bacterial exopolysaccharides a perception. *Journal of Basic Microbiology*, 47, pp. 103-117.
- Szewczuk-Karpisz, K., Wiśniewska, M., Pac, M., Choma, A., Komanięcka, I. (2014). Sinorhizobium meliloti 1021 Exopolysaccharide as a Flocculant Improving Chromium (III) Oxide Removal from Aqueous Solutions. *Water Air Soil Pollut.* [doi:10.1007/s11270-014-2052-4](https://doi.org/10.1007/s11270-014-2052-4).
- Tamine A. Y. (2006). Production of Kefir, Koumiss and Other Related Products. In: Tamime, A. Y. (ed.), *Fermented Milk Blackwell Science Ltd*, Oxford, UK, pp.174-216.
- Tang, C. Shen, L. (2015). Dynamic adsorption and dilatational properties of BSA at oil/water interface: Role of conformational flexibility. *Food Hydrocolloids*, 43, pp. 388-399.
- Vaclavik V.A., Christian E.W. (2014). Food Emulsions in Food. *Essentials of Food Science*, 4, pp. 263-268. [doi: 10.1007/978-1-4614-9138-5](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9138-5).
- Walstra, P. (1987). Physical principles of emulsion science. *Food Structure and Behaviour*, pp. 87-106.
- Wang, Z., Cheung, Y., Leung, P., Wu, J. (2010). Ultrasonic treatment for improved solution properties of a high-molecular weight exopolysaccharide produced by a medicinal fungus. *Bioresource Technology*, 101 (14), pp. 5517-5522. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410002208?casa_token=nofPEvnZd6oAAAAA:aZcqm1dnq27JEWf8GwA8NSIivTcT0Up72nuPzkmkgIwrgauNcJrg4QlcBrbHDyUbkLorUyqN17M.
- Wang Y., Li C., Liu P., Ahmed Z., Xiao P., Bai X. (2010). Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 895-903.

- Wong, S. S., Kasapis, S., Tan, Y. M. (2009). Bacterial and plant cellulose modification using ultrasound irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 77 (2), pp. 280-287. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.12.038>
- Zajsek, K. Kolar, M., Goršek, A. (2011). “Characterisation of the exopolysaccharide kefiran produced by lactic acid bacteria entrapped within natural kefir grains”. *International Journal of Dairy Technology*, 64, pp. 544-548.
- Zavala J. (2005). Aspectos nutricionales y tecnológicos de la leche. *Dirección General de Promoción Agraria Ministerio de Agricultura. Dirección de Crianzas*.
- Zdzislaw, E. (2001). Chemical and Functional Properties of Food Proteins. *CRC PRESS LLC. E. U.* pp. 57-101.
- Zetasizer Nano application note MRK528-01. Molecular weight measurements with the Zetasizer Nano system. Malvern Instruments, Ltd., 1-7. <https://pdfs.semanticscholar.org/1d8c/941489a31b040b2b1cc9779e91c6c7b4136d.pdf>.
- Zhang T., Zhang C., Li S., Zhang Y., Yang Z. (2011). Growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST1 in skim milk. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, pp. 1470-1478. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822011000400033>
- Zhao, J. Wei, T. Wei, Z. Yuan, F. Gao, Y. (2015). Influence of soybean soluble polysaccharides and beet pectin on the physicochemical properties of lactoferrin-coated orange oil emulsion. *Food Hydrocolloids*, 44, pp. 443-452.
- Zolfi, M., Khodaiyan, F., Mousavi, M., Hashemi, M. (2015). Characterization of the new biodegradable WPI/clay nanocomposite films based on kefiran exopolysaccharide. *Journal of Food Science and Technology*, 52 (6), pp. 3485-3493.

10 Anexos



OBTENCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS DE KEFIRANO Y EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES SUPERFICIALES COMO AGENTES ESTABILIZANTES DE EMULSIONES DE ACEITE-EN-AGUA

Julia De Los Santos-Trinidad, Isabel Marlene Martínez-Díaz, Sergio Andrés Alatorre-Santamaría, Angélica Román-Guerrero*
Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Av. San Rafael Atlixco No. 186. Col. Vicentina, Iztapalapa, CDMX, 09340, México. arogue@xanum.uam.mx

Resumen

En la actualidad el estudio de exopolisacáridos (EPS) microbianos ha comenzado a tener mayor auge debido a que éstos presentan semejanzas con otros polisacáridos que son ampliamente utilizados en la industria alimentaria. En este sentido, el objetivo de este trabajo consistió en caracterizar fisicoquímicamente los EPS de kefirano mediante calorimetría diferencial de barrido y FTIR, así como evaluar su potencial como agente estabilizante de emulsiones tipo aceite-en-agua (O/W) a través de su actividad superficial. Los resultados mostraron que los aislados de EPS presentan grupos funcionales característicos de los polisacáridos, además se encontró que los EPS presentan actividad superficial al reducir la tensión en la interfase aceite-agua. Asimismo, la formulación y estabilización de emulsiones O/W con EPS resultó en sistemas dispersos con tamaños de gota alrededor de $5.0 \pm 0.5 \mu\text{m}$ con morfologías esféricas y homogéneas. Lo anterior sugiere que estas actividades funcionales pueden estar relacionadas con la composición química de los EPS en términos de la relación Proteína:Carbohidrato, que permite obtener moléculas anfifílicas capaces de adsorberse en interfases y formar membranas interfaciales alrededor de las gotas de aceite.

Introducción

Los EPS son conocidos como polisacáridos extracelulares que pueden ser producidos por diversos microorganismos. Estas moléculas generalmente se asocian con las superficies celulares en la forma de cápsulas o como secreciones al medio como materiales viscoelásticos. Los EPS tienen cadenas lineales o ramificadas constituidas de monosacáridos como glucosa, galactosa, manosa, ácido glucurónico o sus derivados [1] El amplio espectro de aplicaciones para los EPS abarca desde la salud humana, a la producción de alimentos y forrajes, a la industria química y las tecnologías ambientales (por ejemplo, biorremediación y fitorremediación). Los EPS se han utilizado como agentes gelificantes y estabilizantes de suspensiones y formadores de películas [2]. Donde estas propiedades funcionales dependen en gran medida de su estructura química y su actividad interfacial.

Materiales y métodos

Los EPS fueron obtenidos a partir de cultivos de gránulos de *kefir* en leche entera para la obtención de leche fermentada (LF); la purificación se realizó de acuerdo con el método descrito por Zajsek et al. [3]. Los EPS obtenidos fueron liofilizados y almacenados en refrigeración hasta su uso. Los EPS se caracterizaron en función del rendimiento, propiedades térmicas en un DSC (25-200 °C con una rampa de 5°C/min), espectroscopia FTIR, mientras que la actividad superficial de los EPS se determinó mediante la evaluación tensión interfacial dinámica en un tensiómetro de gota pendiente OCA-20. Las emulsiones O/W se produjeron utilizando una fracción másica de fase dispersa del 10% ($\phi=0.1$), cuya composición consistió en aceite canola (O) el cual fue adicionada por goteo en el EPS y homogenizado a 11,400 rpm. Las emulsiones fueron caracterizadas en función de su morfología y distribución de tamaño de gota (D_{4,3}).

Resultados

Los EPS presentaron un rendimiento de 1 gEPS/500 mL LF. La Figura 1a muestra el espectro de IR donde se observan señales características de los grupos alcohol de los carbohidratos, C-O-C y C-O en la región de 1000-1200 cm⁻¹ y una banda intensa en 1030 cm⁻¹ característica de los compuestos polisacáridos [4]. El análisis calorimétrico mostró que el EPS presenta cambios estructurales a una temperatura de 105°C, que posiblemente se relacione con una temperatura de transición vítrea. En la Figura 1b se muestra el perfil obtenido de la determinación de tensión interfacial, donde se puede observar la reducción de la tensión interfacial, lo cual puede atribuirse a la composición fisicoquímica (relación contenido proteína:carbohidrato) y capacidad del EPS para reducir las fuerzas de cohesión de las fases agua y aceite, permitiendo que la interacción entre éstas se favorezca [5].

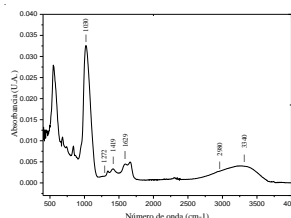


Figura 1a. Espectros de infrarrojo (FTIR) de EPS.

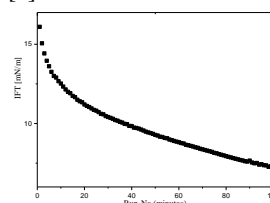


Figura 1b. Perfil de tensión interfacial de EPS

Las emulsiones O/W presentaron morfologías típicas para los sistemas dispersos, con gotas de aceite homogéneas y diámetros de gota de 5 μm . La evaluación del cambio en el tamaño de gota durante el almacenamiento de las emulsiones no mostró cambios significativos al término del almacenamiento.

Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos concluir que el EPS obtenido a partir de la fermentación de leche mediante el uso de kefirano, exhibe actividad superficial adecuada para formar y estabilizar emulsiones de tipo W/O.

Referencias

1. Widyastuti, Y., Rohmatussolihat R., Febrisiantosa, A. "The role of lactic acid bacteria in milk fermentation". Food and Nutrition Sciences 5 (2014) 435-442.
2. Pinaría, Y.W., Antara, N.S., Putra, G.P.G., Sujaya, I.N. "Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus casei* AL15 isolated from sap of *Arenga pinnata*". Journal of Natural Sciences Research 6 (2016) 7-12.
3. Zajsek, K. Kolar, M., Goršek, A. "Characterisation of the exopolysaccharide kefirano produced by lactic acid bacteria entrapped within natural kefir grains". International Journal of Dairy Technology 64 (2011) 544-548.
4. Pop, C., Salanță, L., Rotar, A.M., Semeniuc, C.A., Socaciu, C., Sîndic, M. "Influence of extraction conditions on characteristic of microbial polysaccharide kefirano isolated from *kefir* grains biomass". Journal of Food and Nutrition Research 55 (2016), 121-130.
5. Pilotzi, A. Comportamiento de la tensión superficial en la interfase agua-aceite y su influencia sobre la estabilidad de emulsiones. Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. (2015).

COMPORTAMIENTO DE EXOPOLISACÁRIDOS PARA LA ESTABILIZACIÓN DE EMULSIONES (O/W)

De Los Santos-Trinidad J., Román-Guerrero A.

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Av. San Rafael Atlixco No. 186. Col. Vicentina, Iztapalapa, CDMX, 09340, México.

ailuj_940109@hotmail.com

Palabras claves: exopolisacáridos (EPS), propiedades superficiales, emulsión.

Introducción. El estudio de EPS microbianos ha empezado a tomar interés debido a la amplia gama de aplicaciones que abarca desde la salud humana, en tecnologías ambientales, industria alimentaria y química, siendo principalmente utilizados como agentes gelificantes, estabilizantes de suspensiones y formadores de películas [1]. El objetivo de este trabajo consistió en la caracterización fisicoquímica de los EPS del kefirano, los EPS son conocidos como polisacáridos extracelulares con cadenas lineales o ramificadas constituidas de monosacáridos como glucosa, galactosa, manosa, ácido glucurónico o sus derivados, las bacterias ácido lácticas son caracterizadas por ser capaces de desviar una pequeña proporción de sus azúcares fermentables hacia la biosíntesis de EPS [2].

Metodología. Los EPS fueron obtenidos a partir de cultivos de gránulos de kéfir en leche entera para la obtención de leche fermentada (LF); la purificación se realizó de acuerdo con el método descrito por Zajsek et al. [3]. Los EPS se caracterizaron en función del rendimiento, propiedades térmicas en un DSC (25-200 °C con una rampa de 5°C/min), FT-IR, la actividad superficial se determinó mediante la evaluación de tensión interfacial dinámica en un tensiómetro de gota pendiente OCA-20. Las emulsiones O/W se produjeron con una fracción másica de fase dispersa del 10% ($\phi=0.1$), cuya composición consistió en aceite canola (O), adicionada por goteo en el EPS y homogenizado a 11,400 rpm. Las emulsiones fueron caracterizadas en función de su morfología y distribución de tamaño de gota ($D_{4,3}$).

Resultados y discusión. Los EPS presentaron un rendimiento de 1 g EPS/500 mL LF. La Figura 1a muestra el espectro de IR donde se observan señales características de los grupos alcohol de los carbohidratos, C-O-C y C-O en la región de 1000-1200 cm^{-1} y una banda intensa en 1030 cm^{-1} característica de los polisacáridos [4]. El análisis calorimétrico mostró que el EPS presenta cambios estructurales a una temperatura de 105°C, que posiblemente se relacione con una temperatura de transición vítrea. En la Figura 1b se muestra el perfil obtenido de la determinación de tensión interfacial, donde se puede observar la reducción de la misma, lo cual puede atribuirse a la composición fisicoquímica (relación contenido proteína: carbohidrato) y capacidad del EPS para

reducir las fuerzas de cohesión de las fases agua y aceite, permitiendo que la interacción entre éstas se favorezca [5].

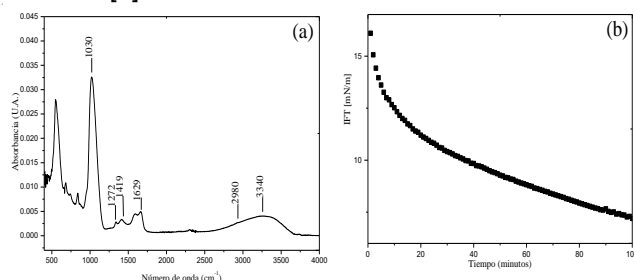


Figura 1. Perfiles de Espectros de infrarrojo-FTIR (a) y tensión interfacial de EPS, (b).

Las emulsiones O/W presentaron morfologías típicas para los sistemas dispersos, con gotas de aceite homogéneas y diámetros de gota de 5 μm . La evaluación del cambio en el tamaño de gota durante el almacenamiento de las emulsiones no mostró cambios significativos al término del almacenamiento.

Conclusiones. De acuerdo con los resultados obtenidos podemos concluir que el EPS obtenido a partir de la fermentación de leche mediante el uso de kefirano, exhibe actividad superficial adecuada para formar y estabilizar emulsiones de tipo W/O.

Referencias

1. Pinaria, Y.W., Antara, N.S., Putra, G.P.G., Sujaya, I.N. "Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus casei* AL15 isolated from sap of *Arenga pinnata*". *Journal of Natural Sciences Research* 6 (2016) 7-12.
2. Widyastuti, Y., Rohmatussolihat R., Febrisiantosa, A. "The role of lactic acid bacteria in milk fermentation". *Food and Nutrition Sciences* 5 (2014) 435-442.
3. Zajsek, K. Kolar, M., Goršek, A. "Characterisation of the exopolysaccharide kefiran produced by lactic acid bacteria entrapped within natural kefir grains". *International Journal of Dairy Technology* 64 (2011) 544-548.
4. Pop, C., Salanță, L., Rotar, A.M., Semeniuc, C.A., Socaciu, C., Sindic, M. "Influence of extraction conditions on characteristic of microbial polysaccharide kefiran isolated from kefir grains biomass". *Journal of Food and Nutrition Research* 55 (2016), 121-130.
5. Pilotzi, A. Comportamiento de la tensión superficial en la interfase agua-aceite y su influencia sobre la estabilidad de emulsiones. Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2015.

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDO SOBRE PROPIEDADES INTERFACIALES DEL EXOPOLISACÁRIDO OBTENIDO DE KEFIRANOS

Julia De Los Santos-Trinidad^a, Eduardo Jaime Vernon-Carter^a, Angélica Román-Guerrero^{a*}

^a Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Av. San Rafael Atlixco No.186. Col. Vicentina, Iztapalapa, CDMX, 09340, México. arogue@xanum.uam.mx

Resumen

En la búsqueda de nuevos y mejores aditivos alimentarios, el uso de exopolisacáridos (EPS) a partir de cultivos microbianos ha comenzado a tener mayor interés desde el punto de vista tecnológico. Por lo que el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del ultrasonido (US) sobre las propiedades interfaciales del EPS obtenido de kefiranos. En general, este tipo de EPS presenta actividad interfacial de baja a moderada, sin embargo, debido a la aplicación de energía de alta frecuencia como el US, fue posible observar cambios estructurales que influyen significativamente sobre las propiedades funcionales de los EPS como agentes con actividad superficial. Los principales resultados mostraron que al aplicar US a una dispersión de EPS al 1% (p/p), a una frecuencia de 20 kHz y 50% u 80% de amplitud durante 15 y 20 minutos, es posible evaluar cambios estructurales por FT-IR y que éstos tienen influencia sobre la capacidad de adsorción del EPS en interfaces fluidas. A partir de estos resultados es posible establecer las condiciones bajo las cuales sí es factible mejorar la actividad superficial del EPS obtenido de un cultivo de kefiranos.

Introducción

En este contexto de transformación de la industria alimentaria, los productos más demandados para la sociedad han sido mejorados considerablemente, por ejemplo, los yogures y otras leches fermentadas, constituyen los principales vehículos de todas las propiedades funcionales que se obtienen de las bacterias inoculadas, aparte de ser uno de los alimentos que tienen una gran aceptación en los distintos grupos de la población [1]. Sin embargo, la principal problemática de los EPS es la actividad superficial que puede clasificarse como moderada, por ello se buscan nuevos métodos para mejorar dicha propiedad de los exopolisacáridos como por ejemplo la aplicación de altas presiones como el ultrasonido. Esta tecnología es novedosa, y ha demostrado tener efectos promisorios en las áreas de procesamiento y conservación de alimentos, ya que ha demostrado que mejora la actividad superficial de proteínas y polisacáridos [2].

Metodología

Para los tratamientos se utilizaron las siguientes condiciones: se prepararon dispersiones de EPS en concentraciones de 1% (p/p), a cada dispersión se le aplicó US mediante el uso de un sonotrodo de 7 mm de diámetros una frecuencia fija de 20 kHz, a dos condiciones de amplitud de 50% y 80%, durante dos tiempos de tratamiento de 15, y 20 min respectivamente. Una vez finalizado el tratamiento de US, las muestras de EPS se secaron en una estufa a 40°C hasta alcanzar peso constante. Las muestras de EPS se caracterizaron por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) en un espectro FT-IR Frontier (Perkin Elmer, E.U.A) acoplado a un accesorio ATR de 4000 a 400 cm⁻¹.

Para la evaluación de la actividad superficial se realizaron pruebas de tensión interfacial dinámica usando el método descrito por Tang y Shen [3] con ligeras modificaciones. Se utilizó un tensiómetro de gota pendiente OCA 20 (Dataphysics Instrument GmbH, Alemania). El montaje de la interfase agua-aceite consistió en colocar aceite de canola filtrado en una celda de vidrio óptico, se preparó una dispersión de EPS a una concentración 1.0 % (p/p), la cual fue filtrada y colocada en una jeringa de dosificación. Posteriormente la aguja de la jeringa se sumergió en la celda conteniendo el aceite y se procedió a formar una gota de la dispersión acuosa con un volumen 30 μ L durante 180 min. Este procedimiento se evaluó a pH 3 y pH 7.

Resultados

En la Figura 1 se observan los espectros de FTIR de los EPS tratados, donde se pueden apreciar cambios significativos sobre las señales de absorción de

cada muestra. En la Figura 2a se observó que al inicio de las pruebas fueron mayores los valores de tensión interfacial para las muestras tratadas en comparación con el EPS sin tratar. Sin embargo, se observa que la velocidad con la que disminuyó la tensión interfacial fue mayor para el tratamiento EPS (1%-20MIN-80A), indicando que, bajo estas condiciones, este tratamiento mostró una adsorción más rápida a la interfase aceite-agua, logrando una saturación rápida de la interfase con moléculas de EPS y provocando la caída de la gota. La Figura 2b muestra que, al modificar el pH de las suspensiones de EPS, la tensión interfacial no disminuyó tan rápido ni en la misma magnitud que en el caso anterior, lo cual indica que esta capacidad de disminución de la tensión interfacial puede verse afectada al modificar el pH. Para el caso de las muestras tratadas con 50% de amplitud, se obtuvieron perfiles y comportamientos similares a aquellos observados con 80% (Figs. 2c-d), manteniendo su tensión hasta más de 3 horas.

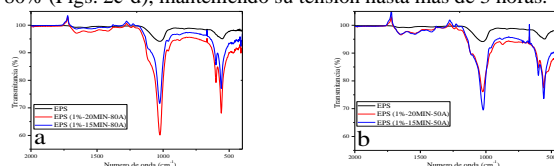


Figura 1. Espectros de infrarrojo para dispersiones del EPS nativo y las tratadas: a) EPS (1%-20 y 15MIN-80A), b) EPS (1%-20 y 15MIN-50A).

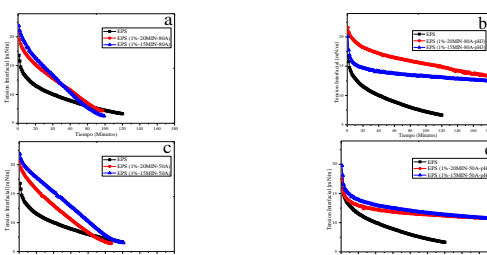


Figura 2. Perfiles de tensión interfacial del EPS sin tratar comparadas con los EPS tratados y la modificación de sus pH's: a) EPS (1%-20 y 15MIN-80A), b) EPS (1%-20 y 15MIN-80A-pH3), c) EPS (1%-20 y 15MIN-50A) y d) EPS (1%-20 y 15MIN-50A-pH3).

Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos el EPS en cada uno de los tratamientos su desempeño como agente reductor de la tensión interfacial fue mejor cuando el pH fue de 7.0, y que comparadas con las del EPS sin tratar sin mejoró ligeramente su actividad superficial en el caso de los tratamientos al 1% con 80% de amplitud a los dos tiempos (15 y 20 min), lo cual nos indica que la aplicación de altas presiones como el US si mejora las propiedades superficiales de los exopolisacáridos.

Referencias

1. Sanz Y, Collado M.C, Dalmau J. "Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo". Acta pediátrica Española 16 (2003) 9.
2. Murillo, M.M.M., Pedroza, I.R., Lobato, C. C., Martínez, F. A., Vernon, C. E. J. "Designing W1/O/W2 double emulsions stabilized by protein polysaccharide complexes for producing edible films: Rheological, mechanical and water vapour properties". *Food Hydrocolloids* 25 (2011) 577-585.
3. Tang, C. Shen, L. "Dynamic adsorption and dilatational properties of BSA at oil/water interface: Role of conformational flexibility". *Food Hydrocolloids* 43 (2015) 388-399.



Casa abierta, el tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00206

Matricula: 2191800014

"EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDO SOBRE LAS PROPIEDADES SUPERFICIALES DE UN EXOPOLISACÁRIDO OBTENIDO DE REPIRANOS"



JULIA DE LOS SANTOS TRINIDAD
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 12:00 horas del día 19 del mes de junio del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. SERGIO ANDRES ALATORRE SANTAMARIA
DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO
DR. FRANCISCO CRUZ SOSA

siendo los dos primeros asesores de la alumna y lector el tercero, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

DE: JULIA DE LOS SANTOS TRINIDAD

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, se comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

ASESOR

DR. SERGIO ANDRES ALATORRE
SANTAMARIA

ASESORA

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

LECTOR

DR. FRANCISCO CRUZ SOSA