



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y
FARMACÉUTICAS**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Tesis de Doctorado

*CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE
PROTEÍNAS DE SOJA Y EVALUACIÓN DE SUS
PROPIEDADES FUNCIONALES*

Presentada por Romina Ingrassia

Rosario, Argentina

2016

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE PROTEÍNAS DE SOJA Y EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES FUNCIONALES

Romina Ingrassia

Licenciada en Biotecnología, Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario (UNR) y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Área Físicoquímica, Departamento Química-Física dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la UNR, en el Instituto de Física Rosario (IFIR-CONICET), en el Laboratorio de Investigación en Funcionalidad y Tecnología de Alimentos (LIFTA) del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ) y en el Agricultural and Biological Engineering Department, Purdue University (West Lafayette, Indiana, EEUU), durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2011 y el 15 de diciembre de 2015, bajo la dirección de la Dra. Patricia H. Risso y la codirección del Dr. Gonzalo G. Palazolo.

Nombres y firmas del Director y de los integrantes del Jurado de Tesis:

Director: Dra. Patricia H. Risso.....

Jurado.....

Jurado.....

Jurado.....

Defendida:

Esta tesis fue realizada con el aporte de los siguientes subsidios:

- Coacervación e hidrólisis de proteínas vegetales - Proyecto Jóvenes Investigadores, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (2015-2016) - Código: PICT-2014-1571.
- Incompatibilidad termodinámica entre polisacáridos y proteínas en sistemas alimentarios. Proyectos de Investigación UNR - Convocatoria 2013 (2014-2015) - Código: 1BIO385.
- Evaluación de propiedades estructurales, funcionales y biológicas de proteínas alimentarias. Línea de investigación UNR (2012-2015) - Código: 3BIO4.
- Hidrólisis enzimática de proteínas alimentarias con endopeptidasas de origen bacteriano. Proyectos de Investigación UNR - Convocatoria 2011 (2011-2014) - Código: BIO273.

Parte de los resultados presentados en esta tesis fueron publicados en:

Capítulo de Libro

Romina Ingrassia, Pablo A. Sobral, Jorge R. Wagner, Patricia H. Risso. *Evaluación de geles ácidos de aislados proteicos de lactosuero y de soja*. - Publicaciones reológicas – Volumen I, pp. 114-127, 2013. UNR Editora (Argentina). ISBN: 978-9-877020-43-4, 210 pg.

Artículo publicado en Revista Extranjera con referato

Romina Ingrassia, Juan P. Costa, María E. Hidalgo, Manuel Mancilla Canales, Horacio Castellini, Bibiana D. Riquelme, Patricia H. Risso. “*Application of a digital image procedure to evaluate microstructure of caseinate and soy protein acid gels*”. LWT - Food Science and Technology (ISSN: 0023-6438) 52, 120-127 (2013). Aceptado para su publicación el 21 de enero de 2013, Elsevier.

Artículos Inéditos

1. Romina Ingrassia, Pablo A. Sobral, Gonzalo G. Palazolo, Patricia H. Risso, Jorge R. Wagner. “*Impact of isolation methods on chemical composition, structural properties, antitryptic activity, thermal behavior and solubility of soy proteins*”.

Enviado para su publicación

2. Romina Ingrassia, Gonzalo G. Palazolo, Patricia H. Risso, Jorge R. Wagner. “*Glicosilation of soy protein with native soy oligosaccharides and polysaccharides*”.

En proceso de redacción

3. Romina Ingrassia, Gonzalo G. Palazolo, Jorge R. Wagner, Patricia H. Risso. “*Effect of non-enzimatic glicosilation in acid gelation of defatted soy flour*”.

En proceso de redacción

4. Romina Ingrassia, Gonzalo G. Palazolo, Jorge R. Wagner, Patricia H. Risso. *“Influence of the presence of soy whey proteins in acid aggregation and gelation of soy protein isolates”*.

En proceso de redacción

Trabajos Completos (Proceedings) presentados en Reuniones Científicas

Publicados en Actas de Reuniones Científicas Internacionales:

Romina Ingrassia, Gonzalo G. Palazolo, Patricia H. Risso, Jorge R. Wagner. *“Glicosilación de proteínas de soja por tratamientos térmicos controlados de harina desgrasada de soja”*. IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICYTAC 2012). Córdoba, 2012.

Publicados en Actas de Reuniones Científicas Nacionales:

Romina Ingrassia, Gonzalo G. Palazolo, Patricia H. Risso, Jorge R. Wagner. *“Evaluación de la calidad proteica en harinas desgrasadas de soja con proteínas glicosiladas”*. XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (XIV CYTAL). Rosario, 2013.

Romina Ingrassia, Gonzalo G. Palazolo, Patricia H. Risso, Jorge R. Wagner. *“Propiedades estructurales y comportamiento superficial de proteínas de soja. Efecto de los agregados insolubles”*. XIV CYTAL. Rosario, 2013.

Romina Ingrassia, Pablo A. Sobral, Jorge R. Wagner, Patricia H. Risso. *“Evaluación de geles ácidos de aislados proteicos de lactosuero y de soja”*. XIV Congreso y XXXII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Casilda, 2012. Primer Congreso Argentino de Biorreología. Rosario, 2012.

Romina Ingrassia, Juan P. Costa, María E. Hidalgo, Manuel Mancilla Canales, Bibiana D. Riquelme. *“Evaluación de la Microestructura de Geles Proteicos por Análisis Textural de Imágenes Digitales”*. XIII Congreso y XXXI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, 2011. **Premio “Sociedad de Biología de Rosario” al mejor trabajo de investigación en el Área Agropecuaria.**

Comunicaciones presentadas en Reuniones Científicas

Publicadas en Actas de Reuniones Científicas Internacionales:

Romina Ingrassia, Gonzalo G. Palazolo, Jorge R. Wagner, Patricia H. Risso.
“Evaluación reológica y microestructural de geles ácidos de harinas glicosiladas de soja obtenidas por tratamientos térmicos controlados”. V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICYTAC 2014). Córdoba, 2014.

Publicadas en Actas de Reuniones Científicas Nacionales:

Romina Ingrassia, Gonzalo G. Palazolo, Jorge R. Wagner, Patricia H. Risso
“Evaluación de proteínas de soja glicosiladas por pardeamiento no enzimático”. XVIII Congreso Argentino de Físicoquímica y Química Inorgánica. Asociación Argentina de Investigación Físicoquímica. Rosario, 2013

Débora López, Romina Ingrassia, Patricia Risso, Gonzalo Palazolo, Jorge R. Wagner, Valeria Boeris
“Evaluación de la formación de glicoconjugados en harinas desgrasadas de soja por reacciones de Maillard y su posible utilización como aditivos en alimentos”
XVII Congreso y XXXV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, 2015

Cursos de Perfeccionamiento Científico (Cursos de Postgrado) realizados durante el Doctorado

1. *Procesos Tecnológicos de los Alimentos (2013)*. Escuela de Graduados, Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas (FCBF), UNR. Carga horaria: 60 hs.
2. *Fisicoquímica de los Alimentos (2012)*. Escuela de Graduados, FCBF, UNR. Carga horaria: 60 hs.
3. *Epistemología (2012)*. Escuela de Graduados, FCBF, UNR. Carga horaria: 30 hs.
4. *Espectroscopía de RMN de biomacromoléculas (2012)*. Escuela de Graduados, FCBF, UNR. Carga horaria: 60 hs.
5. *Análisis Digital de Imágenes (2012)*. Escuela de Graduados, FCBF, UNR. Carga horaria: 40 hs.
6. *Microscopía Confocal Cuantitativa (2012)*. Escuela de Graduados, FCBF, UNR. Carga horaria: 40 hs.
7. *Tópicos de Biofisicoquímica (2011)*. Escuela de Graduados, FCBF, UNR. Carga horaria: 60 hs.
8. *Relación Estructura-Función en Proteínas (2011)*. Escuela de Graduados, FCBF, UNR. Carga horaria: 60 hs.

Totalidad de horas cursadas y aprobadas: 410 horas

Totalidad de horas obligatorias para el Doctorado: 300 horas

*“Hay tres pautas básicas:
tomarse en serio las cosas que uno hace,
dedicarse en cuerpo y alma a lograr el objetivo que uno se ha impuesto, y
convencerse de que lo importante en la vida es terminar lo que se empieza”*

Josef Ajram

AGRADECIMIENTOS

“...No hay dos fuegos iguales. Hay gente de fuegos grandes y fuegos chicos y fuegos de todos los colores. Hay gente de fuego sereno, que ni se entera del viento, y gente de fuego loco, que llena el aire de chispas; algunos fuegos, fuegos bobos, no alumbran ni queman, pero otros arden la vida con tantas ganas que no se puede mirarlos sin parpadear, y quien se acerca se enciende.”

(Eduardo Galeano)

A todos estos fueguitos que forman parte de mi mar, personas maravillosas que brillan con luz propia y me hacen una mejor persona...

☞ A Patricia, por abrirme una puerta desde los “muy principios” y enseñarme el camino, no solo en el trabajo de mesada, sino también en la vida de docente y de investigador. Por el cariño que nos brindás a todos y cada uno desde una mirada intachable. Toda esta suma de cosas hace que te esté completamente agradecida desde siempre.

☞ A Gonzalo, por brindarme la oportunidad, por la paciencia y dedicación hasta último momento, por volver a confiar en mí (y eso que esta vez era más difícil). A George, miles de gracias por permitirme participar y abrir horizontes desde otros caminos. Son personas grandiosas y, junto a Patricia, forman parte de un cuerpo técnico del que me siento muy orgullosa!

☞ Al Dr. Campanella, por su apoyo incondicional y por su corazón generoso.

☞ A mis viejos, que me apoyaron incondicionalmente desde siempre para todos los ámbitos de la vida. Esta gran etapa fue una de ellas. Los quiero infinitamente.

☞ A mis hermanos del corazón, Vir, Romi, Lucho, Luli y Clari. A Catalina, el mejor regalo que me dio la vida.

☞ A mis nonos, que los tengo siempre conmigo... y a mis abuelos del alma, Lucía y Tito.

☞ A mis tíos Pili, Sergio, Marta y Gena. A todos mis primos, en especial a Lari, Andy, Ye, Lucas, Fede y Vale. Gracias por formar parte de tantos hermosos recuerdos y por aguantar y entender ausencias. Sus palabras me brindaron muchas buenas energías en todos estos años.

☞ A mi padrino Néstor, gracias por tu cariño y por todos tus consejos. Me sirvieron y me servirán de mucho. Gracias también por todo tu apoyo. Te tengo siempre presente.

☞ A todos los docentes e investigadores de la Cátedra de Fisicoquímica. Forman parte de un ámbito de trabajo estupendo y donde me sentí siempre muy bienvenida.

☞ A mis amigas y compañeras desde los comienzos: Juli, Mili, Maru, Ro, Evi y Meli.

☞ A Estela Marí, Mirta y Bibiana Riquelme. Gracias por todo el cariño y apoyo.

☞ A todo el equipo PROFEP y a la tripulación del *Enterprise*: Mica, Debo, Juli, Nata y Ren. A mis amigos y compañeros de boxes, equipos, matienzos y divertidas charlas, en especial a Georgi y Nanu. Forman parte de una calidez que no es común encontrar todos los días en un mismo lugar.

☞ A Valeria y a Pablo, por confiar en mí y darme la oportunidad para lo que se viene.

☞ Al equipo LIFTA, especialmente a la Dra. Chechi, Pauli, Andrés y Juan, y a Valeria, por recibirme incondicionalmente y ser excelentes anfitriones en las innumerables visitas a la UNQui.

☞ A mis compañeros docentes de la Cátedra de Física Biológica: Danilo, Gabriel y Sebastián (y a los chiquitines). Especialmente a Mariel... por animarse a saltar conmigo.

☞ A Juli y Lauri, por demostrarme que el tiempo y la distancia pueden ser más cortos. Gracias por todo su cariño y aliento.

☞ A Carlitos, por la buena onda que compartís a diario y tan desinteresadamente con todos, y por ayudarme en la culminación de este trabajo.

☞ A mis amigos de la vida, a Charo, Ani, Mile, Anto, Maru y Luli. A las más viejis Maru y Adri. A Lore, Sole, Juano y Luis y en especial a Lara.

☞ A Monona y Rómulo, por su insuperable ejemplo. A todos mis amicuñas y amiconcuñas: Jose, Seba, Angie, Agus, Manu, Santiago, Alum, Fran, Andy, Matías y Érica. Gracias por apoyarme y contenerme desde siempre. Los quiero mucho a todos.

☞ Y muy especialmente a Juan, mi amor, mi mejor amigo, mi colega, mi esposo, mi compañero de vida, mi todo. No me alcanzan las palabras para agradecerte por tu apoyo incondicional desde siempre. Gracias por todos estos años y por muchos muchos más. Te amo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	V
LENGUAJE ESPECIAL.....	VII
RESUMEN.....	VIII
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	
1.1. Importancia del tema en estudio	1
1.2. Soja.....	3
1.2.1. Proteínas de soja	3
1.2.2. Hidratos de carbono de soja	6
1.2.3. Obtención de harina de soja en la industria.....	8
1.3. Glicosilación de proteínas alimentarias.....	10
1.3.1. Química de la reacción de Maillard	12
1.3.2. Factores que afectan la reacción de Maillard	14
1.3.3. Glicosilación de proteínas de soja	15
1.4. Agregación y gelación ácida de proteínas de soja	16
1.4.1. Geles ácidos de harina de soja (símil tofu).....	19
1.4.2. Microestructura de los geles ácidos	20
1.5. Emulsiones alimentarias	20
1.5.1. Definición y clasificación de emulsiones.....	21
1.5.2. Formación de las emulsiones.....	21
1.5.3. Estabilidad de las emulsiones	23
1.5.4. Mecanismos de desestabilización de emulsiones	23
1.5.5. Agentes emulsificantes.....	26
1.5.5.1. Las proteínas como agentes emulsificantes	27
1.5.5.2. Los polisacáridos como agentes emulsificantes	28
1.5.5.3. Combinación proteína-polisacárido como agente emulsificante.....	28
OBJETIVOS.....	29

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales y preparación de soluciones.....	30
2.1.1. Soluciones de SPI	30
2.1.2. Soluciones de mezclas SPI/WSP	30
2.1.3. Preparación de muestras de harinas glicosiladas	31
2.1.3.1. Preparación de dispersiones acuosas de harina de soja.....	31
2.1.3.2. Tratamientos térmicos	31
2.1.4. Preparación de dispersiones de harinas glicosiladas para la evaluación de la gelación ácida	32
2.1.5. Soluciones para la evaluación de proteína soluble en las muestras glicosiladas	32
2.1.6. Soluciones para la determinación de Lys glicosilada (LG).....	33
2.1.7. Preparación de extractos para la determinación de actividad antitriptica (AA).....	33
2.1.8. Preparación de muestras proteicas para microscopía confocal	33
2.1.9. Soluciones para electroforesis	34
2.1.10. Preparación de emulsiones O/W	34
2.1.10.1. Preparación y caracterización de las dispersiones acuosas de harinas	34
2.1.10.2. Preparación y almacenamiento de las emulsiones	35
2.1.11. Reactivos químicos utilizados	35
2.2. Equipos utilizados	35
2.3. Métodos	37
2.3.1. Evaluación del proceso de agregación ácida mediante turbidimetría	37
2.3.1.1. Determinación de la dimensión fractal (D_f) de los agregados.....	40
2.3.1.2. Agregación ácida de SPI inducida por GDL	40
2.3.1.3. Efecto de la presencia de WSP en la agregación ácida de SPI.....	41
2.3.2. Análisis microscópico de dispersiones y geles	41
2.3.2.1. Microscopía óptica convencional (OCM)	41
2.3.2.2. Microscopía confocal de barrido láser (CLSM)	42
2.3.2.3. Análisis cuantitativo de imágenes.....	43
2.3.3. Propiedades reológicas de los geles ácidos	44
2.3.4. Determinación de la solubilidad en agua (S_w) y en KOH 0,2% P/P (S_{KOH}) ...	45

2.3.5. Determinación de LG	46
2.3.6. Determinación de AA	48
2.3.7. Determinación de actividad ureásica (AU)	49
2.3.8. Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)	50
2.3.9. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	50
2.3.10. Caracterización de las muestras mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	51
2.3.11. Caracterización de las emulsiones O/W	51
2.3.11.1. Distribución de tamaño de partícula (DTP)	51
2.3.11.2. Microestructura de las emulsiones	52
2.3.11.3. Estabilidad frente al almacenamiento estacionario	52
2.3.12. Análisis estadístico	52

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Evaluación de la capacidad de agregación ácida de aislados de soja	53
3.1.1. Agregación y gelación ácidas de los SPI	53
3.1.1.1. Evaluación del efecto de la temperatura, la cantidad de GDL adicionada y la concentración proteica por medidas turbidimétricas	53
3.1.1.2. CLSM y análisis digital de imágenes	59
3.1.1.3. Evaluación de la gelación ácida por determinaciones reológicas	61
3.1.2. Efecto de la presencia de WSP sobre la agregación y gelación ácidas del SPI	63
3.1.2.1. Evaluación de la agregación ácida por medidas turbidimétricas	63
3.1.2.2. Evaluación de la gelación ácida	66
3.1.2.2.1. Determinación de las propiedades reológicas	66
3.1.2.2.1. Evaluación de la microestructura por OCM y CLSM	70
3.2. Evaluación de las propiedades estructurales y funcionales de harinas glicosiladas de soja	72
3.2.1. Caracterización de harinas glicosiladas de soja	72
3.2.1.1. Análisis de la harina de soja activa de partida	72
3.2.1.2. Evaluación del grado de glicosilación sobre las propiedades estructurales de las proteínas de soja en harina tratada	72

3.2.1.2.1. Influencia del estado de subdivisión de la dispersión de harina de soja frente a diferentes tratamientos térmicos.....	72
3.2.1.2.2. Influencia de los tratamientos térmicos controlados de harina de soja activa y sus dispersiones acuosas homogenizadas a alta velocidad	79
3.2.2. Análisis de las propiedades gelificantes de las harinas glicosiladas de soja..	89
3.2.2.1. Evaluación de las propiedades reológicas durante la formación de geles ácidos y en el equilibrio	89
3.2.2.2. Evaluación de geles ácidos de harina de soja por CLSM	93
3.2.3. Evaluación de las propiedades emulsionantes de harinas glicosiladas	97
3.2.3.1. Solubilidad y tamaño de partícula de las dispersiones utilizadas para preparar las emulsiones O/W	97
3.2.3.2. Evaluación de la formación y estabilidad de emulsiones O/W	101
CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES	107
CAPÍTULO 5: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%AA	Actividad antitriptica porcentual relativa al valor obtenido para la harina de partida (100%)
%AU	Actividad ureásica porcentual relativa al valor obtenido para la harina de partida (100%)
% ΔH_d	Entalpía de desnaturalización parcial porcentual relativa al valor obtenido para la harina de partida (100%)
%LG	Lisina glicosilada porcentual correspondiente al disminución relativa de lisina reactiva respecto a la harina de partida (0 %LG)
%Prot	Concentración proteica en % ^P / _P
A	Absorbancia
AA	Actividad antitriptica
AU	Actividad ureásica
a_w	Actividad de agua
BBTI	Factor antitriptico de Bowman-Birk
CLSM	Microscopía confocal de barrido láser
$D_{4,3}$	Diámetro promedio de De Brouckere
D_f	Dimensión fractal
ΔH_d	Variación de entalpía de desnaturalización parcial
Dispersión M	Dispersión de harina de soja en agua, hidratada completamente después de 3 horas de agitación magnética
Dispersión U	Dispersión M homogeneizada con un dispositivo de alta velocidad rotor/estator (20.000 rpm, 5min)
Dispersión V	Dispersión U homogeneizada con un homogeneizador de alta presión (3 ciclos, 1000 bar en la válvula principal y 100 bar en la secundaria)
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DTP	Distribución de tamaño de partícula
FTIR	Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier
G'	Módulo de elástico o de almacenamiento
G''	Módulo de viscoso o de pérdida
$G'_{m\acute{a}x}$	Máximo valor de módulo elástico alcanzado
GDL	Glucono- δ -lactona
h	Horas
HR	Humedad relativa
IC	Índice de cremado
K	Suavidad

KTI	Factor antitriptico de Kunitz
λ	Longitud de onda
LG	Lisina glicosilada
Lys	Lisina
min	Minutos
MW	Marcadores de peso molecular
O/W	Aceite en agua
OCM	Microscopía óptica convencional
pH _{ag}	pH en que comienza la agregación ácida
pH _{gel}	pH en que comienza la gelación ácida
pI	Punto isoelectrico
PM	Peso molecular
S	Entropía de Shannon
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
-SH	Grupo sulfhidrilo o tiol
S _{KOH}	S _{KOH} (en g proteína/100g de muestra) correspondiente al % relativo del valor de S _{KOH} para la harina activa de partida (100%)
SPI	Aislado nativo proteico de soja
-S-S-	Enlace disulfuro
S _w	S _w (en g proteína/100g de muestra) correspondiente al % relativo del valor de S _{KOH} para la harina activa de partida (100%)
t	Tiempo
T	Temperatura
t _{ag}	Tiempo en que comienza la agregación ácida
t _{gel}	Tiempo en que comienza la gelación ácida
T _p	Temperatura de pico
U	Uniformidad
W/O	Agua en aceite
WSP	Aislado proteico de proteínas de suero de soja
τ	Turbidez

LENGUAJE ESPECIAL

<i>Buffer</i>	Solución reguladora o tampón
<i>Flavour</i>	Aroma y sabor
<i>Pickering</i>	Fenómeno de estabilización de una emulsión
<i>Pellet</i>	Pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido
<i>Software</i>	Programa
<i>Stack</i>	Apilamiento

RESUMEN

Los granos de soja pueden ser utilizados como una fuente de proteínas de elevada calidad, en forma de aislados, concentrados y harinas, los cuales tienen gran demanda debido a sus diversos usos potenciales, ya sea a nivel industrial como para la alimentación animal y humana. En la Argentina, la mayor cantidad de la soja producida se exporta y solo un porcentaje reducido se emplea en la elaboración de productos. Gracias a sus propiedades, los concentrados y los aislados proteicos de soja pueden ser usados como ingredientes multifuncionales en la formulación de alimentos. Por otra parte, los oligosacáridos y las fibras de soja también han demostrado presentar interesantes propiedades funcionales.

Una alternativa para mejorar las propiedades funcionales de las proteínas alimentarias es la glicosilación de las mismas. La forma más simple es por medio de la reacción de Maillard. En el caso de proteínas de soja, se han publicado trabajos donde los ensayos de glicosilación se hicieron usando aislados proteicos de soja e hidratos de carbono no propios de la soja.

El objetivo general de este trabajo de Tesis fue elaborar nuevos ingredientes funcionales compuestos por proteínas de reserva y/o de suero de soja con distintos grados de agregación y glicosilación, empleando los propios hidratos de carbono reductores presentes en las materias primas de partida, con vistas a ser empleados en alimentos con acidez y contenido salino variable. Para ello se obtuvieron harinas de soja con proteínas glicosiladas con los carbohidratos intrínsecos. Estas harinas fueron caracterizadas a través de la determinación del grado de glicosilación, grado de desnaturalización, agregación proteica y actividad antitriptica y ureásica. Además se evaluaron las propiedades funcionales de las muestras glicosiladas: solubilidad, agregación y gelación ácidas y poder emulsificante en dispersiones a pH neutro y ácido.

El profundo conocimiento de la compleja relación entre los distintos componentes de una formulación alimentaria permite controlar y/o monitorear mejor la micro/nano estructura y, consecuentemente, manipular la textura de los alimentos procesados y formular nuevos productos con características diferenciadas. Para ello, la utilización de sistemas modelo es muy importante para predecir el comportamiento de sistemas más complejos. Es por ello que, en principio, se evaluó el proceso de agregación y gelación ácidas de aislados proteicos de soja (SPI) y de sus mezclas con

aislados proteicos de suero de soja (WSP). El análisis del proceso de agregación ácida se realizó a partir de medidas espectrofotométricas y potenciométricas en el tiempo, una vez adicionada la glucono- δ -lactona (GDL). La gelación ácida en sistemas concentrados fue evaluada a través de medidas reológicas y por microscopía. En todos los casos estudiados pudo observarse la existencia una primera etapa más lenta vinculada a un proceso de disociación de las partículas proteicas y/o un cambio conformacional, seguida por una segunda etapa más rápida de formación de los agregados que crecen en tamaño hasta formar una red o malla de gel. El grado de compactación de dicha malla o red fue máxima a los 25°C, tanto para los sistemas diluidos como para los sistemas más concentrados. La temperatura estaría afectando al carácter elástico final de los geles a través de la competencia entre dos procesos que ocurren simultáneamente y que involucran a la velocidad de gelación y a las interacciones hidrofóbicas.

La adición de WSP a los SPI indujo la asociación de las partículas proteicas, formando micropartículas de tamaño cada vez mayor a medida que aumenta la proporción de WSP, lo que condujo a un aumento de la velocidad de agregación inducida por la adición de GDL. Teniendo en cuenta que el WSP no agrega al disminuir el pH, la disminución del tiempo y el aumento del pH a los cuales comienza la agregación estaría vinculada con una disminución de la estabilidad electrostática de los SPI al interactuar con el WSP. Esto trajo como consecuencia la formación de agregados y geles menos compactos.

Por otra parte, la glicosilación de las harinas de soja se realizó utilizando como variables del tratamiento térmico el tiempo del mismo (12-48 h), la presencia o ausencia de 79% de humedad relativa y el estado inicial de la muestra (a partir de dispersiones acuosas con diferente estado de subdivisión inicial o a partir del tratamiento directo de la harina). Para analizar el grado de glicosilación se determinó el porcentaje de lisina glicosilada. También se determinó la solubilidad proteica en agua y en KOH 0,2% P/P. Se evaluó el grado de desnaturalización proteica por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y se estudiaron cambios estructurales y/o conformacionales por espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR). Se hicieron estudios de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), en medio reductor y no reductor para evaluar la presencia y naturaleza covalente de los agregados proteicos. Además, se determinó la actividad antitriptica y ureásica.

Los resultados demostraron que la glicosilación de harinas de soja desgrasada usando los propios hidratos de carbono de soja fue factible. Si bien los tratamientos térmicos indujeron una pérdida de lisina, este aminoácido no es limitante en la harina de soja y, salvo en algunas excepciones, el contenido de lisina reactiva fue mayor al mínimo estipulado por el Código Alimentario Argentino. La glicosilación fue acompañada de la formación de agregados insolubles en agua e KOH 0,2% ^P/_P, pérdida parcial de actividad ureasa y antitriptica y desnaturalización parcial del factor antitriptico de Kunitz. La espectroscopía FTIR permitió detectar cambios estructurales en las muestras por efecto del tratamiento térmico. Si bien el grado de agregación proteica, que limita las posibles aplicaciones tecnofuncionales, se podría minimizar a través de modificaciones en la temperatura, la humedad relativa y la relación proteínas/hidratos de carbono. Por otro lado, en las condiciones ensayadas, debería aplicarse un tratamiento térmico adicional por vía húmeda para permitir la inactivación adecuada del factor antitriptico de Kunitz.

El estudio de la gelación ácida evidenció que las proteínas presentes en la harina de soja y glicosiladas con carbohidratos de origen no modificaron su estabilidad electrostática durante la formación de geles ácidos. Sin embargo, las muestras obtenidas por calentamiento de harina en seco en condiciones controladas de humedad presentaron cambios significativos en sus valores de módulo elástico al final del proceso de acidificación. A medida que aumentó el tiempo de tratamiento, mayor fue la pérdida del carácter elástico, llegando incluso a la pérdida total de la capacidad de formar un gel después de las 48 h de tratamiento previo. Estas muestras fueron las que presentaron el mayor grado de glicosilación, lo que produciría un aumento de la hidrofiliidad superficial y, por lo tanto, una disminución de las interacciones hidrofóbicas, conduciendo a la formación de geles cada vez más débiles. Además, la glicosilación produciría aumento en la estabilidad estérica residual del sistema coloidal inhibiendo la reestructuración y compactación de la red de gel. Por otro lado, a través del análisis de las imágenes digitales obtenidas por microscopía confocal de las dispersiones calentadas se observó una correlación positiva entre el tamaño medio de los agregados y la pérdida del carácter elástico final del gel ácido. Estos agregados proteicos no participarían en la red de gel, como se observa en las imágenes de los geles ácidos, presentándose un entramado del gel cada más abierto y discontinuo. Este mismo fenómeno contribuiría a explicar el comportamiento de mezclas SPI/WSP frente a la

agregación y gelación ácidas. A medida que aumentó la proporción de WSP en la mezcla se formaron agregados de mayor tamaño, conduciendo a la formación de geles cada vez menos elásticos.

Los resultados de SDS-PAGE corroboraron la presencia de los agregados de alto peso molecular, indicando una distribución de tamaños diferente y discreta para el caso de las muestras obtenidas en condiciones de humedad controlada (de mayor grado de glicosilación y agregación). Estos agregados de naturaleza covalente, demostraron ser incluso bastante estables en medio reductor.

Las emulsiones preparadas a partir de dispersiones en medio ácido de harinas glicosiladas demostraron incrementar la estabilidad frente al cremado y la coalescencia, siempre y cuando exista una combinación entre el tratamiento térmico en condiciones de humedad relativa controlada y la homogeneización por alta presión de la dispersión. La presencia de agregados formados por glicoconjugados proteicos más pequeños en la dispersión permitió una mejor adsorción y acomodamiento en la interfase agua/aceite y una adecuada estabilización por repulsión estérica, que compensa la atracción hidrofóbica, evitando la coalescencia durante el almacenamiento estacionario. Este mecanismo de estabilización interfacial por repulsión estérica fue consistente con el fenómeno de *Pickering*, observado en emulsiones O/W estabilizadas con partículas insolubles y activas superficialmente.

Estos resultados representan un punto de partida para la elaboración de nuevos ingredientes tecnofuncionales compuestos por proteínas de reserva y/o de suero de soja con distintos grados de glicosilación, empleando los propios hidratos de carbono presentes en las materias primas de partida. Se ha demostrado la existencia de procesos simultáneos de agregación y glicosilación que influyen significativamente sobre las propiedades reológicas y de textura de geles y las propiedades emulsificantes en medio ácido, que deben ser tenidos en cuenta para el diseño de un producto alimenticio con características organolépticas adecuadas. Los resultados obtenidos constituyen una base para futuras investigaciones y el desarrollo de productos alimenticios con características optimizadas utilizando a las proteínas de soja como ingredientes y/o aditivos.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia del tema en estudio

La planta de soja (*Glycine max*) proveniente de China es una legumbre que forma parte de uno de los cultivos de mayor relevancia económica a nivel mundial. La Argentina se posiciona como el tercer país productor de soja en el mundo (detrás de Brasil y Estados Unidos) y como el primero en la utilización de semilla de soja modificada genéticamente, aceite y harina, provenientes de la misma planta. Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires representan las provincias con mayor producción por área sembrada y magnitud de rendimientos [2].

Los granos de soja contienen más del 20% de aceite, el cual es ampliamente utilizado como aceite comestible y en los últimos años para la elaboración de biocombustibles, y más de 48% de proteínas. Los granos de soja son utilizados como una fuente de proteínas de elevada calidad, en forma de aislados, concentrados y harinas (90, 70 y 50 % de proteínas, en promedio, respectivamente), los cuales tienen gran demanda debido a sus diversos usos potenciales, ya sea a nivel industrial como para la alimentación animal y humana.

Actualmente en Argentina, la mayor cantidad de la soja producida se exporta como poroto entero, *pellet* o harina, y solo un porcentaje reducido se emplea en la elaboración de productos. Es por ello que el Plan Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva “Argentina Innovadora 2020” contempla en su apartado II.3.3.1. “Agroindustria” una sección, “Procesamiento de alimentos”, donde se promueve el “agregado de valor y calidad a los productos primarios derivados de las cadenas agroalimentarias”, entre ellas con mención especial a las “harinas proteicas”, como lo es la harina de soja, “buscando incrementar el mercado interno, fortalecer el desarrollo territorial y aumentar los destinos y volúmenes de exportación” [3]. Por lo tanto, el aporte de los resultados obtenidos en el presente trabajo sería importante para el fortalecimiento del sistema científico-tecnológico de nuestro país (objetivo global del Plan), en particular en el área de tecnología de alimentos y más específicamente sobre el procesamiento de una materia prima de partida muy importante, hasta ahora mayoritariamente de exportación, como lo es la harina desgrasada de soja.

Por otra parte, los aislados proteicos de soja, que no se producen a nivel nacional, y concentrados proteicos pueden ser usados como ingredientes multifuncionales en la formulación de alimentos. En el proceso de obtención de aislados proteicos de soja se descartan, en distintas etapas, agregados proteicos junto con polisacáridos insolubles,

proteínas no precipitables en medio ácido (las proteínas de suero de soja) junto con oligosacáridos.

En estos últimos años se ha observado un incremento del consumo de alimentos a base de soja debido al reportado efecto benéfico en la salud y la nutrición. Estos efectos incluyen la disminución del colesterol plasmático, la prevención de cáncer, diabetes y obesidad, y la protección contra enfermedades renales e intestinales. Incluso, la FDA (*Food and Drug Administration*) de los Estados Unidos ha aprobado el uso propagandístico del rol de las proteínas de soja como reductoras del riesgo de padecer enfermedades coronarias. Las fórmulas a base de soja, por otro lado, son ampliamente utilizadas para la alimentación de niños que sufren alergia a la leche de vaca y para la prevención de enfermedades cuando no se dispone de leche materna. Estas son económica y nutricionalmente adecuadas como reemplazo de fórmulas a base de leche bovina y además presentan rara vez reacciones alérgicas [4].

Durante esta última década, los precios mundiales de los ingredientes han aumentado considerablemente. Por lo tanto, será un desafío para los fabricantes la utilización más eficiente de los cultivos durante el procesamiento de alimentos de manera de disminuir los costos de producción, pero manteniendo la elaboración de productos de elevada calidad. Por otro lado, también ha crecido la preferencia de los consumidores por productos industrializados más saludables pero con la misma textura y sabor del producto tradicional. Este hecho es responsable del creciente interés de la industria alimentaria por intensificar y diversificar sus líneas de producción. No obstante, para desarrollar estos alimentos con la textura adecuada es necesario que sean estabilizados por distintos constituyentes alimenticios, entre los cuales las proteínas desempeñan un papel clave debido a sus propiedades funcionales y de interacción [5].

El profundo conocimiento de la compleja relación entre los distintos componentes de una formulación alimentaria permitirá controlar y/o monitorear con mayor eficiencia la micro/nano estructura y, consecuentemente, manipular la textura de los alimentos procesados y formular nuevos productos con características diferenciadas. Sin embargo, los modelos para predecir sistemas complejos necesitan ser modificados continuamente con el fin de relacionarlos con la textura del alimento más estrechamente. En este caso, la utilización de sistemas modelo es muy importante para proveer un marco científico [6].

1.2. Soja

La soja es una legumbre de ciclo anual que pertenece a la familia de las Fabáceas (leguminosas). Presenta una altura entre los 0,5 y 1,5 m, posee hojas grandes, trifoliadas y pubescentes, y vainas cortas que contienen entre uno y cuatro granos oleaginosos con un promedio de 20% de aceite.

Las semillas de soja maduras presentan una forma casi esférica y están formadas por tres partes principales: la cáscara o tegumento, los cotiledones y el hipocotilo (eje embrionario), los cuales representan alrededor del 8, 90 y 2 % del peso de la semilla de soja, respectivamente. La cáscara está compuesta por 4 o 5 capas superpuestas de células de diferentes tipos. Los cotiledones son células alargadas, que contienen al aceite y a las proteínas, en forma de cuerpos lipídicos (esferosomas) de 0,1-0,5 μm de diámetro y cuerpos proteicos de 2-10 μm de diámetro. Los cuerpos proteicos contienen la mayor parte de las proteínas del grano de soja, denominadas proteínas de reserva. Las mismas se hidrolizan durante la germinación y sirven de sustrato para el crecimiento del embrión. Las proteínas estructurales, enzimas e inhibidores enzimáticos se localizan en el resto de la célula [7].

1.2.1. Proteínas de soja

Las proteínas de soja se clasifican en proteínas biológicamente activas y en o de almacenamiento (80% de las totales). Ejemplos de las primeras son la α -amilasa, el citocromo c, la lectina, la lipooxigenasa, la ureasa y los inhibidores de tripsina de Kunitz (KTI, por sus siglas en inglés) y Bowman-Birk (BBTI, por sus siglas en inglés). En tanto, las proteínas de reserva están constituidas mayoritariamente por las globulinas 7S (β -conglucina) y 11S (glicina), las cuales se caracterizan por ser altamente solubles en agua por encima de pH 7 y precipitables a pH 4,5 [7].

Además, las fracciones de proteína de soja pueden ser caracterizadas de acuerdo a sus propiedades de sedimentación o peso molecular. Las dos fracciones precipitables a pH 4,5 poseen pesos moleculares elevados, siendo 20-35% referenciadas como globulina 7S y 25-35% como globulina 11S. Ambas son complejas y están formadas por diversas subunidades que fácilmente se asocian y disocian bajo diferentes condiciones de pH, fuerza iónica y tratamiento térmico [8]. Los componentes de bajo peso molecular (2S) son inhibidores de tripsina, citocromos y otras globulinas.

El aislado nativo proteico de soja (SPI) es la forma más purificada de las proteínas de soja, con un alto valor nutricional y con diversas propiedades funcionales.

Entre ellas se destacan la absorción y retención de agua y aceite, la capacidad de formar y estabilizar emulsiones y espumas, la formación de geles y dispersiones viscosas, la formación de películas y fibras, etc. [7, 9-10]. Está constituido principalmente por las proteínas de reserva glicinina y β -conglucina.

Por otra parte, los sueros de soja son obtenidos a partir del sobrenadante isoeléctrico de la preparación de los SPI y los sueros de tofu provienen del residuo industrial líquido de la elaboración del tofu que se obtiene por coagulación de las proteínas de reserva de la leche de soja utilizando sales de calcio y/o magnesio. Estos sueros contienen hidratos de carbono solubles del grano de soja (mono-, di- y oligosacáridos) siendo la sacarosa y los oligosacáridos estaquiosa y rafinosa los mayoritarios en el suero de tofu [11-12].

La fracción proteica del suero de soja está constituida mayoritariamente por la lectina, también conocida como hemaglutinina, los factores antitripticos KTI y BBTI y enzimas como la α -amilasa, lipooxigenasa y ureasa [13]. El efecto antinutriente de la lectina y los factores antitripticos y su termolabilidad han sido reportados previamente, de manera que deben ser sometidos a un tratamiento hidrotérmico antes de ser utilizados en fórmulas alimentarias. Sin embargo, junto a otras proteínas séricas de soja, contribuyen a la calidad de los granos de soja debido a su contenido relativamente elevado de residuos de cistina. Estas suplementan el escaso contenido de aminoácidos azufrados de las proteínas de reserva que comprenden la mayor parte del reservorio proteico en la semilla. Además, las proteínas aisladas de sueros de soja o de tofu, cuando están correctamente inactivadas, tienen un valor biológico comparable al de las proteínas de reserva, tienen alta solubilidad y propiedades superficiales aún en medio ácido [7, 14]. Es por ello que durante estos últimos años se comenzó a prestar atención en las propiedades nutricionales y funcionales de estos componentes que son subutilizados, ya que usualmente se descartan o generan como sólidos o líquidos en la elaboración de aislados, tofu y también concentrados y leche de soja. Esto trae también como beneficio la utilización de un residuo de valiosas propiedades nutricionales y funcionales que, si no se utiliza, produciría un impacto ambiental negativo.

Las proteínas de reserva de soja tienen una estructura cuaternaria bien definida. La glicinina es una proteína de almacenamiento compuesta por diferentes polipéptidos, cuatro de naturaleza ácida (A_1 - A_4 , 34-44 kDa) y cuatro básicos (B_1 - B_4 , 20 kDa). Los polipéptidos ácidos y básicos están unidos entre sí por un puente disulfuro formando seis subunidades A-B que le dan a la molécula de glicinina un peso molecular

aproximado de 360 kDa [15]. En la glicinina han sido identificadas 5 subunidades: $A_{1a}B_{1b}$, $A_{1a}B_2$, A_2B_{1a} , A_3B_4 , $A_5A_4B_3$ clasificadas dentro de dos grupos de acuerdo a la homología de secuencia de aminoácidos: grupo I ($A_{1a}B_{1b}$, $A_{1a}B_2$, A_2B_{1a}) y grupo II (A_3B_4 , $A_5A_4B_3$). Las subunidades del grupo I contienen dos residuos de cisteína, tres de cistina (-S-S-) y son ricas en metionina (5 a 8 residuos); cada subunidad del grupo II tiene dos residuos de cisteína, dos de cistina y 3 residuos de metionina [16]. Las subunidades de la glicinina son polimórficas, es decir, entre distintos cultivos existen reemplazos aminoacídicos en el mismo tipo de subunidad [17]. La β -conglucina (PM 140-170 kDa) es una glicoproteína y puede aparecer en al menos siete formas: $\alpha'\beta_2$, $\alpha\beta_2$, $\alpha\alpha'\beta$, $\alpha_2\beta$, $\alpha_2\alpha'$, α_3 y β_3 , como resultado de diferentes combinaciones de las subunidades constituyentes α , α' y β por interacciones de van der Waals y puentes de hidrógeno: PM 57-68 kDa, 57- 72 kDa y 42-52 kDa respectivamente [16-18].

El KTI presenta un PM de 20 kDa y posee dos puentes disulfuro [4, 19]. Es altamente estable en un amplio rango de pH (3 a 10) y además es térmicamente estable en condiciones de baja humedad [20]. Lin y Ng (2008) informaron propiedades benéficas del KTI que incluyen el incremento de la producción del óxido nítrico por los macrófagos, así como una disminución en la proliferación de células cancerosas de mama e hígado [21].

El factor antitriptico BBTI posee un bajo PM de aproximadamente 8 kDa y presenta 7 puentes disulfuro responsables de su alta estabilidad térmica [22-23]. Esta proteína resiste, por lo tanto, las altas temperaturas de cocción y el pH del estómago debido al alto número de puentes disulfuro [24]. Por otra parte, se han reportado diversas propiedades anticancerígenas y estimulantes del sistema inmune para BBTI [25-26].

La hemaglutinina o lectina de soja es un glicoproteína tetramérica (PM 120 kDa) de subunidades idénticas (PM 30 kDa cada una) que carece de puentes disulfuro, posee dos sitios de unión a azúcares y un punto isoeléctrico (pI) de 5,81 [27]. Se sabe que forma complejos estables con glúcidos, en especial con D-manosa y N-acetil-D-glucosamina [13]. La α -amilasa de soja posee un PM de 57 kDa, un pI de 5,85 y no posee puentes disulfuro [28].

La lipooxigenasa es una enzima involucrada en la oxidación de ácidos grasos insaturados y, por lo tanto, responsable de impartir aroma y sabor desagradable a algunos productos procesados de soja. Posee un PM de 100 kDa, un pI de 5,58 y es muy termolábil [29].

1.2.2. Hidratos de carbono de soja

Los hidratos de carbono de la soja comprenden un 35% del poroto entero y un 38% de la harina desgrasada desolventizada (en base seca). La composición típica de hidratos de carbono en la harina desgrasada de soja y *pellets* de soja se resume en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición típica de los hidratos de carbono en la harina desgrasada de soja y *pellets* de soja (35-38% en base seca) basado en Karr-Lilienthal y col. (2005).

Hidratos de carbono no estructurales (17%)	% en base seca	Hidratos de carbono estructurales (18-21%)	% en base seca
De bajo PM		De cotiledón	
<i>Monosacáridos</i>		Arabinogalactanos	5
Glucosa	trazas	Polisacáridos ácidos tipo pectina	8-10
Galactosa	trazas	De cáscara	
Fructosa	trazas	Lignina, hemicelulosa y celulosa, etc.	1-2
<i>Disacáridos</i>			
Sacarosa	6-8		
<i>Oligosacáridos</i>	5-7		
Rafinosa	1-2		
Estaquiosa	4-5		
Verbascosa	trazas		
Polisacáridos			
Almidón	< 1%		

La mitad de los carbohidratos presentes en la soja son llamados “no estructurales” e incluyen azúcares de bajo PM, oligosacáridos y pequeñas cantidades de almidón (< 1%). Estos se encuentran principalmente en los cotiledones de los porotos de soja (principales constituyentes de la harina). Los azúcares de bajo PM comprenden monosacáridos simples, como la galactosa, fructosa y glucosa y el disacárido sacarosa. Los oligosacáridos predominantes son los galacto-oligosacáridos rafinosa, estaquiosa y verbascosa. Estos últimos consisten en 1, 2 y 3 unidades de galactosa respectivamente, unidos al residuo de glucosa de una molécula de sacarosa a través de un enlace α -1,3 como se muestra en la Figura 1.1 [30].

Es de destacar que si bien estos oligosacáridos no son digeribles y están asociados a la fermentación bacteriana a nivel intestinal, se han reportado efectos que promueven el crecimiento de bacterias benéficas en el colon (especialmente bifidobacterias) reconociéndolos como compuestos prebióticos [31-32].

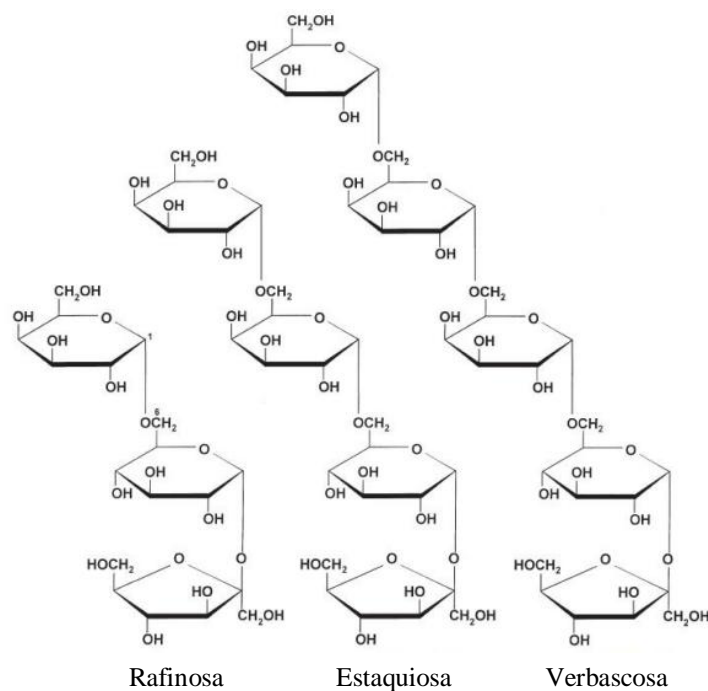


Figura 1.1. Estructura química de los galacto-oligosacáridos principales de soja.

La otra mitad de los carbohidratos de la soja comprende los llamados “carbohidratos estructurales”, que a su vez pueden subdividirse de acuerdo a la su localización en la estructura del grano: polisacáridos de cotiledón y polisacáridos de cáscara [30]. Los polisacáridos del cotiledón comprenden principalmente polisacáridos ácidos, que contienen alrededor de un 30% de residuos de ácido urónico [33], y polisacáridos neutros formados en gran parte por unidades de arabinosa y galactosa (arbinogalactanos) [34]. A partir de la hidrólisis ácida de los polisacáridos ácidos se obtiene ácido galacturónico, galactosa, arabinosa, xilosa, fucosa, ramnosa y trazas de glucosa, mientras que la hidrólisis de polisacáridos neutros produce galactosa, arabinosa y trazas de xilosa y ácido galacturónico. A pesar de la elevada complejidad estructural, estos heteropolisacáridos comparten características similares a las pectinas ácidas [33-34]. Por otro lado, los polisacáridos de la cáscara de soja (86% en base seca de la cáscara y 8% en base seca del poroto), incluyen también hidratos de carbono complejos, principalmente hemicelulosa, celulosa, pectinas ácidas, xilano y galactomananos [35].

Por último, es importante destacar que las fibras de soja, además de sus efectos fisiológicos a nivel intestinal, poseen propiedades funcionales de hidratación y son buenos agentes estabilizantes y texturizantes. Trabajos recientes mostraron que los polisacáridos solubles de las fibras de soja poseen propiedades interfaciales por

contener proteínas covalentemente unidas a su estructura y pueden actuar como emulsificantes en medio ácido [36-37]

1.2.3. Obtención de harina de soja en la industria

Si bien desde el año 200 A.C., los antiguos chinos aprendieron que la soja puede ser remojada en agua y calentada para elaborar productos como el jugo de soja y el tofu, no fue hasta el crecimiento de la industria de la soja en Estados Unidos (siglo XX D.C.) que se comenzó a pensar en la recuperación de sus componentes y la obtención de derivados de alto valor agregado.

Debido a que el poroto de soja contiene alrededor de un 20% de aceite comestible, éste se convirtió en el primer componente objetivo. El primer proceso para recuperar el aceite de soja fue mecánico, mediante una prensa a tornillo. Durante las últimas décadas, esto ha sido reemplazado por extracción con solventes para aumentar el rendimiento de aceite. La extracción mecánica dejaba un remanente de 2-3% de aceite en la torta de la prensa. La extracción por solventes es capaz de reducir el contenido de aceite a menos del 1%. Los ahorros que se obtienen al aumentar este rendimiento son tales que se justifica el gran capital invertido y los costos de operación en una planta de extracción por este método. Por otro lado, la extracción mecánica inevitablemente se desarrollaba a elevadas temperaturas, con una torta de prensa resultante no apta para el consumo humano debido al desarrollo de malos sabores. Las condiciones de temperatura durante la extracción por solvente son suaves y controlables de tal manera que es posible mantener la proteína en su estado nativo. Esto abre la oportunidad a diferentes usos alimentarios. Por lo tanto, aunque la razón para introducir la extracción por solventes fue basada en la recuperación de aceite, también provee la tecnología necesaria para la obtención de la fracción proteica [38].

En la Figura 1.2 se muestra un esquema general típico de producción de aceite de soja, por extracción con solvente hexano, y de harina desgrasada de soja.

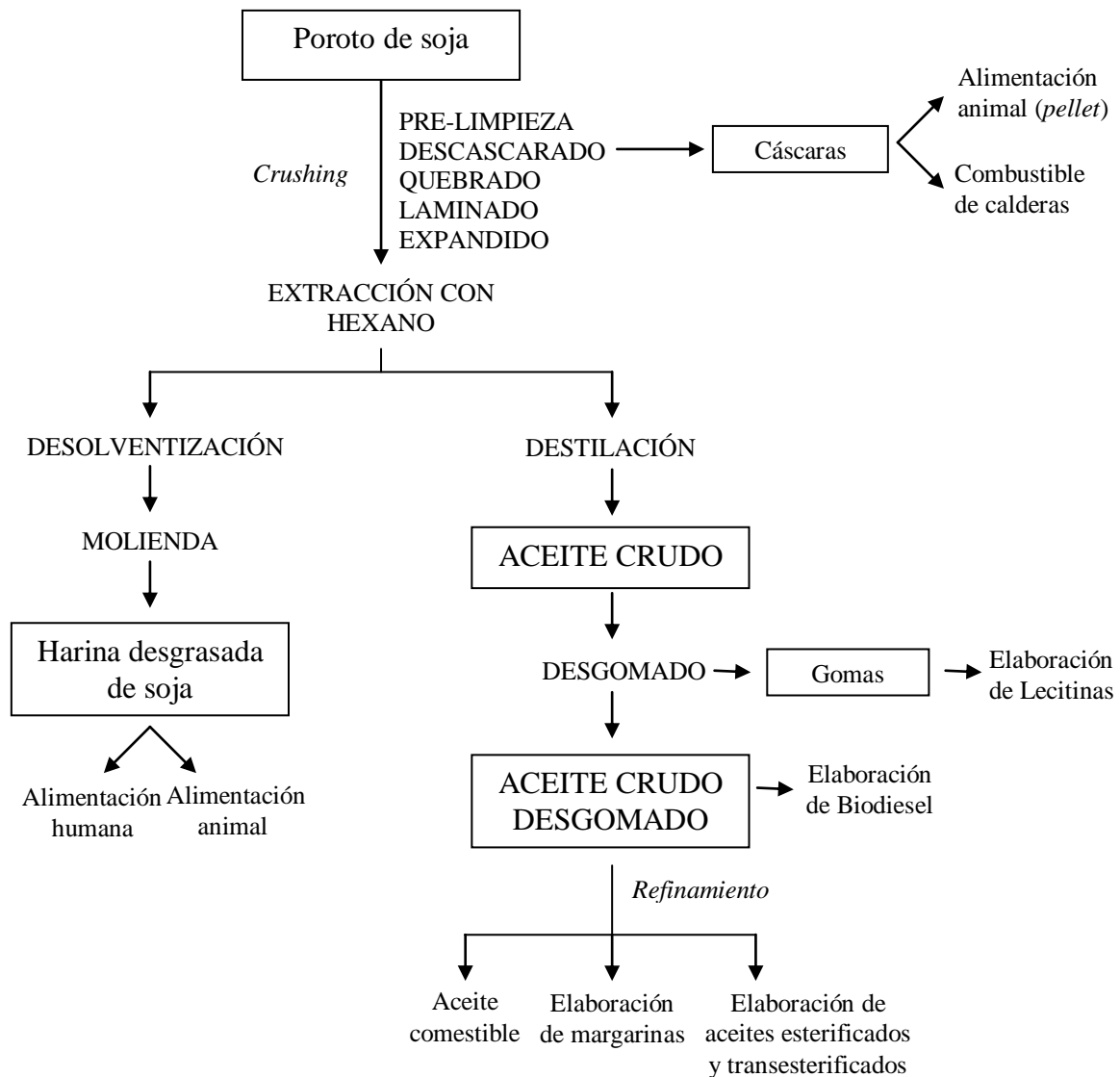


Figura 1.2. Esquema general del procesamiento del poroto de soja en una planta de extracción de aceite.

Antes del procesamiento del poroto de soja, se realiza una limpieza de la materia prima. Se elimina todo tipo de sustancias extrañas (tornillos, polvo, restos de ramas, etc.) que pueden acortar la vida útil de los equipos de la planta y/o reducir su eficiencia preestablecida. Luego, el poroto de soja limpio es quebrado con rodillos corrugados que giran a diferentes velocidades. De esta manera se libera la cáscara del grano que puede ser posteriormente separada por aspiración. Durante el laminado, los granos descascarados y partidos se convierten en finas láminas o escamas para aumentar la superficie de contacto y mejorar la interacción con el solvente. Por otro lado, se rompen células por aplastamiento para facilitar la extracción del aceite retenido. Esta etapa se realiza con rodillos lisos de molino similares a los usados en la manufactura de cereales

para desayuno. Posteriormente, se realiza el expandido que tiene como objetivo complementar la ruptura celular por calentamiento a través de la inyección de vapor y así optimizar el proceso de extracción. De esta manera, se produce un material muy poroso, consecuencia de la rápida expansión del vapor contenido en el material luego de salir de la matriz. La extracción por solvente se realiza en extractores continuos a contracorriente.

La recuperación de solventes es crítica para una operación sustentable. Primeramente la recuperación ocurre por destilación, donde el aceite y el solvente son separados. Las escamas exhaustas salen del extractor conteniendo una cantidad considerable de hexano (25-30%) que debe ser recuperado. Esto se lleva a cabo mediante un desolventizador-tostador donde se produce un calentamiento de la harina por inyección de vapor, produciendo la evaporación del solvente que se recupera mediante una serie de condensadores y separadores.

Hasta aquí se han obtenido dos fracciones: aceite crudo (que puede transformarse en aceite de cocina, lecitina y margarinas) y harina de soja activa desgrasada y desolventizada. Esta última, calentada en forma apropiada para inactivar sus antinutrientes, puede ser utilizada como ingrediente para la preparación de cereales, pan, galletitas, etc. A su vez, también puede utilizarse para la elaboración de un gran número de fórmulas alimentarias como aislados, concentrados, texturizados o análogos.

1.3. Glicosilación de proteínas alimentarias

Las proteínas alimentarias son un componente fundamental en la dieta, necesario para la supervivencia de animales y humanos. Nutricionalmente, proveen una adecuada cantidad y calidad de aminoácidos [39]. Además de su valor nutricional, las proteínas alimentarias pueden proveer propiedades funcionales únicas que afectan el comportamiento durante la preparación, el procesamiento y el almacenamiento de determinados alimentos. También contribuyen con la calidad y atributos sensoriales de los mismos. Estas propiedades funcionales son: solubilidad, capacidad de retención de agua, propiedades espumantes, gelificantes, emulsificantes y de unión a grasas [40]. Estas propiedades son atribuidas a factores tanto intrínsecos (estructura molecular, composición) como extrínsecos (temperatura, pH, presencia de compuestos químicos). Cuando estos factores son alterados, las propiedades funcionales de las proteínas cambian también. En particular, durante el procesamiento de alimentos, las propiedades funcionales pueden perjudicarse debido a la exposición a factores extrínsecos.

La glicosilación es un método efectivo para mejorar las propiedades funcionales de proteínas alimentarias en general e incluso puede otorgar nuevas propiedades funcionales [41]. Existen en la bibliografía varias técnicas que permiten preparar glicoproteínas sintéticas [42-46].

En particular, los glicoconjugados entre proteínas y polisacáridos utilizando la reacción de Maillard han recibido mucha atención en los últimos años. La reacción de Maillard, descubierta por primera vez por el químico francés Louis-Camille Maillard (1912), es una forma compleja de pardeamiento no enzimático que resulta de una reacción química entre un grupo amino libre y un residuo carbonilo (generalmente un azúcar reductor). Varios factores en la reacción, como la temperatura, el tiempo, el pH, la actividad de agua (a_w), las propiedades intrínsecas de las proteínas y de los azúcares y la relación grupo amino:azúcar reductor influyen en el rendimiento y la producción de diferentes productos de la reacción de Maillard (MRPs) [47]. Como consecuencia, se modifican las propiedades fisicoquímicas, estructurales y funcionales de las proteínas alimentarias. Debido a que las condiciones de reacción son suaves y seguras debido a que no se necesitan químicos extraños, esta reacción es superior a otros tipos de modificaciones químicas de proteínas alimentarias y posee, por lo tanto, una prometedora aplicación en lo que respecta a modificaciones químicas de proteínas alimentarias en la industria. Ya ha sido ampliamente documentado que la glicosilación vía Maillard puede mejorar muchas propiedades funcionales importantes en proteínas alimentarias, como informaron Oliver y col. (2006) [41].

Existen numerosos casos documentados donde las propiedades funcionales de las proteínas alimentarias pueden ser enormemente mejoradas a través de la reacción de Maillard. La glicosilación aumenta significativamente la solubilidad proteica [48-52], la estabilidad térmica [53-57], las propiedades emulsionantes [51, 58-61], las propiedades espumantes [62-66], la actividad antioxidante [67-69], la actividad antimicrobiana o bactericida [54, 70-72] y las propiedades texturales [73-75].

Por otro lado, las propiedades fisicoquímicas y estructurales de los glicoconjugados también se ven afectadas ampliamente [58, 76-78]. Por lo tanto, estudios sobre la extensión de la glicosilación, el punto isoeléctrico, la hidrofobicidad superficial, el comportamiento reológico, la microestructura y la conformación espacial de los glicoconjugados son cruciales para lograr un mayor entendimiento de la relación estructura-función de estas proteínas glicosiladas.

1.3.1. Química de la reacción de Maillard

Los MRPs proveen gustos, aromas y colores de gran interés y otorgan estas características a una gran variedad de alimentos. Louis-Camille Maillard descubrió por primera vez la reacción en 1912 y el primer esquema de la reacción de Maillard fue propuesto en 1953 por Hodge (1953) (Figura 1.3) [79]. En la actualidad, la reacción de Maillard puede ser dividida en tres etapas: temprana, avanzada, y final.

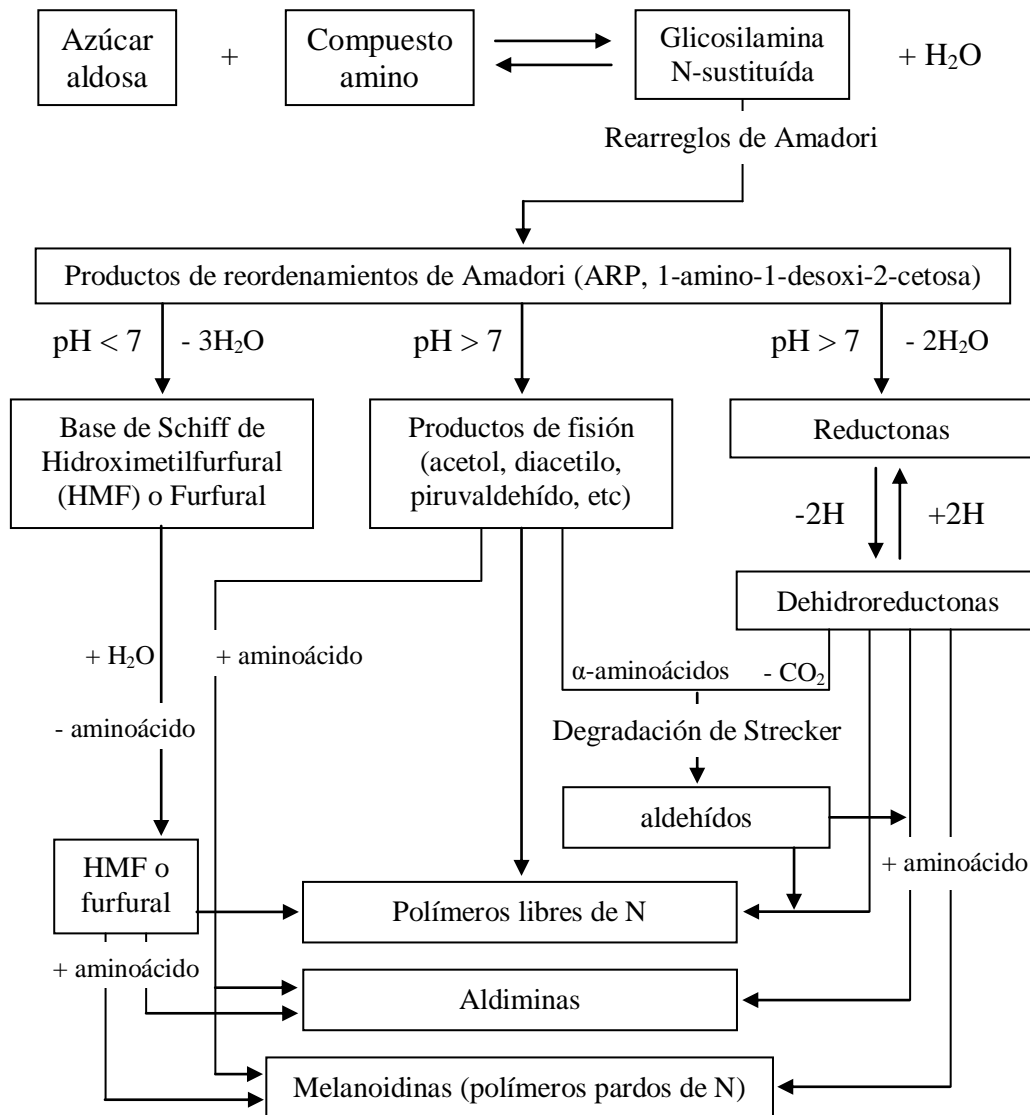


Figura 1.3. Esquema de la reacción de Maillard (Liu et al., 2012) [1].

En una etapa temprana, donde las proteínas no sufren importantes alteraciones estructurales ni hay producción de color, un grupo carbonilo libre (que procede normalmente de un azúcar reductor como la glucosa) se condensa con un grupo amino

libre de un aminoácido, principalmente el ϵ -amino de un residuo de Lys, o también incluso el α -amino de un residuo aminoacídico terminal, para formar una base de Schiff con la liberación de una molécula de agua. La base de Schiff se cicla posteriormente para formar la glicosilamina N-sustituida correspondiente, la cual es muy inestable y sufre un reordenamiento irreversible llamado “reordenamiento de Amadori” para formar el producto de reordenamientos de Amadori (ARP): 1-amino-1-desoxi-2-cetosa, el cual es el primer producto estable de la reacción [80]. Si el azúcar de partida es una cetosa, el producto final de esta etapa de reordenamiento debe su nombre a Heyns y se obtiene la correspondiente 2-amino-2-desoxi-1-aldosa (HRP) [81].

En la etapa avanzada, se produce la degradación del ARP/HRP que conducen a la formación de una gran variedad de compuestos intermediarios de reacción pobremente caracterizados, muchos de ellos con un aroma y sabor característicos [82]. Dependiendo del pH del sistema, se pueden distinguir dos mecanismos principales de degradación. A pH < 7, se lleva a cabo la 1,2-enolización, dando lugar a compuestos 1,2-dicarbonilo, con la formación mayoritaria de furfural o hidroximetilfurfural (HMF) cuando se encuentran involucradas pentosas y hexosas, respectivamente. A pH > 7, se postula que la degradación involucra principalmente la 2,3-enolización dando lugar a compuestos 2,3-dicarbonilo, donde se generan compuestos reductores como la 4-hidroxi-5-metil-2,3-dihidro-3-furanona, y una variedad de productos de fisión, incluidos el acetol y el piruvaldehído. Todos estos compuestos son altamente reactivos e involucran reacciones posteriores. Los grupos carbonilos pueden condensarse con grupos aminos libres, lo que resulta en la incorporación de nitrógeno en los productos de reacción. Cuando los compuestos dicarbonílicos reaccionan con residuos aminoacídicos se da lugar a la formación de aldehídos y α -aminocetonas. Esta reacción es conocida como la degradación de Strecker. La formación de derivados aminoacídicos durante esta etapa son denominados “productos finales de las etapas avanzadas de la glicosilación” (AGEs), los cuales se suelen caracterizar por presentar fluorescencia [41]. Por otro lado, a pH neutro aún existen controversias sobre cuál es la vía mayoritaria [83-84].

En la etapa final, ocurren reacciones que involucran varias vías divergentes que incluyen ciclaciones, deshidrataciones, retroaldolizaciones, enolizaciones, oxidaciones, fragmentaciones, hidrólisis ácidas, isomerizaciones, reordenamientos, reacciones de radicales libres y condensaciones, lo que conduce a la formación de una gran multiplicidad de compuestos pobremente caracterizados [82, 84-85]. La mayor parte del color no se presenta hasta esta etapa, donde se producen las melonoidinas, oligómeros y

polímeros nitrogenados de alto peso molecular, altamente coloreados e insolubles en agua [82, 86].

A pesar de que el trabajo de Hodge fue muy importante y sus descubrimientos han sido útiles, aún queda un tema controversial sobre el mecanismo de la reacción de Maillard. Primeramente, las estructuras químicas y el mecanismo de formación correspondiente de los productos finales de la glicosilación avanzada han recibido una amplia atención [87-96]. Luego, sólo han sido elucidadas estructuras parciales de las melanoidinas debido a su difícil aislamiento y elevada complejidad estructural [82, 97].

1.3.2. Factores que afectan la reacción de Maillard

Debido a que la glicosilación de proteínas alimentarias a través de la reacción de Maillard presenta como objetivo principal mejorar las propiedades funcionales de las mismas, es fundamental el control del grado de avance de la reacción a través de la selección adecuada de los factores que influyen en los cambios fisicoquímicos y estructurales de los glicoconjugados [1, 78]. Entre estos factores se encuentran:

Naturaleza de los reactantes. En casi todos los casos, los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina (Lys) son la fuente primaria de grupos amino reactivos en las proteínas alimentarias. Existen otros grupos, como el α -amino de un residuo aminoacídico N-terminal, el grupo imidazol de los residuos de histidina, el grupo indol de los residuos de triptófano, y el grupo guanidinio de la arginina que también reaccionan, pero en menor medida [80]. Por otro lado, la reactividad de los carbohidratos que participan en la reacción también depende en gran parte de sus propiedades reductoras. Se ha visto que existe una correlación negativa entre la reactividad de los azúcares con el peso molecular [98-100]. En el caso de los monosacáridos, existe una clara influencia de la electronegatividad del grupo carbonilo, al igual que la presencia de grupos cargados como el fosfato [101].

Concentración de los reactantes y a_w . Si bien la glicosilación de proteínas alimentarias puede suceder en condiciones secas y húmedas, la a_w posee un rol fundamental. En general, al aumentar la a_w ocurre un aumento de la reacción de Maillard hasta un valor máximo a partir del cual la reacción de glicosilación ocurre lentamente debido a una menor concentración de proteínas y carbohidratos reductores (dilución de los reactantes). Además, el agua puede obstaculizar la velocidad de formación inicial y otras etapas de la reacción en donde el agua es generada como un

sub-producto. Diversos autores han reportado que la a_w óptima se encuentra en el rango de 0,5-0,8 [1, 47].

Temperatura y tiempo de tratamiento térmico. Tanto el aumento de la temperatura como el del tiempo de almacenamiento favorecen significativamente las reacciones de glicosilación vía Maillard por un aumento de la reactividad entre el azúcar reductor y el grupo amino. Esto puede explicarse de manera simple a través de la bien conocida ecuación de Arrhenius que explica la dependencia de la temperatura y la constante de velocidad de reacción. Este hecho ha sido estudiado incluso por Louis Maillard y ha sido reportado por diversos autores [84, 102-103].

pH del medio de reacción. Como se ha visto en la sección 1.3.1, el pH del medio de reacción puede influir sustancialmente en el curso de la reacción. De acuerdo a Martins y col. (2001), a pH elevados se favorece la estructura abierta de los azúcares reductores y la desprotonación de los residuos amino libres, es decir, las formas reactivas de ambos reactantes. Esto explicaría en principio por qué la reacción de Maillard es prácticamente inexistente a pH altamente ácido ($\text{pH} < 3$) [84]. Por otro lado, a $\text{pH} > 10$, la reacción es más lenta debido, no solo a la baja disponibilidad de los protones necesarios para los reordenamientos de Amadori y de Heyns, sino también a la degradación química que sufren los residuos aminoácidos [104].

Relación de grupos amino:carbonilo. Existen varios estudios que han demostrado que la reacción de Maillard no solo se ve favorecida por un exceso de azúcares en el medio, sino también al aumentar la relación molar del azúcar reductor:aminoácido [105-107].

1.3.3. Glicosilación de proteínas de soja

Una alternativa al uso directo de los componentes de la soja es aprovecharlos en la elaboración de proteínas glicosiladas. Como se ha descrito anteriormente, en los últimos años se realizaron numerosos estudios que demuestran que la glicosilación de las proteínas alimentarias produce mejoras en sus propiedades interfaciales, sin embargo, la mayoría de estos estudios son escasos con proteínas de soja, y menos aún si la glicosilación se realiza con los propios carbohidratos del grano. Las harinas de soja contienen tanto proteínas de reserva como de suero, e hidratos de carbono, componentes que pueden ser inducidos en condiciones adecuadas a su interacción para generar especies con diferentes grados de glicosilación y de agregación proteica.

El proceso habitual usado a nivel industrial para inactivar los factores antitripticos en las harinas de soja desgrasadas es el calentamiento con vapor de agua a más de 100°C, lo cual produce una importante pérdida de solubilidad y dispersibilidad proteica y un dado grado de glicosilación proteica. Por otra parte, se ha informado que la glicosilación y reacciones de entrecruzamiento, pueden ser efectivas para reducir la actividad antitriptica de harinas de soja [76].

El presente trabajo propone la obtención de harinas de soja con proteínas glicosiladas por distintos tratamientos térmicos de harina de soja, homogeneizadas de diferente forma. A diferencia de trabajos anteriores [59, 62, 76, 108-110], en la reacción de glicosilación se emplearán los carbohidratos propios de la soja. Los efectos de dicho pardeamiento no enzimático sobre las propiedades estructurales y funcionales se evaluarán por métodos instrumentales (calorimetría diferencial de barrido, DSC y espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier, FTIR, reología, difracción láser, microscopía) y otros usualmente utilizados para evaluar la calidad proteica en harinas de soja, como la solubilidad proteica en agua destilada e KOH 0,2% P/P [111], contenido de Lys glicosilada [112] y actividad antitriptica y ureásica [113].

1.4. Agregación y gelación ácida de proteínas de soja

La gelificación o gelación proteica es una de las propiedades funcionales de mayor relevancia industrial en el Área de la Química-Física y de la Tecnología de Alimentos. Además de aplicarse a la formación de geles sólidos viscoelásticos, se utiliza para mejorar la absorción de agua, el espesado, la unión de partículas (adhesión) y para estabilizar emulsiones y espumas. Aunque están bien establecidas las condiciones prácticas para la gelación de las diversas proteínas, no se logra fácilmente su optimización a causa de factores ambientales, tratamientos previos de la proteína, condiciones de proceso, adición de otros polímeros, etc. [114].

Los SPI son buenos agentes gelificantes debido a su capacidad para asociarse entre sí y formar una red tridimensional que se extiende en todo el volumen del sistema. La organización estructural y las interacciones de las moléculas proteicas dentro de la red determinan la reología, estabilidad, aspecto y capacidad de retención de agua del gel.

Estudios realizados en geles de SPI formados a partir de tratamiento térmico muestran que probablemente las fuerzas moleculares involucradas en la formación de la red de gel sean puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas [115]. Pero en los últimos años ha cobrado interés la gelación de proteínas globulares a temperatura

ambiente, llamada “gelación fría”. Esta se compone de dos etapas consecutivas: en la primera, se forman agregados proteicos por calentamiento de la solución proteica a pH lejanos al pI; luego del enfriamiento, los agregados permanecen solubles y pueden ser almacenados por días sin cambiar significativamente su tamaño. En la segunda etapa, se induce la gelación por adición de sales o disminución del pH [116]. Estos geles, obtenidos a partir de proteínas desnaturalizadas, presentan microestructuras de finas hebras [114]. Debido a que la gelación en frío permite que la estructura de gel sea introducida sin calentamiento del producto final, puede ser una alternativa atractiva de los ingredientes espesantes corrientemente utilizados [117].

Los SPI pueden formar geles a pH cercanos al pI de las principales proteínas que los conforman, previa desnaturalización térmica de las mismas, proceso base de postres ácidos (semejantes a un yogurt) [118-119]. Cuando el pH disminuye se produce un aumento de las interacciones proteína-proteína, debido al descenso de la carga neta en el pI. La diferencia en la velocidad del proceso puede afectar el grado de dureza y elasticidad del gel formado. Cuando los geles ácidos se forman lentamente muestran un aumento de dureza y una disminución de la elasticidad, debido probablemente a la unión lenta y continua de las partículas. Sin embargo, mayores velocidades de acidificación conducen a geles más frágiles y con mayor capacidad de retención de agua [120].

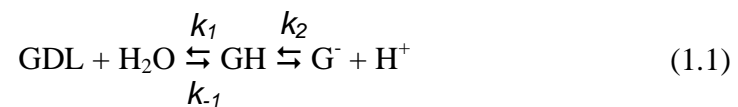
En sistemas concentrados, el comportamiento viscoelástico de los geles macromoleculares está vinculado con la naturaleza y la velocidad de los reordenamientos configuracionales de las macromoléculas, y con el tipo y número de uniones intermoleculares [121]. Es decir, que las diferentes maneras de promover la gelificación proteica afectan la velocidad del proceso de agregación y, por tanto, las propiedades físicas y mecánicas del gel formado, como la textura y la capacidad de retención de agua del producto. Esta propiedad funcional puede verse afectada también por variaciones de las condiciones de proceso, como temperatura, contenido de sales, combinación de ingredientes, etc. La optimización de técnicas que determinen en forma precisa los parámetros vinculados al proceso de gelación, contribuirá a desarrollar una mejor calidad comercial de los productos alimenticios a los que se incorpore SPI como aditivo.

La producción de geles ácidos optimizados, por lo tanto, requiere de la desestabilización y reorganización controlada de las proteínas durante la acidificación. La capacidad de retención de agua, las propiedades reológicas y sensoriales de los geles

biopoliméricos particulados dependen en forma importante de la estructura tridimensional de las partículas a escala microestructural, en la región de 0,1-500 μm [122]. Los datos cuantitativos, tales como el tamaño o la forma de las partículas y/o poros, pueden ser obtenidos por análisis de las imágenes obtenidas por técnicas microscópicas [123]. El establecimiento de la comprensión acerca de la distribución espacial y las interacciones entre las partículas proteicas requiere la utilización de herramientas analíticas capaces de revelar información estructural a diferentes niveles de detalle [124].

La reducción del pH de soluciones proteicas puede realizarse rápidamente (acidificación directa) o lentamente (uso de cultivos lácticos). Dependiendo de la concentración y temperatura, la hidrólisis de la glucono-delta-lactona (GDL) en ácido D-glucónico (GH) puede promover la reducción lenta del pH [125]. Este procedimiento es de práctica común en la investigación de productos lácteos y de hecho también se aplica en la elaboración de ciertos productos. Su uso evita algunas de las dificultades asociadas a la utilización de bacterias lácticas, ya que el pH final del sistema es función de la cantidad de GDL adicionada, mientras que las bacterias producen ácido hasta que se auto inhiben o mueren por el bajo pH del medio.

La GDL es un éster cíclico 1,5-intramolecular del GH. En un medio acuoso se hidroliza hasta una mezcla en equilibrio de GH (55-66 %) y delta- y gamma-lactonas. Además, el GH es un ácido débil y se disocia de acuerdo con la reacción:



Si bien ambas etapas de reacción son, básicamente, reacciones de equilibrio, podemos considerar el primer paso como una degradación de primer orden de reacción a valores de pH superiores a 4,6. Por encima de este pH, la concentración de GH es tan baja que la reacción inversa es insignificante. Además, k_1 es mucho mayor que k_{-1} ; por lo tanto, la cinética de hidrólisis de GDL es considerada de primer orden y escrita como:

$$[\text{GDL}] = [\text{GDL}]_0 e^{-k_1 t} \quad (1.2)$$

donde $[\text{GDL}]_0$ es la concentración inicial de GDL.

Por otro lado, de Kruif y col. (1997), demostraron que:

$$\frac{\partial \ln(t_{ag})}{\partial \frac{1}{T}} = \frac{\Delta H_{hidrólisis}}{R} \quad (1.3)$$

donde t_{ag} es el tiempo necesario para que las proteínas agreguen, T es la temperatura absoluta y $\Delta H_{hidrólisis}$ es la variación de entalpía de reacción implicada en la hidrólisis de la GDL. Por lo tanto, el t_{ag} dependerá fuertemente de la cinética de hidrólisis de la GDL, que a su vez está vinculada con la T [125].

En este estudio se analizó el efecto de la T sobre los procesos de agregación y gelación de SPI inducidos por la GDL. También se evaluaron las posibles modificaciones en el proceso de agregación del SPI debido a la presencia de proteínas del suero de soja obtenidas por precipitación con sulfato de amonio (WSP). El objetivo fue investigar las concentraciones de estas últimas que optimicen el proceso de agregación de los SPI. Este estudio puede ser de interés para la industria alimentaria debido a la presencia simultánea de las proteínas de reserva y del suero de soja en productos integrales como harinas y concentrados.

1.4.1. Geles ácidos de harina de soja (símil tofu)

El queso de soja o tofu es parte de la cocina tradicional en el este de Asia y es un producto vegetariano de consumo masivo en todo el mundo. Durante su típico proceso de elaboración, los porotos de soja son remojados, molidos en agua y filtrados para producir la leche de soja. La leche de soja es luego calentada por encima de los 90°C durante más de 10 min. Luego, a través de la adición de agentes coagulantes, se logra su gelación a 80°C. Estos tratamientos térmicos promueven la disociación, desnaturalización y agregación de las proteínas de soja, la inhibición del crecimiento microbiano, la reducción del “*flavour* de poroto”, y la inactivación de componentes indeseables como los inhibidores de tripsina y la lipooxigenasa [126-127]. Sin embargo, estos procesos de reajuste de T durante la producción de tofu consumen enormes cantidades de energía.

Por otro lado, solo el 53% del poroto de soja (en base seca) se convierten en el producto final, de manera que el resto permanece en un residuo llamado okara. En promedio, el okara contiene 28,5% de proteína, 9,8% de aceite, 55,5% de fibra dietaria, 2,6% de carbohidratos y 3,6% de cenizas [126, 128]. Además de los macronutrientes, la

fibra dietaria del okara es considerada un macronutriente alimenticio benéfico ya que posee un efecto positivo en la salud humana [129]. Sin embargo, la corta vida de estantería, el “*flavour* de poroto”, la textura fibrosa, el gusto desabrido y el pardeamiento durante el procesamiento de secado limita la utilización del mismo. Por lo tanto, en el presente trabajo se propone investigar la posibilidad de utilizar harina desgrasada de soja, subproducto obtenido a partir de la separación industrial del aceite de soja, para la producción de producto similar al tofu. Por un lado, esta puede ser la solución para resolver el problema de la utilización de un producto comúnmente descartado como el okara. Por otro lado, también se lograría mejorar el aprovechamiento de un mayor porcentaje del poroto de soja de manera tal de reducir los costos de producción.

Por otra parte, es de esperar que la conjugación de los carbohidratos de soja a las proteínas de soja por reacciones de Maillard promueva cambios en la estructura proteica, esperándose obtener geles con propiedades diferenciadas [1].

1.4.2. Microestructura de los geles ácidos

El efecto del pH en la microestructuración de los geles ha sido caracterizado por medio de diferentes técnicas microscópicas [130]. La microscopia óptica convencional (OCM) tiene la ventaja de tener una preparación de las muestras más sencilla, un menor costo de mantenimiento del equipo y no requerir personal especializado para su manipulación en comparación con otras técnicas microscópicas más avanzadas como la microscopia confocal de barrido láser (CLSM) [131].

Por otra parte, Langton y Hermansson (1996) demostraron que el análisis de imágenes proporciona una herramienta para la caracterización de los geles proteicos y la información brindada por este estudio permite comprender cómo se construye el entramado del gel y como este entramado se ve afectado por las condiciones de elaboración empleadas [132]. El análisis textural de imágenes se ha aplicado en gran medida en la industria alimentaria para la evaluación de la calidad e inspección del producto obtenido [133-134].

1.5. Emulsiones alimentarias

Estos sistemas tienen gran importancia en la industria alimentaria ya que están presentes en muchos alimentos, tanto naturales (leche y crema) como elaborados (queso, helado, mayonesa, entre otros). En general, en estas emulsiones la fase dispersa

es un aceite o una grasa, y la fase acuosa continua contiene generalmente proteínas, polisacáridos, componentes solubles (como sales minerales, saborizantes, conservantes, vitaminas, azúcares) y otros surfactantes no proteicos [135].

1.5.1. Definición y clasificación de emulsiones

Una emulsión consiste en dos líquidos inmiscibles, generalmente una fase acuosa y otra lipídica, de manera tal que uno de ellos se encuentra disperso en el otro en forma de gotas esféricas. Desde el punto de vista fisicoquímico, debido a la falta de estabilidad termodinámica, es decir, a la tendencia de separación espontánea de sus fases, las emulsiones se clasifican como dispersiones coloidales lióforas. La sustancia que forma las gotas es denominada fase dispersa, discontinua o interna, mientras que la sustancia que rodea a las gotas es llamada fase dispersante, continua, o externa. Por otra parte, las emulsiones pueden clasificarse de acuerdo a la distribución espacial de las fases, en emulsiones O/W o W/O. Si el sistema consiste en gotas de fase lipídica dispersa en una fase acuosa, la emulsión se llama aceite en agua y se simboliza como O/W (por sus siglas en inglés). Ejemplos de este tipo de emulsiones son las mayonesas, los aderezos y las sopas. Por el contrario, en las emulsiones agua en aceite o W/O (por sus siglas en inglés), es la fase acuosa la que se encuentra dispersa en la fase lipídica. Ejemplos de emulsiones W/O son la margarina y la manteca [136].

1.5.2. Formación de las emulsiones

Debido a que la formación de una emulsión no es un proceso espontáneo, es necesario utilizar energía mecánica para poder hacerlo. El proceso de convertir dos líquidos inmiscibles en una emulsión se denomina homogeneización, mientras que el dispositivo diseñado para llevarlo a cabo recibe el nombre de homogeneizador, el cual suministra la energía mecánica necesaria. Además, para incrementar la estabilidad en el tiempo de una emulsión, se suelen adicionar sustancias llamadas agentes emulsificantes.

Durante la formación de las gotas a partir de la interfase entre dos líquidos, el área interfacial aumenta considerablemente (ΔA), de manera que la energía libre interfacial (ΔG_{interf}) del sistema se incrementa en una cantidad $\gamma \times \Delta A$, donde γ es la tensión interfacial. Sin embargo la formación de gotas no es el único proceso que tiene lugar durante la preparación de una emulsión. Se pueden distinguir tres procesos críticos: formación y ruptura de las gotas, adsorción del agente emulsificante en la

interfase (si lo hubiere) y asociación de gotas para formar una gota de mayor tamaño (coalescencia).

Durante el proceso de homogeneización, la interfase entre las dos fases líquidas inmiscibles se deforma en tal extensión que comienzan a producirse gotas, en su mayoría de tamaño muy grande. Estas gotas deben deformarse y romperse para formar gotas de menor tamaño, por fuerzas de ruptura. Las gotas de un líquido en otro que es inmiscible, tienden a adoptar una forma esférica para minimizar la energía libre interfacial.

La fuerza interfacial responsable de la forma esférica está dada por la ecuación de Laplace:

$$\Delta P_L = \frac{4 \times \gamma}{D} \quad (1.4)$$

donde ΔP_L es la diferencia de presión entre el interior y el exterior de la gota, γ es la tensión interfacial y D es el diámetro de la gota. Las fuerzas interfaciales ejercen una presión hacia el interior, que es mayor cuanto menor es el diámetro de las gotas y mayor la tensión interfacial [136].

Durante la formación de una emulsión, el agente emulsificante debe adsorberse en la interfase, disminuyendo la γ . Este proceso disminuye ΔP_L (ecuación 1.4), lo cual facilita la deformación y, en consecuencia, la ruptura y formación de gotas de menor tamaño. Además, la formación de un film interfacial desfavorece la coalescencia de las gotas recién formadas. Estos dos últimos procesos que involucran al agente emulsificante son fundamentales en el tamaño obtenido de las gotas formadas durante la homogeneización. El transporte de las moléculas de un agente surfactante (agente que disminuye γ) hacia la interfase durante el proceso de homogeneización no está determinada por difusión sino por convección [137]. Por lo tanto, es sumamente importante que el agente emulsificante recubra la interfase creada en una escala de tiempo similar a la del proceso de homogeneización. En caso de que la adsorción sea muy lenta en comparación con la capacidad del homogeneizador de generar área interfacial, se produce el proceso de coalescencia de las gotas recién formadas. Esto determina que el proceso de formación de la emulsión no sea eficiente [138].

1.5.3. Estabilidad de las emulsiones

Al considerar la estabilidad de una emulsión, es importante distinguir entre la estabilidad termodinámica y la estabilidad cinética. La termodinámica trata sobre la posibilidad de que un proceso pueda ocurrir o no de manera espontánea; en cambio la cinética se refiere a la velocidad con la que dicho proceso tiene lugar. Como se mencionara previamente, $\Delta G_{\text{interf}} = \gamma \times \Delta A$ y, por consiguiente, la formación de una emulsión es un proceso termodinámicamente desfavorable debido al incremento de área interfacial después del proceso de homogeneización ($\Delta A > 0$). Sin embargo, se puede lograr que una emulsión termodinámicamente inestable pueda existir en un estado metaestable y ser cinéticamente estable.

La estabilidad cinética de las emulsiones se atribuye a la naturaleza dinámica de estos sistemas bifásicos. Las gotas de una emulsión, lejos de permanecer estáticas están en continuo movimiento y colisionan unas con otras debido al movimiento browniano, la gravedad o fuerzas externas aplicadas. Si las gotas se alejan o se fusionan después de una colisión depende de la naturaleza de las interacciones coloidales entre ellas. Por lo tanto la estabilidad cinética de las emulsiones está determinada por la dinámica y las interacciones de las gotas que contienen [135].

En el caso de que las emulsiones estén estabilizadas por proteínas, en base a las características estructurales de estas macromoléculas, las interacciones electrostáticas son muy importantes lejos del punto isoeléctrico (carga neta elevada) y se hacen despreciables cerca de éste, en el cual se intensifican las interacciones de carácter hidrofóbico [136].

1.5.4. Mecanismos de desestabilización de emulsiones

La estabilidad de una emulsión es la capacidad que posee la misma en mantener sus propiedades en el tiempo. Desde el momento que se forma una emulsión, inmediatamente después de la homogeneización (y a veces durante), comienza el proceso de desestabilización, el cual tiende a disminuir el área interfacial y llegar al estado termodinámico más estable, es decir, las fases separadas. En el caso particular de las emulsiones alimentarias, los cambios producidos por la desestabilización deben controlarse para que las características de la emulsión se mantengan dentro de un rango de valores estrechos, fuera del cual ya no sería posible su utilización o comercialización. La pérdida de estas propiedades puede deberse a fenómenos físicos (cambios en el tamaño y/o distribución espacial de las gotas) y/o químicos (oxidación, lipólisis, etc).

Los procesos de desestabilización física pueden ocurrir por diferentes mecanismos y se resumen en el esquema de la Figura 1.5.

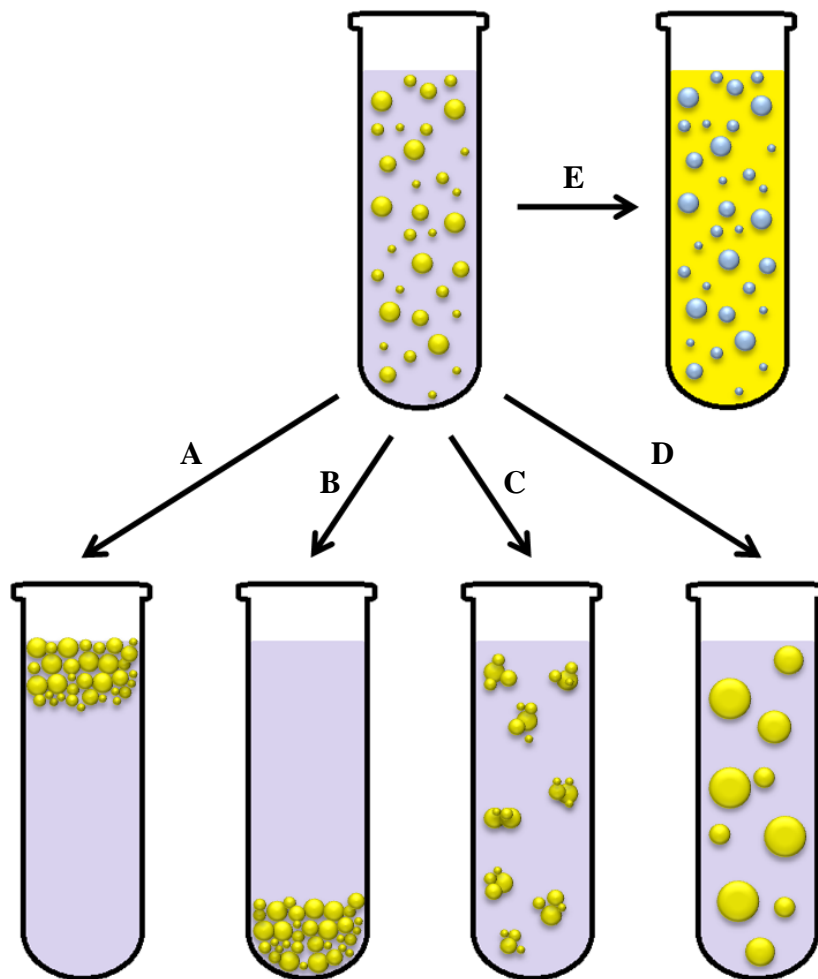


Figura 1.5. Mecanismos físicos principales a través de los cuales se pueden desestabilizar las emulsiones: cremado (A), sedimentación (B), floculación (C), coalescencia (D) e inversión de fases (E).

El cremado y la sedimentación son dos procesos de desestabilización física que se fundamentan en la separación gravitacional. Durante el cremado se produce un movimiento de las gotas hacia la parte superior debido al hecho que la fase dispersa presenta una densidad menor que la fase dispersante, mientras que durante la sedimentación se produce un movimiento de las gotas hacia abajo debido a que las mismas poseen una densidad mayor que el medio circundante (Figura 1.5 A y B, respectivamente). En general (aunque no de manera exclusiva) el cremado es más común en emulsiones O/W y la sedimentación, en emulsiones W/O. Durante el proceso

de cremado se forma una fase inferior o suero, la cual está empobrecida en gotas y una fase superior enriquecida en gotas, la fase crema.

La floculación y la coalescencia son dos tipos de mecanismos que involucran la asociación de las gotas (Figuras 1.5 C y D, respectivamente). La diferencia reside en que durante la floculación, dos o más gotas se asocian para formar un agregado en donde cada una de ellas mantiene su integridad individual, mientras que durante la coalescencia esas gotas asociadas se unen para conformar una gota de mayor tamaño y, por lo tanto, implica la ruptura del film interfacial. Incluso, una coalescencia extensiva puede conducir eventualmente a la formación de una capa de aceite en la parte superior de la muestra, proceso conocido como *oiling-off* (Figura 1.6).

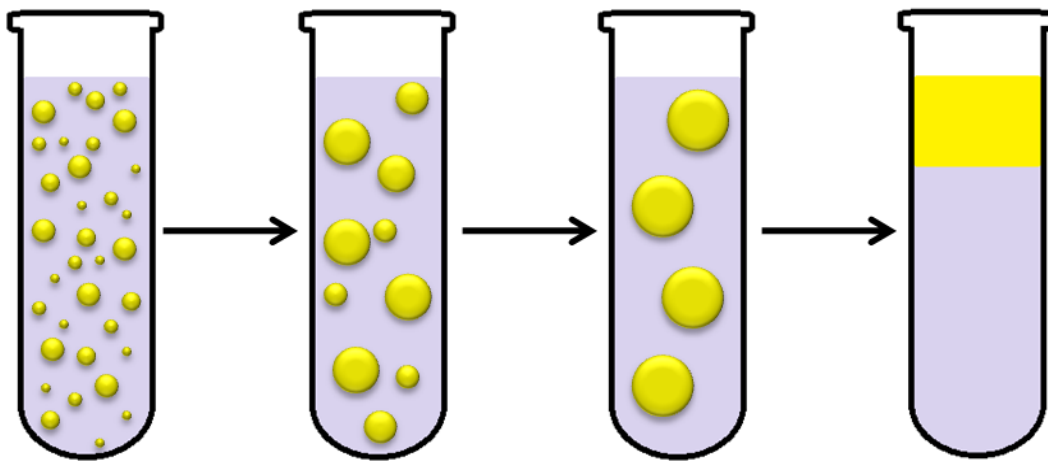


Figura 1.6. Representación gráfica del proceso de desestabilización por coalescencia seguida por *oiling-off*.

La inversión de fases es el proceso donde el cual una emulsión O/W es convertida en una emulsión W/O y viceversa debido a alteraciones en la composición o en las condiciones a la que se somete una emulsión, como cambios de T, agitación mecánica, tipo de emulsificante, etc. Este mecanismo de desestabilización es muy importante en la manufactura de algunos productos alimenticios, como la margarina y la manteca. La base de este fenómeno es muy compleja y se cree que involucra aspectos fisicoquímicos de floculación, coalescencia, coalescencia parcial (cuando las gotas son semicristalinas) y formación de emulsiones [135].

Es importante destacar que los mecanismos de desestabilización mencionados no ocurren de manera separada o aislada. Una emulsión puede desestabilizarse simultáneamente por distintos mecanismos, dependiendo de la viscosidad de la fase

continua, el tipo de agente emulsificante empleado y su concentración inicial en la fase acuosa (u oleosa), la proporción utilizada de fase dispersa y dispersante, la adición de otros componentes (sales, azúcares), el pH y la aplicación de distintos tratamientos, como ser trabajo mecánico, ciclos de calentamiento o congelación [136].

1.5.5. Agentes emulsificantes

De acuerdo a la sección 1.5.2, un buen agente emulsificante debe tener la capacidad de adsorberse rápidamente en la interfase aceite/agua y prevenir la coalescencia durante el proceso de homogeneización y disminuir la tensión interfacial de manera significativa. Además, es esperable que la membrana interfacial formada prevenga la asociación posterior de las gotas (floculación y/o coalescencia) para evitar la desestabilización de la emulsión durante el transporte, almacenamiento y utilización final del producto.

En general, los agentes emulsificantes son moléculas de carácter anfifílico que se adsorben en la interfase aceite/agua durante la preparación de una emulsión. Estas moléculas tienen la particularidad de tener regiones polares que se orientan preferentemente hacia la fase acuosa y regiones no polares que interactúan favorablemente con la fase lipídica. En una emulsión (tanto O/W como W/O), el contacto directo entre las moléculas de aceite y de agua son reemplazados por contactos entre las regiones no polares del agente emulsificante y la fase oleosa y entre las regiones polares y la fase acuosa. Estas interacciones son más favorables desde el punto de vista termodinámico, dando como resultado una acumulación del agente emulsificante en la interfase, disminuyendo el contacto entre las moléculas de aceite y agua, y, por ende, produciéndose un descenso de γ entre ambas fases.

Los agentes emulsificantes más empleados en la industria alimentaria son los agentes surfactantes de bajo peso molecular, como los monoglicéridos, los monoglicéridos esterificados con ácidos orgánicos y las lecitinas, y los biopolímeros anfifílicos como las proteínas y algunos polisacáridos.

Los agentes surfactantes presentan una estructura general R-X, donde R es siempre una cadena lateral de ácidos grasos (“cola hidrofóbica”) y X es un grupo de carácter hidrofílico (“cabeza polar o hidrofílica”). Las cadenas laterales de ácidos grasos pueden ser saturadas o insaturadas, lineales o ramificadas y alifáticas o aromáticas, e interactúan con la fase oleosa durante la formación de la emulsión. La naturaleza de

los grupos polares también es muy variada: los grupos pueden ser no iónicos, aniónicos, catiónicos o iónicos mixtos.

Los biopolímeros anfifílicos, por otro lado, presentan actividad interfacial debido a que poseen porciones hidrofílicas e hidrofóbicas. Mientras las proteínas, en general, poseen residuos aminoacídicos polares o cargados y residuos aminoacídicos apolares o no cargados, algunos polisacáridos pueden presentar, por ejemplo, cadenas laterales apolares en un esqueleto polar. Además, las membranas interfaciales formadas pueden prevenir la asociación de las gotas a través de diferentes mecanismos que pueden ser del tipo estérico, electrostático y de exclusión preferencial de solvente.

Es de destacar que la velocidad de adsorción del biopolímero, la conformación adoptada y las propiedades fisicoquímicas de la membrana formada en la interfase depende de la estructura molecular y sus interacciones. Por lo tanto, para que una proteína pueda ser un buen agente emulsificante se requiere, además de su carácter anfifílico, una elevada solubilidad proteica y una alta flexibilidad estructural, debido a que esto asegura un rápido cambio conformacional en la interfase agua/aceite durante el proceso de homogeneización [135].

Algunos de estos biopolímeros funcionales son componentes integrales de ingredientes utilizados en la manufactura de los alimentos (leche, huevo, harina) mientras que otros han sido aislados y posiblemente modificados de su fuente para ser vendidos como ingredientes especiales (aislados o concentrados proteicos e hidrocoloides) [136].

1.5.5.1. Las proteínas como agentes emulsificantes

A pH lejanos del pI, las membranas interfaciales formadas por las proteínas son comúnmente delgadas y presentan carga eléctrica neta. Esta última característica es la que previene, en mayor medida, la asociación de las gotas a través de la repulsión electrostática [135]. En consecuencia, la estabilización proteica es particularmente sensible al pH y a la fuerza iónica del medio, de manera tal que la emulsión tenderá a la floculación a pH cercanos al pI de las proteínas adsorbidas y a fuerza iónica elevada.

Si bien existen numerosos trabajos donde se demuestran las propiedades emulsificantes de las proteínas de soja, estos se basan sólo en fracciones purificadas o parcialmente purificadas de las mismas [9-10, 139-141].

1.5.5.2. Los polisacáridos como agentes emulsificantes

Aunque en la sección 1.5.5 se mencionó la existencia de polisacáridos anfifílicos con actividad superficial, la mayoría los polisacáridos hidrosolubles están formados por unidades monoméricas que tienen afinidad casi exclusivamente por la fase acuosa de manera que no tienen tendencia a adsorberse en la interfase agua/aceite. Además, la capacidad de adsorción interfacial está también limitada por restricciones estructurales como la capacidad de rotación por medio de los enlaces glicosídicos [142]. Sin embargo, en emulsiones O/W, estos polisacáridos pueden aumentar la estabilidad de una emulsión debido a un incremento en la viscosidad de la fase continua, lo cual dificulta la movilidad de las gotas [136, 143].

Por otro lado, existen algunos estudios que han demostrado que varios tipos de polisacáridos han sido capaces de reducir la tensión interfacial de la interfase aceite/agua de manera tal de formar emulsiones estables, entre ellos los galactomananos, las pectinas y el quitosano [37, 144]. Sin embargo, aún existe debate sobre el origen de su actividad superficial. Por ejemplo, se cree que puede ser debido a regiones apolares propias del polisacárido o a la presencia de contaminantes proteicos (libres o asociados al polisacárido). Incluso se pone en duda si la habilidad de estabilizar emulsiones proviene principalmente de su actividad interfacial o sólo de la propiedad de incrementar la viscosidad de la fase acuosa [135]. De hecho, y tal como se ha mencionado en la sección 1.2.2, para el caso de polisacáridos de soja, se han publicado algunos trabajos donde se propone que es la asociación a proteínas la responsable de las propiedades emulsionantes [36-37].

1.5.5.3. Combinación proteína-polisacárido como agente emulsificante

Mientras que las proteínas tienden a ser mejores que los polisacáridos para la producción de gotas de menor tamaño durante la homogeneización, los polisacáridos tienden a ser superiores a las proteínas para estabilizar emulsiones en condiciones más adversas de pH, fuerza iónica y/o T. Por lo tanto, es esperable que la combinación de ambos biopolímeros sea altamente provechosa en la estabilización de emulsiones alimentarias.

Las proteínas y los polisacáridos se pueden combinar de manera individual como mezclas, o también pueden ser utilizados como complejos proteína-polisacáridos a través de su unión por interacciones físicas o covalentes. Ejemplo de estas últimas es la reacción de Maillard [136, 145].

OBJETIVOS

Objetivo General:

Elaborar nuevos ingredientes funcionales compuestos por proteínas de reserva y/o de suero de soja con distintos grados de agregación y glicosilación, empleando los propios carbohidratos presentes en las materias primas de partida, con vistas a ser empleados en alimentos con acidez y contenido salino variable.

Objetivos Específicos:

- Evaluar la agregación y gelación ácidas de aislados proteicos de soja.
- Obtener harinas de soja con proteínas glicosiladas con los hidratos de carbono intrínsecos.
- Valorar el grado de glicosilación, desnaturalización y agregación proteica y la actividad antitriptica y ureásica de las muestras glicosiladas.
- Evaluar las propiedades funcionales de las muestras glicosiladas: solubilidad, gelación ácida y poder emulsificante.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales y preparación de soluciones

2.1.1. Soluciones de SPI

El SPI se preparó siguiendo los procedimientos detallados por Sorgentini y Wagner (1999), a partir de harina de soja desgrasada (Solae Latin America, San Pablo, Brasil), sin tratamiento térmico y desolventizada en condiciones suaves ($90,7 \pm 0,2$ % P/P , $N \times 6,25$) [13]. Las soluciones de SPI se prepararon por disolución del mismo en agua destilada a una concentración proteica (%Prot) de $0,25$ % P/P , $0,5$ % P/P , $0,625$ % P/P y 1 % P/P para ensayos de agregación y 3 % P/P para ensayos reológicos. Luego fueron sometidas a tratamiento térmico a 100°C durante 5 min en baño termostático para lograr la desnaturalización proteica. A continuación, se enfriaron rápidamente en baño de agua-hielo para evitar precipitación y por último se permitió que la muestra alcance nuevamente la T ambiente.

2.1.2. Soluciones de mezclas SPI/WSP

Los WSP se prepararon siguiendo procedimientos experimentales descritos en trabajos previos [13, 146]. El sobrenadante de la precipitación isoeléctrica (pH 4,5) de las proteínas de SPI se ajustó a pH 8 y se centrifugó ($12.400 \times g$, 15 min, 20°C), para obtener un sobrenadante clarificado, al cual se adicionó sulfato de amonio hasta alcanzar un 90% de saturación. El precipitado resultante de los WSP se separó por centrifugación ($12.400 \times g$, 15 min, 20°C), se lavó con agua destilada, se dializó contra agua destilada durante 24 h y finalmente se liofilizó. El contenido de proteína bruta fue de $(99,0 \pm 0,5)$ % P/P ($N \times 6,25$).

Las soluciones de las mezclas SPI/WSP se prepararon pesando SPI y WSP de manera de lograr una %Prot final, por disolución en agua destilada, de $0,5$ % P/P y 3 % P/P para ensayos de agregación y reológicos respectivamente. Luego fueron sometidas a tratamiento térmico a 100°C durante 5 min en baño termostático y, a continuación, se enfriaron rápidamente en baño de agua-hielo para evitar la precipitación. Por último, se permitió que las muestras alcancen nuevamente la T ambiente. Se ensayaron 3 relaciones proteicas SPI/WSP (% P/P / P/P): 3:1, 1:1 y 1:3 ($0,375/0,125$, $0,25/0,25$, $0,125/0,375$ y $2,25/0,75$, $2,5/2,5$, $0,75/2,25$ para mezclas de $0,5$ % P/P y 3 % P/P de contenido proteico total respectivamente).

2.1.3. Preparación de muestras de harinas glicosiladas

2.1.3.1. Preparación de dispersiones acuosas de harina de soja

La harina de soja desgrasada desolventizada en condiciones suaves (F) fue obtenida a partir del *pellet* desgrasado por molienda utilizando un molino a cuchilla (Chincan modelo FW100, China) y posterior tamizado (tamiz N° 20, IRAM 1501/76-ASTM-E-11-81, 500 μm de poro).

La harina se dispersó posteriormente en agua destilada (10% P/p de sólidos totales) por agitación magnética durante 3 h, para asegurar la completa dispersión e hidratación (dispersión “M”). Una parte de ella se homogeneizó empleando un dispositivo de alta velocidad rotor/estator Ultraturrax T-25 (IKA-Labortechnik, Staufen, Alemania) a 20.000 rpm durante 1 min (dispersión “U”). La otra parte, además de la homogeneización con el equipo Ultraturrax, se sometió a tres ciclos de homogeneización utilizando un homogeneizador a válvula de alta presión (Panda 2K, GEA Niro Soavi; Parma, Italia), obteniendo la dispersión “V”. La presión empleada fue 1.000 bar en la válvula principal y 100 bar en la secundaria.

2.1.3.2. Tratamientos térmicos

A las dispersiones M, U y V se las sometió a diferentes tratamientos térmicos en estufa. En total se obtuvieron 20 muestras las cuales se nombran de acuerdo a las características del tratamiento (Tabla 2.1). La letra “c” (humedad relativa (HR) controlada) indica que el tratamiento térmico a presión atmosférica fue realizado en un desecador con una solución saturada de KBr (HR 79% a 60°C). La letra “c” se omite cuando el tratamiento térmico fue realizado sin control de la HR. Luego de un guion, los primeros números indican la temperatura (°C) a la cual se realizó el tratamiento. Por último, posterior a una barra se indica el tiempo de almacenamiento (h) en estufa.

Cuando fue necesario, las muestras obtenidas luego del tratamiento térmico fueron molidas antes de los ensayos de caracterización. Como control se utilizó la harina de soja desgrasada y activa sin ningún tratamiento previo (F).

Tabla 2.1. Tratamientos térmicos de la harina de soja y nomenclatura utilizada para las muestras glicosiladas.

	T (°C)	79% HR	tiempo (h)	Nomenclatura	
Dispersión 10% ^P / _P Agitación magnética (M)	60	-	14	M-60/14	
		+	24	Mc-60/24	
			48	Mc-60/48	
Dispersión 10% ^P / _P Ultraturrax (U)		-		12	U-60/12
				14	U-60/14
				24	U-60/24
				48	U-60/48
		+		12	Uc-60/12
				14	Uc-60/14
				24	Uc-60/24
				48	Uc-60/48
		Dispersión 10% ^P / _P Válvula (V)	-		14
				24	Vc-60/24
	+			48	Vc-60/48
				12	F-60/12
-			24	F-60/24	
			48	F-60/48	
+			12	Fc-60/12	
			24	Fc-60/24	
	48		Fc-60/48		

2.1.4. Preparación de dispersiones de harinas glicosiladas para la evaluación de la gelación ácida

Para los ensayos reológicos y microestructurales de geles ácidos de las muestras seleccionadas se prepararon dispersiones acuosas al 3% ^P/_P de proteína bruta. Luego de su agitación magnética durante 30 min, las mismas fueron sometidas a desnaturalización proteica a través de tratamiento térmico a 100°C durante 5 min en baño termostático. A continuación, se enfriaron rápidamente en baño de agua-hielo para evitar precipitación proteica y, por último, se permitió que alcancen nuevamente la temperatura (T) ambiente.

2.1.5. Soluciones para la evaluación de proteína soluble en las muestras glicosiladas

Se prepararon dispersiones (1 mg/mL) de cada una de las muestras de harina glicosilada obtenidas. Se pesó una masa aproximada de 10 mg (exactamente conocida para cada caso) y se mantuvo bajo agitación magnética durante 1 h con 10 g de agua

destilada. Luego se centrifugó a $10.500\times g$ durante 20 min a 20°C y se reservó el sobrenadante para determinar la concentración proteica.

2.1.6. Soluciones para la determinación de Lys glicosilada (LG)

Se pesaron 20-30 mg de cada muestra y se adicionó *buffer* Na_3PO_4 10 mM pH 7 con dodecil sulfato de sodio (SDS) 1% P/V hasta alcanzar 20 g totales, sellando posteriormente con *film*. Se realizó un tratamiento térmico en baño en ebullición durante 30 min, con posterior enfriamiento en baño de agua/hielo. Las pérdidas de agua por evaporación se compensaron agregando agua destilada hasta llegar a la masa inicial. Luego se centrifugó a baja velocidad (15 min a $200\times g$) y el sobrenadante se utilizó para la determinación de Lys reactiva.

2.1.7. Preparación de extractos para la determinación de actividad antitriptica (AA)

Para determinar la actividad inhibidora de tripsina, se utilizó el método basado en la hidrólisis enzimática del sustrato sintético N-benzoil-arginina-*p*-nitroanilida (BAPA) propuesto por Kakade y col (1969) y modificado por Liu y Markakis (1989) [147-148]. Para ello, se prepararon dispersiones 1% P/V de cada muestra en agua destilada por agitación magnética durante 30 min. Estas dispersiones se mezclaron en una relación 1:1 (V:V) con el *buffer* de ensayo (*buffer* 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (Tris) 50 mM, CaCl_2 10 mM) y se agitó vigorosamente antes de filtrar con papel Whatman No. 2. Por último, el filtrado se diluyó en agua, acorde a lo propuesto por Liu y Markakis, hasta que 1 mL presentó 30-70% inhibición de tripsina [148].

2.1.8. Preparación de muestras proteicas para microscopía confocal

Para el análisis de las dispersiones acuosas por microscopía confocal se adicionó una pequeña alícuota de una solución de Rodamina B $2.10^{-4}\%$ P/V a 200 μL de las dispersiones preparadas de acuerdo a las secciones 2.1.2 y 2.1.4 de manera tal de obtener una relación Proteína/Rodamina de 600mg/1mg. Para el análisis microestructural de los geles ácidos se respetó la misma relación de colorante fluorescente/proteína adicionando Rodamina B a un volumen de muestra de 500 μL antes de la adición de GDL.

2.1.9. Soluciones para electroforesis

Se prepararon soluciones acuosas stock de acrilamida conteniendo 30% P/V de acrilamida y 0,8% P/V de N,N'-metilénbisacrilamida (bisacrilamida), de *buffers* Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 y 0,5 M pH 6,8, de *buffer* de corrida con Tris 0,025M, glicina 0,192 M, SDS 10% P/V y pH 8,3, de colorante conteniendo 0,1% P/V de azul brillante de Coomassie R250, de 45% V/V de metanol, de 10% V/V de ácido acético y de 0,5 % P/V de Azul de Bromofenol.

Se prepararon dispersiones acuosas al 0,1% P/P de las muestras de harinas glicosiladas por agitación magnética durante 30 min. En algunos casos, se centrifugaron las dispersiones a 10.500×g durante 20 min a 20°C para eliminar fibra y/o agregados proteicos insolubles. Estas diluciones se mezclaron en relación 1:1 con un *buffer* conteniendo Tris-HCl 0,5M pH 6,8, glicerol 25% V/V , SDS 2% P/V y azul brillante Coomassie 0,01% P/V . En algunos casos se les adicionó β -mercaptoetanol como agente reductor al 5% V/V , colocando las muestras en baño María por 4 min.

Se preparó un marcador de pesos moleculares (MW) con 0,05% P/V de cada una de las siguientes proteínas (0,25% P/V de proteína total): albúmina sérica porcina (Sigma) de ~80 kDa, albúmina sérica bovina (Sigma) de ~66 kDa, tripsina tipo II de páncreas porcino (Sigma-Aldrich) de ~25 kDa, pepsina porcina (Sigma) de ~35 kDa y β -lactoglobulina bovina (Sigma) de ~18 kDa.

2.1.10. Preparación de emulsiones O/W

2.1.10.1. Preparación y caracterización de las dispersiones acuosas de harinas

Se prepararon dispersiones de las muestras de harinas glicosiladas y sin glicosilar al 5% P/P en *buffer* Na₃PO₄ 10 mM pH 7,0 y en *buffer* citrato de sodio 10 mM pH 3,5 por agitación magnética durante 2 h, para asegurar completa dispersión e hidratación. Las mismas se homogeneizaron a 20.000 rpm durante 1 min empleando el homogeneizador de alta velocidad rotor/estator y posteriormente se recircularon tres veces por el homogeneizador a válvula de alta presión. La presión en la válvula principal fue de 1.000 bar.

Se separaron alícuotas de 2 mL de cada una de estas dispersiones y se centrifugaron a 10.000×g durante 30 min a T ambiente. Los sobrenadantes se almacenaron para ensayos de solubilidad proteica (sección 2.1.5). Por otro lado, se reservaron alícuotas de 10 mL para análisis de tamaño de partículas por difracción láser,

utilizando índices de refracción de 1,33 y 1,52 para el dispersante y las partículas, respectivamente.

2.1.10.2. Preparación y almacenamiento de las emulsiones

Las emulsiones O/W se prepararon por homogeneización a 24.000 rpm durante 1 min empleando el dispositivo Ultraturax T-25. Como fase dispersa se empleó aceite de girasol refinado, utilizando 50 g cada 150 g de dispersión acuosa de manera tal de lograr una fracción másica de la fase dispersa de 0,25. Además, se realizaron emulsiones en las mismas condiciones antes mencionadas, pero empleando dispersiones acuosas que no fueron sometidas a la etapa de homogeneización a alta presión (sección 2.1.10.1).

Las emulsiones se almacenaron en tubos graduados de vidrio y en condiciones estacionarias durante 24 h a T ambiente.

2.1.11. Reactivos químicos utilizados

Las drogas utilizadas en este trabajo fueron, en la mayoría de los casos, de calidad pro-análisis. Las más utilizadas fueron: GDL (Sigma-Aldrich, USA); tartrato de Na y K, Na₂CO₃, KOH, NaOH, SDS, Na₃PO₄, Rodamina B, CuSO₄ (Cicarelli); reactivo de Folin Ciocalteau (Merck); *buffer* para calibración de pHmetros pH 4 y 7 (Cicarelli). En general, se prepararon soluciones stock de cada una de las drogas y, cuando fue necesario, se las valoró antes de utilizarlas.

2.2. Equipos utilizados

Medidas espectroscópicas. Las medidas espectrofotométricas en el espectro ultravioleta (UV) y visible (V) se realizaron en un espectrofotómetro Spekol 1200 (Analytik Jena AG, Jena, Alemania) con portacubetas termostatizable y arreglo de diodos, que permite realizar cada espectro en muy corto tiempo (15-30 s), lo que lo hace ideal para estudios cinéticos.

Para los ensayos de agregación, las condiciones de trabajo fueron seleccionadas mediante un estudio previo. Se obtuvieron espectros de absorción y lecturas de absorbancia (A) a una longitud de onda (λ) fija y curvas cinéticas a λ variable en un rango de 450 a 650nm. En este rango, no se produce absorción por parte de los cromóforos proteicos y no hay necesidad de corregir dichas mediciones por el efecto de la luz dispersada a pequeños ángulos debido a que las partículas estudiadas son

comparables en tamaño con la λ , lo que implica diferencias mínimas entre las medidas de transmitancia y A [149].

Las medidas de espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se realizaron en un equipo Shimatzu AA-6650 (Shimatzu Co., Duisburg, Alemania) en un rango de 650 a 4.000 cm^{-1} . Se probaron dos adaptadores de para muestras diferentes: HATR FLAT para dispersiones y GladiATR para muestras sólidas.

Medidas potenciométricas. Las medidas de pH se realizaron utilizando un pH-metro digital Orion, equipado con un electrodo de membrana de vidrio selectivo a protones combinado con un electrodo de referencia de calomel saturado.

Medidas reológicas. Las determinaciones de los módulos de elasticidad (G'), de almacenamiento (G'') y $\tan\delta$ (G''/G') se efectuaron en un reómetro de tensión controlada AR-G2 (TA Instruments, Estados Unidos).

Medidas de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los ensayos de DSC se realizaron con un equipo MDSC Q200 (TA Instruments, Estados Unidos) sobre dispersiones 30% P/P de las muestras en NaCl 1 M. Se utilizaron cápsulas herméticas estándar con 10-15 mg de dispersión, se calentaron a 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde 20 a 120 $^{\circ}\text{C}$ con una modulación de $\pm 0,50^{\circ}\text{C}$ cada 50 s. Como referencia se usó una cápsula vacía.

Microscopía. Para la observación de la microestructura de los geles se utilizó un microscopio óptico invertido (Union Optical, Tokio, Japón) al cual se le acopló una cámara fotográfica digital Canon Power Shot A640 (Canon Inc., Malasia).

La microestructura de las emulsiones se analizó por microscopía óptica de contraste de fase con una cámara digital adaptada Canon Power Shot A570 (Canon Inc. Malasia).

Para el análisis de los geles por Microscopía confocal de barrido láser (CSLM) se utilizó un Microscopio Nikon C-1 Plus (Tokio, Japón). Las imágenes digitales adquiridas fueron almacenadas con el programa EZ-C1 desarrollado por Nikon.

Medidas de distribución de tamaño de partícula. La distribución de tamaño de partícula se analizó por difracción láser usando un analizador Malvern Mastersizer 2000E (TA Instruments, Estados Unidos) asociado a una unidad de dispersión por vía húmeda (Hydro2000 MU).

Equipos de apoyo. Se utilizaron baños termostatizados, baños de circulación de agua, agitadores magnéticos Jonomex y Hanna HI 190 M, equipo para electroforesis Mini-PROTEAN 3 Cell (BIO-RAD Laboratories, California, Estados Unidos), rectificador y fuente de poder estabilizada Chemar S.A.C.I.F. CHF 1.4., ultracentrífuga

refrigerada Sigma 3-18K, cronómetros digitales y micropipetas Oxford, BOECO 921, V3-series (High Tech. Lab.), Paralwall y Wheaton 851303.

2.3. Métodos

2.3.1. Evaluación del proceso de agregación ácida mediante turbidimetría

Los posibles cambios de tamaño y/o grado de compactación de las partículas fueron estudiados basándose en la dependencia de la turbidez (τ) con la λ en el rango de 450-650 nm, en el cual no hay absorción de los grupos cromóforos de la proteína.

La relación entre el tamaño de una partícula y su habilidad para dispersar la luz es compleja y sólo se conoce para partículas de forma simple [150]. Para partículas esféricas monodispersas de peso molecular M , concentración c y con índice de refracción cercano al del solvente, la τ está dada por:

$$\tau = HcMQ \quad \text{siendo } H = \frac{32\pi^2 n_0^2 \left(\frac{\partial n_1}{\partial c} \right)^2}{3N_A \lambda^4} \quad (2.1)$$

donde n_0 y n_1 son los índices de refracción del solvente puro y la solución respectivamente, N_A es el número de Avogadro, $\partial n_1 / \partial c$ es el incremento específico del índice de refracción y la función de disipación Q resulta de las interferencias internas de la luz dispersada por las partículas a todos los ángulos θ y se incorpora a la expresión cuando las partículas poseen un tamaño mayor que la l incidente. Esta función Q , que depende de la forma de las partículas, se puede definir como:

$$Q = \frac{3}{8} \int_0^{\pi} P(q,r) (1 + \cos^2\theta) \sin\theta \, d\theta \quad (2.2)$$

en la que θ es el ángulo de dispersión de la luz y $P(q, r)$ es un factor de forma donde q es el vector de onda y r el radio de la partícula [151].

Los resultados de estudios de simulación por computadoras utilizando diferentes modelos de agregación han promovido el definir la estructura de los agregados coloidales en términos del concepto de dimensión fractal (D_f) [152-153]. Para un objeto fractal, Q se ve modificada como sigue:

$$Q = \frac{3}{8} \int_0^{\pi} P(q,r) S(q) (1 + \cos^2\theta) \sin\theta \, d\theta \quad (2.3)$$

siendo $S(q)$ un factor de estructura que describe el arreglo espacial de los elementos de dispersión o monómeros dentro del agregado [154].

De la ecuación 2.1 se puede obtener la derivada:

$$\frac{\partial \log \tau}{\partial \log \lambda} = \frac{\partial \log Q}{\partial \log \lambda} + 2 \frac{\partial \log \left(n \frac{\partial n}{\partial c} \right)}{\partial \log \lambda} - 4 = \beta + \gamma - 4 \quad (2.4)$$

β por lo tanto es un parámetro relacionado con el tamaño y grado de compactación de las partículas y puede ser utilizado para evaluar el estado de los agregados formados durante la agregación ácida inducida por la adición de GDL en distintas condiciones.

Teniendo en cuenta que las soluciones a estudiar no son muestras monodispersas, la τ será función del peso molecular promedio en peso (\overline{M}_p) y del factor de disipación promedio z (Q_z) que depende de la distribución de tamaños promedio:

$$\tau = H \overline{M}_p Q_z \quad (2.5)$$

A partir de esta ecuación se puede demostrar la relación directa entre β y el tamaño promedio en peso de las partículas [149]. Aceptando un valor de -0,2 para γ , que es el estimado para proteínas en un rango de λ de 400 a 800 nm, se puede calcular el valor de β a partir de la pendiente de gráficos lineales de $\log \tau$ vs. $\log \lambda$, midiendo la τ en el citado rango de λ a intervalos frecuentes durante el tiempo necesario para alcanzar un máximo de τ durante la agregación del sistema [151]:

$$\beta = 4,2 + \frac{\partial \log \tau}{\partial \log \lambda} = 4,2 + \alpha \quad (2.6)$$

Técnica operatoria: El valor de β se obtuvo teniendo en cuenta que [155]:

$$\tau = b^{-1} \ln \frac{I_0}{I} \quad (2.7)$$

donde I_0 e I son las intensidades de luz incidente y transmitida respectivamente y b es el camino óptico; y dado a que la absorbancia (A) se define como:

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad (2.8)$$

la τ queda expresada como:

$$\tau = 2,303 A b^{-1} \quad (2.9)$$

Aplicando logaritmo en ambos miembros,

$$\log \tau = \log 2,303 + \log A - \log b \quad (2.10)$$

y si se deriva con respecto a λ :

$$\frac{\partial \log \tau}{\partial \log \lambda} = \frac{\partial \log A}{\partial \log \lambda} = \alpha \quad (2.11)$$

De esta manera, el valor de $\partial \log \tau / \partial \log \lambda$ (α) es la pendiente de un gráfico lineal de $\log A$ vs. $\log \lambda$ y a partir de él se obtiene β según la ecuación 2.6.

Para obtener dichas medidas se colocaron alícuotas de las distintas muestras en cubetas rectangulares de 1cm de paso óptico y se midió la A entre 450 y 650 nm en un espectrofotómetro con portaceldas termostatizable.

Con los valores de β se evaluó la variación del tamaño medio de las partículas proteicas durante el proceso de agregación ácida inducida por GDL y los posibles cambios del mismo frente a las distintas condiciones de trabajo.

A modo de ejemplo, en la Figura 2.1 se presenta un gráfico lineal de $\log A$ vs. $\log \lambda$ entre los numerosos realizados en el presente trabajo.

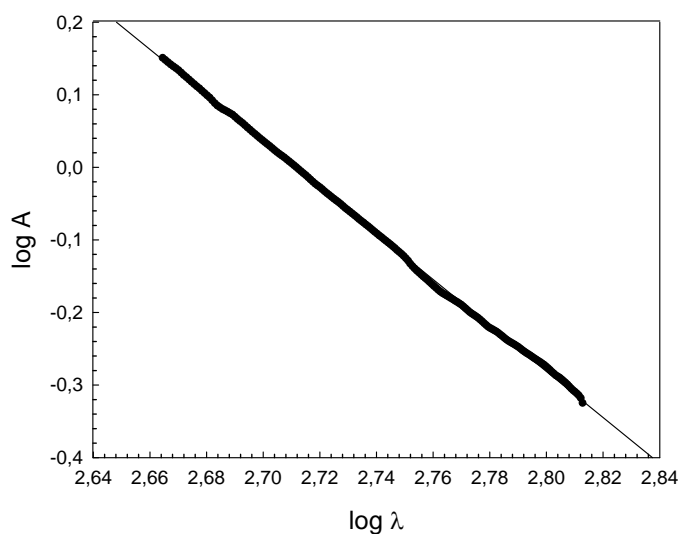


Figura 2.1. Ejemplo de gráfico de $\log A$ vs. $\log \lambda$ correspondiente al ensayo realizado a 25 °C para SPI 0,625 %^P/_P en H₂O, luego de 13 min de adicionada la GDL, donde $\beta = 1,0298$. (Parámetros obtenidos a partir del ajuste lineal: $h = 8,5951$; $m = -3,1702$; $r^2 = 0,999$).

2.3.1.1. Determinación de la dimensión fractal (D_f) de los agregados

La D_f da una medida del grado de compactación de la malla del gel que se forma al final del proceso de agregación y antes de la sinéresis. Se ha demostrado que el parámetro β , para un sistema de agregación de partículas proteicas tiende hacia un valor asintótico que puede ser considerado como la D_f de los agregados (Figura 2.2) [151].

Técnica operatoria: Se registraron los valores de β , obtenidos como se explicó en el apartado 2.3.1, en función del tiempo hasta que las lecturas de τ alcanzaron un valor constante luego del agregado de la GDL. A partir de gráficos β vs. tiempo (t), la D_f de los agregados fue calculada como el valor de β máximo alcanzado (Figura 2.2).

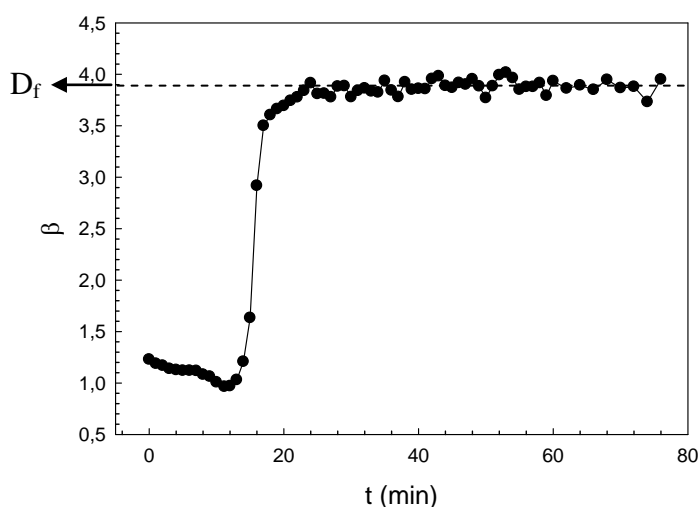


Figura 2.2. Ejemplo de la estimación de la D_f de los agregados de SPI (0,625 %Prot; 25°C; $D_f = 3,8928$).

2.3.1.2. Agregación ácida de SPI inducida por GDL

Se estudió la cinética de la agregación de los SPI, desnaturalizados previamente, por acidificación lenta hasta pH próximo al punto isoelectrico, luego de la adición de una determinada cantidad de GDL. Se siguió la cinética de esta agregación hasta la formación del agregado final (malla de gel).

Técnica operatoria: Se analizó la agregación ácida de soluciones de SPI en agua destilada por medio de un diseño experimental fraccionario 3^3 considerando a R, T y concentración de SPI como factores o variables independientes y al tiempo en que comienza la agregación (t_{ag}), pH al t_{ag} (pH_{ag}) y la D_f de los agregados como variables dependientes o respuestas, siendo R:

$$R = \frac{\% P/P_{GDL}}{\% P/P_{proteína}} \quad (2.12)$$

Se trabajó a diferentes R ya que la concentración de GDL influye en la velocidad de agregación debido a la variación de la velocidad de descenso del pH.

A través de los parámetros estadísticos obtenidos del t-test ANOVA se determinaron los factores e interacciones que resultaron significativos para cada caso. Una vez determinados los mismos, se ajustaron las respuestas mediante el modelo correspondiente y se analizaron residuos comprobándose normalidad e independencia de los mismos. Para visualizar el comportamiento de las variables respuestas se graficaron superficies y contornos convenientes para cada situación. Se utilizó regresión múltiple con variables codificadas, para obtener modelos matemáticos descriptivos y predictivos del comportamiento del sistema.

Se realizaron espectros de absorción de cada una de las muestras en el rango de 450-650 nm, a diferentes intervalos de t hasta alcanzar un valor de A constante. El $t = 0$ correspondió al espectro de absorción de la muestra previo a la adición de GDL. Se evaluó el cambio del tamaño medio de las partículas a través del parámetro β con el t luego de adicionada la GDL hasta la formación de una malla o red de gel. Simultáneamente se monitoreó el descenso de pH de las muestras.

Se evaluaron los cambios en el t_{ag} y en el pH_{ag} . Se estimó la D_f de los agregados a partir de gráficos de β vs. t como se explicó en la sección 2.3.1.1. Por último, se realizó una verificación para validar el correspondiente diseño experimental.

2.3.1.3. Efecto de la presencia de WSP en la agregación ácida de SPI

Se estudió la cinética de la agregación a 35°C de soluciones de diferentes relaciones proteicas SPI/WSP ($\%P/P/\%P/P$): 3:1, 1:1 y 1:3, de 0,5 %Prot total, desnaturalizados previamente (100°C, 5 min), por acidificación lenta hasta pH próximo al pI, luego de la adición de una cantidad constante de GDL (R 0,35). Se siguió la cinética de esta agregación hasta la formación del agregado final (malla de gel), como se explicara en el apartado anterior.

2.3.2. Análisis microscópico de dispersiones y geles

2.3.2.1. Microscopía óptica convencional (OCM)

Los mecanismos de interacción entre los ingredientes y la textura de los geles formados pueden ser caracterizados a través de análisis ópticos [156]. Se evaluó la microestructura de los geles de SPI y de sus mezclas con WSP formados por acidificación con GDL, en proporción SPI:WSP 1:0, 3:1, 1:1 y 1:3.

Técnica operatoria: El proceso de gelificación ácida se inició por adición de GDL sólida sobre 2,06 g de la solución proteica. Se adicionó la cantidad de GDL necesaria para obtener un R de 0,35. Luego, 85 μL de cada muestra fueron colocados en placas LAB-TEK II de 8 compartimientos. La reacción de gelificación se realizó en estufa a $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$, manteniendo la humedad controlada. Los geles fueron observados con un objetivo de inmersión en aceite de $100\times$ en el microscopio invertido Union Optical al cual se le acopló una cámara digital Canon Powershot A640 con un adaptador de 52 mm y zoom de $9.1\times$. Las imágenes adquiridas fueron almacenadas en formato JPG para su análisis. Mediante la toma de imágenes de una regla micrométrica se determinó que $1 \text{ píxel} = (0,0399 \pm 0,0001)\mu\text{m}$ y, en consecuencia, la resolución de las imágenes resultó ser de 25,0 píxeles/ μm .

2.3.2.2. Microscopía confocal de barrido láser (CLSM)

Se evaluó la microestructura de los geles ácidos de SPI y sus mezclas con WSP (sección 2.1.2) y geles ácidos de harinas glicosiladas de soja y harina sin tratar (sección 2.1.4) por acidificación con GDL. También se analizaron las muestras en solución y posterior al tratamiento térmico a 100°C durante 5 min y previo a la adición de GDL, para detectar posibles cambios en la granulometría inicial de las muestras.

Por otro lado, se registraron imágenes a distintos tiempos durante la agregación ácida de muestras de SPI para su posterior análisis.

Técnica operatoria: Para lograr visualizar y poder obtener imágenes de la estructura interna de los geles ácidos y de las dispersiones iniciales, se utilizó el colorante fluorescente Rodamina B como fuera reportado en la sección 2.1.8.

En el caso del análisis de geles ácidos, este paso fue realizado inmediatamente antes de la adición de GDL. Posteriormente, 200 μL de cada muestra fueron colocados en placas LAB-TEK II de 8 compartimientos y se dejó gelificar a una T constante, manteniendo la humedad controlada.

Se tomaron imágenes digitales con el microscopio confocal de barrido láser aplicando un zoom $4\times$ sin pérdida de resolución. El objetivo utilizado fue de $40.0\times$ (Plan Apochromat). Los archivos de las imágenes fueron adquiridos con una resolución en píxel de 1024×1024 y almacenados con el programa EZ-C1. Por último, estas imágenes fueron convertidas al formato TIFF para su posterior análisis. Durante el proceso de adquisición de las imágenes se realizó un promedio de las mismas para eliminar el ruido aleatorio generado por los componentes electrónicos del equipo.

2.3.2.3. Análisis cuantitativo de imágenes

Para procesar las imágenes obtenidas por OCM y CLSM y la obtención de los parámetros de textura, se desarrollaron programas específicos en lenguaje Python. En este trabajo se usaron la varianza y sólo los tres estimadores más relevantes publicados en la literatura: la entropía de Shannon (S), la suavidad (K) y la uniformidad (U) [133, 157]:

$$S = -\sum_{i=0}^{L-1} p(N_i) \log_2(p(N_i)) \quad (2.13)$$

$$K = 1 - \frac{1}{1 + \frac{\sigma^2(N)}{L-1}} \quad (2.14)$$

$$U = \sum_{i=0}^{L-1} p^2(N_i) \quad (2.15)$$

donde $\sigma^2(N)$ es la varianza, $p(N_i)$ es la frecuencia estadística muestral normalizada de la escala de grises y L es el máximo nivel de negro. Previo al análisis, se normalizaron las imágenes halladas antes de transformarlas a una escala de grises para luego llevar estas a un formato numérico entero de 8 bits.

Mientras que valores bajos de S y altos de U se relacionan con partículas dispersas en todo el volumen de la muestra analizada, un valor máximo de U implica que en la imagen los valores de las intensidades del color gris son iguales y parejos. En cambio, S es una medida de la variabilidad del histograma de grises y es máxima para una imagen que contiene toda la gama de grises con igual probabilidad. En general, K es un estimador de la no dispersión de la escala de grises, pues cuando la varianza tiende a cero esta se anula, en cambio tiende a 1 cuando las fluctuaciones son grandes y la varianza es máxima.

Además, se determinó el diámetro medio de los intersticios o poros por medio del programa Image J, obteniéndose los valores en píxeles. Estos fueron promediados y se obtuvo el valor medio del diámetro de los poros.

2.3.3. Propiedades reológicas de los geles ácidos

Los mecanismos de interacción entre ingredientes y el comportamiento de los geles formados pueden ser caracterizados a través de análisis espectrofotométricos y/o

reológicos [156, 158]. El estudio de las propiedades reológicas de un sistema a bajas deformaciones es una técnica utilizada para obtener información sobre la estructura y viscoelasticidad del producto formado [159]. La reología representa una técnica muy importante para analizar los diferentes pasos involucrados en el proceso de formación de un gel, así como para evaluar la textura del producto final. En este trabajo, se estudiaron las propiedades mecánicas de los geles ácidos formados mediante ensayos reológicos con el objetivo de evaluar los sistemas en el equilibrio y durante su formación.

Los ensayos reológicos oscilatorios fueron utilizados para determinar las propiedades viscoelásticas de los sistemas. Se estimó el tiempo de gel (t_{gel}) a partir del punto de cruce del módulo elástico o de almacenamiento (G') y del módulo viscoso o de pérdida (G'') en función del t . Se determinó el pH correspondiente al t_{gel} (pH_{gel}) y el máximo valor de G' alcanzado ($G'_{m\acute{a}x}$). La Figura 2.3. ejemplifica la obtención de dichos parámetros a partir de los gráficos de G' y G'' en función del t y del pH.

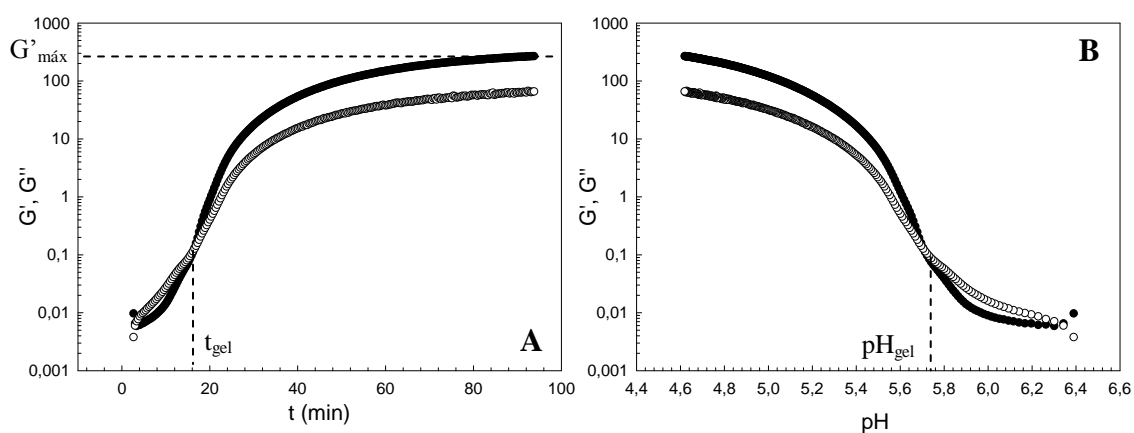


Figura 2.3. Variación de G' y G'' en función del tiempo (A) y del pH (B) una vez adicionada la GDL. (●) G' , (○) G'' . SPI 3%, R 0,35 y T 27°C.

Técnica operatoria: Tanto para el análisis de geles ácidos de SPI/WSP como de harina control o glicosilada se partió de dispersiones acuosas al 3% P/p de proteína bruta (secciones 2.1.2 y 2.1.4 respectivamente) y se adicionó una cantidad de GDL suficiente para obtener un R de 0,35 y 0,5, respectivamente. Luego de adicionada la GDL, una alícuota de $(1,000 \pm 0,001)$ mL de la mezcla anterior fue introducida en la platina del reómetro de tensión controlada, usándose una geometría de tipo cono (diámetro: 40 mm, ángulo cono: 2° , truncación: 55mm) para los ensayos con aislados y una geometría tipo plato (diámetro: 40 mm) para los ensayos con harinas de soja. Se utilizó además

una cubierta trampa de solvente para evitar la contracción de la muestra por evaporación de agua. La T de trabajo (35°C y 25°C, para aislados y para harinas respectivamente) fue controlada con un baño con recirculador Julabo (modelo AWC 100, Alemania) conectado al plato Peltier del instrumento.

Se registraron los valores de G' y de G'' en el tiempo a partir de la adición de GDL. Simultáneamente se registraron las variaciones de pH. El reómetro dispone de un sistema de adquisición de datos y control de operación mediante el software Rheology Advantage v5.7. Se configuró un procedimiento de adquisición de datos durante 2 h a intervalos de 30 s, a valores constantes de tensión de oscilación (0,1 Pa) y de frecuencia (0,1Hz). En el equilibrio, se realizaron barridos de frecuencia de 0,1-10 Hz.

2.3.4. Determinación de la solubilidad en agua (S_w) y en KOH 0,2% P/P (S_{KOH})

Se evaluaron diferentes métodos de determinación de la concentración proteica debido a que las muestras contienen sustancias que pueden interferir con dicha determinación: Método de Lowry, técnica del ácido bicinconínico y el Método de Bradford. Para la comparación se utilizaron soluciones acuosas de SPI como referencia, debido a que se conocía el dato de Proteína Bruta determinada por el método de referencia de Kjeldahl (90,7%). En base a los resultados obtenidos se seleccionó el método de Lowry.

Para la determinación de la solubilidad proteica se prepararon dispersiones de las muestras 0,1% P/P en agua o KOH 0,2% P/P con agitación magnética y se centrifugaron a 10.500×g por 20 min a 20 °C. Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Lowry modificado, usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar [160]. Ambas solubilidades se expresaron como porcentaje de proteína soluble respecto de proteína total. Se utilizaron los términos % S_w y % S_{KOH} para indicar los valores de solubilidad correspondientes a los % relativos al valor de S_{KOH} para la harina de partida (100%).

Técnica operatoria: Se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución A: volúmenes iguales de Na_2CO_3 al 4% e NaOH 0,2 M para dar una solución final de 2% Na_2CO_3 en NaOH 0,1 M
- Solución B: $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ al 2,0% P/V y tartrato de Na y K al 4,0% P/V

Al momento del ensayo, el Reactivo de Lowry se preparó mezclando las soluciones A y B en volúmenes iguales. En el momento de ser utilizada, la solución de Folin Ciocalteau se preparó mezclando agua destilada y reactivo de Folin en relación 1:1 V/V .

Como patrón se usó una solución de albúmina sérica bovina de concentración 1mg/mL y con ella se construyó la curva de calibración que se describe a continuación:

Nº tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BSA 1 mg/mL (µL)	0	10	20	30	40	50	60	70	80
agua destilada (µL)	200	190	180	170	160	150	140	130	120

A la muestra o al patrón de albúmina se agregó la cantidad de agua destilada necesaria para completar 200 µL. Luego se adicionó 1 mL del Reactivo de Lowry y se incubó a 37°C durante 10 min en oscuridad. Por último, se adicionaron 100 µL de Reactivo de Folin a cada tubo, se agitó nuevamente y luego de 30 min en la oscuridad, se midió la A a 750 nm.

2.3.5. Determinación de LG

Se determinó el contenido de Lys reactiva utilizando el método espectrofotométrico basado en la reacción del *o*-ftalaldehído (OPA) y el β-mercaptoetanol con aminas primarias en medio alcalino [112, 161] y se expresó en g Lys reactiva/16 g N. El porcentaje de Lys glicosilada (%LG), debida a los tratamientos mencionados, se calculó como la disminución relativa de Lys reactiva (%) para las muestras tratadas respecto a la harina de partida (0 %LG). El contenido de proteína bruta (N×6,25) de las muestras, fundamental para el cálculo de %LG, se llevó a cabo por el método descrito por Nkonge y Murray-Ballance (1982). El método propuesto para la determinación de proteína bruta se basa en la reacción de Berthelot y tiene una alta sensibilidad para la determinación del ion amonio. Según el trabajo original, la determinación colorimétrica tiene una excelente correlación con la determinación tradicional por destilación-titulación [162].

Técnica operatoria:

A) *Determinación de Lys glicosilada.* Se prepararon las siguientes soluciones:

- **Reactivo OPA:** Se preparó mezclando 25 mL de solución de tetraborato de sodio 100 mM, 2,5 mL de SDS 20% ^P/_P, 40 mg de OPA (previamente disuelto en 1 mL de metanol) y 100 µL de β-mercaptoetanol. La mezcla resultante se transfirió a un matraz aforado de 50 mL y se llevó a volumen final con agua destilada [112]. El reactivo se preparó inmediatamente antes de realizar la determinación.

- **Patrón de L-Lys 8 mM:** Se disolvió la cantidad adecuada del aminoácido en solución de SDS 1% P/V, se transfirió a un matraz aforado de 100 mL y se llevó a volumen final con la misma solución del surfactante.

Para la determinación espectrofotométrica se mezclaron 350 µL de sobrenadante límpido (sección 2.1.6) y 3 mL de reactivo OPA. La A a 340 nm se midió luego de 2 min de incubación. El mismo procedimiento se realizó con diluciones apropiadas del patrón de L-Lys en SDS 1% P/V.

B) Determinación proteína bruta. Se prepararon las siguientes soluciones:

- **Solución estándar de amonio:** Se secó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en estufa a 103 °C durante 3 h y se dejó enfriar en desecador. Se pesaron 47,16 mg y se trasladaron a un balón de micro-Kjeldahl. Luego se adicionaron 0,11 g de mezcla catalizadora (K_2SO_4 , TiO_2 y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 3 mL de H_2SO_4 concentrado y se calentó al menos durante 20 min. Luego de enfriar hasta T ambiente, se agregó una pequeña porción de agua destilada y se transfirió cuantitativamente a un matraz aforado de 100 mL, lavando el balón con varias porciones de agua antes de enrasar. De esta manera, el contenido de nitrógeno en la solución estándar fue de 100 µg/mL. Al mismo tiempo se preparó un blanco sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y sin digestión, llevando también a 100 mL de volumen final en otro matraz aforado. Antes de la determinación colorimétrica, se utiliza esta solución para diluir la solución estándar de amonio, de acuerdo a lo propuesto por el trabajo original. Las diluciones se prepararon a concentraciones de nitrógeno comprendidas entre 2 y 20 µg N/mL, para asegurar la linealidad.
- **Preparación del digestato de las muestras de harina:** Se pesó una masa exactamente conocida (20-30 mg) de cada muestra y se realizó el mismo procedimiento que a la solución estándar de amonio.
- **Mezcla catalizadora (K_2SO_4 , TiO_2 y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$):** Nkonge y Murray-Ballance propusieron la utilización de una mezcla catalizadora compuesta por K_2SO_4 (10% P/P), TiO_2 (0,3% P/P), CuSO_4 (0,3% P/P) y piedra pómez. El K_2SO_4 eleva el punto de ebullición del H_2SO_4 , en tanto la sal cúprica y el óxido de titanio son los catalizadores de oxidación.
- **Solución buffer de trabajo:** se preparó una solución de *buffer* Na_3PO_4 0,1 M, tartrato de sodio y potasio 0,18 M, mezclando en partes iguales (1:1) una solución A de Na_2HPO_4 0,2 M, NaOH 0,2 M y tartrato de sodio y potasio tetrahidratado (sal de Rochelle) 0,36 M y una solución B de NaOH 2,5 M.

- **Reactivo de salicilato-nitroprusiato:** se disolvieron 20 g de salicilato de sodio y 30 mg de nitroprusiato de sodio en agua destilada y se llevó a volumen final de 100 mL en un matraz aforado.
- **Hipoclorito de sodio:** Se diluyó la solución comercial (5,5-6,0% P/V de cloro activo o disponible) con agua destilada de manera que la solución final tenga un contenido de cloro de 0,6% P/V , que corresponde a 0,046% P/V en la mezcla final de la determinación colorimétrica.

Se colocó, en vaso de precipitados, una determinada cantidad de la solución *buffer* de trabajo, del reactivo de salicilato-nitroprusiato y de la solución de hipoclorito de sodio, dejando equilibrar a 25°C en un baño termostatzado. En tubos de ensayo de vidrio, se agregaron 0,5 mL de las soluciones (blanco, estándar y muestra), 1,5 mL de solución de trabajo y 0,4 mL de reactivo de salicilato-nitroprusiato. Se mezcló en vórtex y se incubó durante 10 min. Luego, se agregó 0,2 mL de solución de hipoclorito de sodio, se mezcló e incubó 30 min. Finalmente, se adicionaron 10 mL de agua destilada y se midió la A a 660 nm.

La cantidad de N presente en los 0,5 mL de las soluciones estándar fueron las siguientes:

Concentración de N en solución estándar ($\mu\text{g/mL}$)	Cantidad de N en 0,5 mL de solución estándar (μg)
0 (blanco)	0
2	1
5	2,5
10	5
20	10
40	20

La cantidad de muestra utilizada fue acorde para asegurar que en 0,5 mL del digestato haya un contenido de N que se encuentre dentro de los límites de la curva de calibración.

2.3.6. Determinación de AA

Para la determinación de la actividad de inhibidores de tripsina se utilizó el método espectrofotométrico propuesto por Liu y Markakis (1989) con algunas modificaciones [148].

Técnica operatoria: Se prepararon las siguientes soluciones de trabajo:

- **Buffer de Ensayo:** Buffer Tris 50 mM pH 8,2, CaCl₂ 10 mM.
- **Solución stock y de trabajo de tripsina porcina:** Se disolvieron 10 mg de tripsina porcina cristalina (Tipo IX, Sigma) en 50 mL de HCl 1 mM (pH ~ 2,5) con CaCl₂ 2,5 mM. Para la solución de trabajo, se diluyeron 6,25 mL de la solución stock con HCl 1 mM (pH ~ 2,5) y CaCl₂ 2,5 mM c.s.p. 10 mL de manera de obtener una concentración final de 0,05 mg/mL.
- **Solución stock y de trabajo de BAPA:** Se disolvieron 400 mg de BAPA en 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Para la solución de trabajo se diluyeron 0,25 mL de solución stock con el *buffer* de ensayo (Tris 50 mM pH 8,2, CaCl₂ 10 mM) c.s.p. 25 mL, pre-calentado a 37 °C.

Para cada extracto, se procedió de acuerdo a la siguiente secuencia de mezclado: 1) 2 mL BAPA; 2) 1 mL muestra y 3) 0,5 mL enzima.

Se incubó durante 20 min a 37°C y se detuvo la reacción a través del agregado de 0,5 mL de ácido acético al 30%. Luego, se determinó la A a 410 nm (A_{410}^s). Para obtener la A de referencia (A_{410}^r) se utilizó agua destilada en reemplazo de la muestra en el paso 2. Definiendo Unidad de Tripsina como el aumento de 0,01 unidades de A a 410 nm bajo las condiciones de ensayo, la actividad inhibitoria de tripsina fue expresada en Unidades de Tripsina Inhibidas (TUI, *trypsin units inhibited*) por mg de muestra seca, calculándose de la siguiente manera:

$$\text{TUI / mg muestra} = \frac{[(A_{410}^r - A_{410}^s) \times 100] \text{ mL extracto diluido}}{(\text{mg muestra/mL extracto diluido})} \quad (2.16)$$

Los resultados se expresaron como % de actividad inhibitoria residual (%AA) de las diferentes harinas tratadas con respecto a la actividad inhibitoria de la harina activa sin tratamiento (100%).

2.3.7. Determinación de actividad ureásica (AU)

El fundamento de la técnica consiste en determinar la AU de diferentes productos por medición del incremento del pH. Cuando una solución de urea se pone en contacto con una harina de soja activa se produce la hidrólisis enzimática de la urea que da como resultado la aparición de amoníaco (NH₃) y CO₂. Como consecuencia de ello, se produce un incremento del pH proporcional a la cantidad de amoníaco producido y, por

lo tanto, proporcional a la AU de la muestra. El método oficial propuesto por la AOCS (*The American Oil Chemists' Society*), e incorporado en la Metodología Analítica Oficial del Código Alimentario Argentino (CAA), se aplica a soja, productos derivados y alimentos balanceados a base de soja, siempre que no estén adicionados de urea [163].

Técnica operatoria: Se prepararon dos soluciones *buffer*:

- **Solución *buffer* fosfato de potasio 0,05 M, pH 7,0**
- **Solución *buffer* fosfato de potasio pH 7,0 + urea (3%):** Se preparó disolviendo 15 g de urea (Anedra) en 500 mL de la solución reguladora preparada en el inciso anterior.

Se pesaron 0,05 g de muestra en un tubo falcon y se adicionaron 2,5 mL de la solución *buffer* + urea. Se tapó con tapa a rosca, se mezcló y se colocó en baño de agua a 30°C. Luego de 30 min, se retiró el tubo del baño y se determinó el valor del pH de las muestras exactamente 5 min después de haberlas retirado del baño. Los resultados se expresaron como Índice de Actividad Ureásica (IAU):

$$\text{IAU} = \Delta\text{pH} = \text{pH}_{t=30\text{min}} - \text{pH}_{\text{blanco } t=30\text{min}} \quad (2.17)$$

2.3.8. Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)

Para cada muestra, se preparó una dispersión 10% P/P en agua destilada y se homogeneizó por Ultraturrax (10 s a 7.000 rpm). Se colocaron 100 µL en el ATR de ZnSe, cubriendo todo el cristal y secando suavemente con secador de cabello desde una distancia de aproximadamente 15-20 cm hasta total deshidratación. Las condiciones de medida fueron: Apodización: Happ-Genzel, número de barridos: 25, resolución: 4 cm⁻¹ y rango del espectro: 650 a 4.000 cm⁻¹.

2.3.9. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los ensayos se realizaron sobre dispersiones 30% P/P de las muestras en NaCl 1 M. Se utilizaron cápsulas herméticas estándar con 10-15 mg de dispersión, se calentaron a 5°C/min desde 20 a 120°C con una modulación de ± 0,50°C cada 50 s. Como referencia se usó una cápsula vacía. En los termogramas obtenidos se determinó la entalpía parcial de cada transición y la entalpía total de desnaturalización proteica (ΔH_d). Los valores de ΔH_d parciales y totales se expresaron en J/g proteína seca, para lo cual se tuvo en cuenta el contenido proteico de las muestras. Para fines comparativos se

expresó la ΔH_d como $\% \Delta H_d$, tomándose como referencia el 100% del valor correspondiente a la ΔH_d de la harina control (F).

2.3.10. Caracterización de las muestras mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

El estado de las diferentes muestras fue analizado por SDS-PAGE, en medio reductor y no reductor usando un sistema de gel vertical, de acuerdo al método de Laemmli [164].

Se trabajó con un gel de concentración 4% y un gel de corrida 12%. El gel de corrida estuvo compuesto de acrilamida y bis acrilamida solubilizadas en *buffer* Tris-HCl 1,5M pH 8,8, conteniendo SDS 0,1% V/V . El gel de concentración y el gel de corrida contenían acrilamida (3,80% P/V y 11,68% P/V respectivamente) y bis acrilamida (0,10% P/V y 0,32% P/V respectivamente) solubilizadas en *buffer* Tris-HCl 0,5M pH 6,8, conteniendo SDS 0,1% V/V . La reacción de polimerización fue iniciada por el agregado de 50 μ L de persulfato de amonio 10% V/V preparado en el momento y 5 μ L de N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED).

Técnica operatoria: Se sembraron cantidades adecuadas de proteína disueltas en el *buffer* muestra, con o sin β -mercaptoetanol, de modo de obtener 10-20 μ g de proteína por cada 20 μ L de muestra. El tiempo de corrida fue de aproximadamente 45 min, a 25°C y con intensidad de 12 mA para el gel de separación y de 25 mA para el gel de corrida. Las proteínas fueron teñidas con una solución colorante de Coomassie brilliant blue R250 y decoloradas con una solución de metanol 10% V/V y ácido acético 10% V/V . Las bandas proteicas fueron identificadas usando el patrón de pesos moleculares descrito en la sección 2.1.9. Los densitogramas de cada calle fueron obtenidos a través del software Image J versión 1.48.

2.3.11. Caracterización de las emulsiones O/W

2.3.11.1. Distribución de tamaño de partícula (DTP)

La DTP de las emulsiones se obtuvo utilizando un equipo de difracción laser Malvern Mastersizer 2000E asociado a una unidad de dispersión por vía húmeda. La velocidad de agitación de la unidad fue de 2.000 rpm y los índices de refracción utilizados fueron: 1,33 y 1,47 para el dispersante y la partícula, respectivamente. Previamente, las emulsiones se diluyeron 1:4 V/V en los mismos *buffers* utilizados para

preparar las dispersiones proteicas, en ausencia y presencia de SDS 1% P/V . A partir de las DTP, se obtuvo el diámetro promedio de De Brouckere ($D_{4,3}$):

$$D_{4,3} = \frac{\sum V_i d_i}{\sum V_i} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (2.18)$$

donde n_i es el número y V_i el volumen correspondientes a todas las partículas de diámetro d_i .

2.3.11.2. Microestructura de las emulsiones

Se obtuvieron imágenes digitales de las emulsiones utilizando un microscopio óptico acoplado a una cámara digital Canon Power Shot A570IS (Canon Inc., Malasia). Las emulsiones se diluyeron 1:1 V/V con los mismos *buffers* utilizados para su preparación. El aumento fue de 400×, con un aumento adicional de la cámara digital de 4×. Las imágenes digitales se almacenaron en formato JPG para su posterior análisis.

2.3.11.3. Estabilidad frente al almacenamiento estacionario

Para evaluar la estabilidad frente al almacenamiento estacionario, las DTP de las emulsiones se determinaron luego de 24 h de reposo.

Por otro lado, la separación gravitacional (cremado) se evaluó colocando la emulsión recién preparada (sección 2.1.10.2) en tubos graduados de vidrio y realizando el seguimiento de la formación de la fase crema en función del tiempo durante 24 h [165]. El índice de cremado (IC) se definió como:

$$IC = \frac{H_s}{H_T} \times 100 \quad (2.19)$$

donde H_s es la altura de la fase acuosa (cm) a un determinado tiempo y H_T es la altura total de la emulsión (cm).

2.3.12. Análisis estadístico

Las distintas determinaciones se realizaron al menos por duplicado. El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el programa para PC Sigma-Plot (versión 10.0) y Design Expert (versión de prueba 6.0.10). Los valores reportados son los valores promedio \pm su desvío estándar. Las diferencias entre los mismos fueron consideradas significativas cuando $p < 0,05$.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Evaluación de la capacidad de agregación ácida de aislados de soja

3.1.1. Agregación y gelación ácidas de los SPI

3.1.1.1. Evaluación del efecto de la temperatura, la cantidad de GDL adicionada y la concentración proteica por medidas turbidimétricas

En la Figura 3.1 se expone la variación de la τ (A) y el pH (B) de muestras de SPI 0,5% P/P durante el proceso de acidificación por adición de GDL (R 0,35) a distintas T (15-35°C).

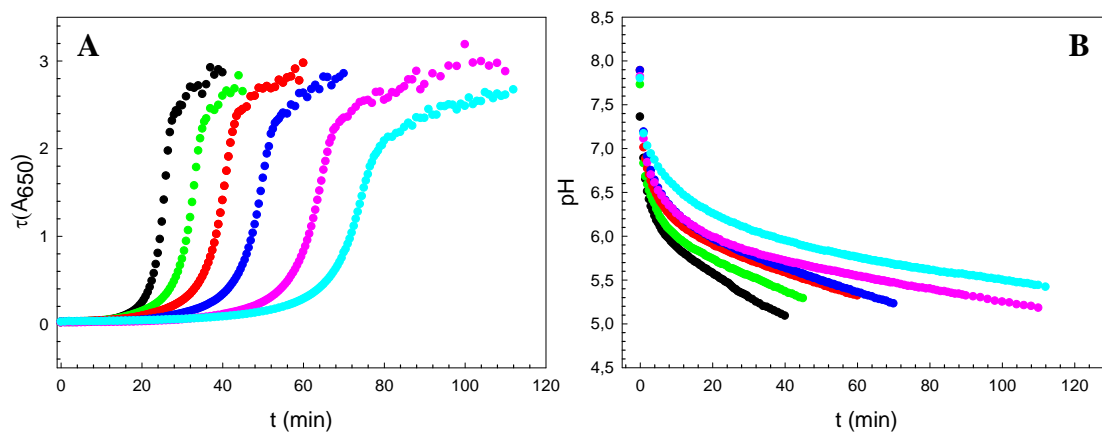


Figura 3.1. Variación de τ (A) y del pH (B) en función del tiempo durante la gelificación ácida de SPI 0,5 % P/P una vez adicionada GDL (R 0,35) a diferentes T: (●) 35°C; (●) 31°C; (●) 27°C; (●) 23°C; (●) 19°C; (●) 15°C.

Los cambios del parámetro β con el t y el pH se ilustran en la Figura 3.2 A y B respectivamente.

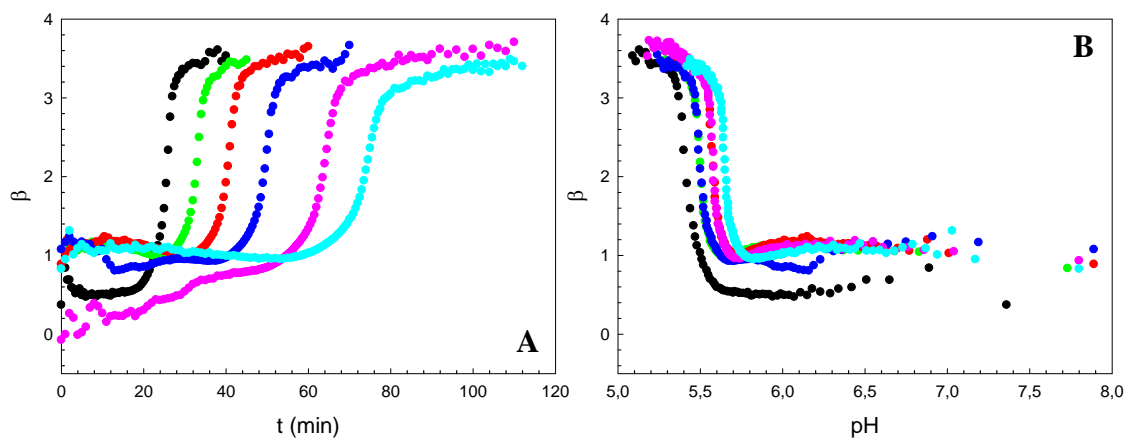


Figura 3.2. Parámetro β vs. el tiempo (A) y el pH (B) durante la gelificación de SPI 0,5% inducida por adición de GDL (R 0,35) a distintas T: (●) 35°C; (●) 31°C; (●) 27°C; (●) 23°C; (●) 19°C; (●) 15°C.

Para todos los casos, en la Figura 3.2A se pueden observar dos etapas bien definidas durante el proceso de acidificación. En una primera etapa, el valor de β permanece prácticamente constante, lo que estaría indicando que no hay cambios, apreciables por esta técnica, del tamaño medio de las partículas proteicas. Luego, β aumenta abruptamente en una segunda etapa hasta alcanzar valores más o menos constantes. Este aumento está vinculado a la pérdida de estabilidad electrostática proteica a un determinado valor de pH y la consiguiente agregación espontánea de las partículas coloidales desestabilizadas hasta formarse una malla de red de gel. Un comportamiento similar ha sido observado para la agregación ácida del caseinato de sodio bovino [166].

A su vez, se observó una disminución de la velocidad de descenso del pH al disminuir la T (Figura 3.1B).

Para evaluar el efecto de los factores T, R y %Prot sobre los parámetros t_{ag} , pH_{ag} y la D_f de los agregados formados al final de la agregación, se aplicó un diseño de experimentos factorial completo de tres variables en tres niveles (3^3). En la Tabla 3.1 se detallan los valores de los parámetros t_{ag} , pH_{ag} , y D_f obtenidos a partir del mencionado diseño experimental.

Tabla 3.1. Valores de las variables codificadas (entre paréntesis) y no codificadas correspondientes al diseño factorial 3^3 y las variables respuestas obtenidas.

N° experimento	Factores			Variables respuesta		
	T (°C)	R	% Prot (% P/P)	t_{ag} (min)	pH_{ag} $\pm 0,01$	D_f $\pm 0,02$
1	35 (+1)	0,35 (-1)	0,25 (-1)	19	5,53	3,28
2	25 (0)	0,675 (0)	0,625 (0)	10	5,86	3,95
3	35 (+1)	0,35 (-1)	1 (+1)	14	5,79	3,90
4	25 (0)	0,675 (0)	0,625 (0)	12	5,78	3,89
5	25 (0)	0,675 (0)	0,625 (0)	15	5,36	3,89
6	15 (-1)	0,35 (-1)	1 (+1)	76	5,61	3,83
7	25 (0)	0,675 (0)	0,625 (0)	12	5,77	3,89
8	35 (+1)	1 (+1)	1 (+1)	5	5,69	3,85
9	15 (-1)	1 (+1)	1 (+1)	16	5,70	3,88
10	15 (-1)	1 (+1)	0,25 (-1)	20	5,47	3,55
11	35 (+1)	1 (+1)	0,25 (-1)	5	5,59	3,51
12	25 (0)	0,675 (0)	0,625 (0)	15	5,33	3,91
13	15 (-1)	0,35 (-1)	0,25 (-1)	75	5,80	3,34
14	25 (0)	0,675 (0)	0,625 (0)	10	5,80	3,89

Se estimaron los efectos de cada variable a través de los parámetros estadísticos obtenidos del t-test ANOVA y los valores de p fueron utilizados para confirmar la significancia de dichos factores, asumiendo, en este caso, $p < 0,05$. Para todos los modelos propuestos se realizaron las gráficas diagnósticas correspondientes para comprobar la normalidad e independencia de los residuos (resultados no mostrados).

Para el caso del t_{ag} , se ajustaron los resultados obtenidos a un modelo cuadrático reducido de superficie de respuesta. En la Tabla 3.2 se muestra el análisis ANOVA.

Tabla 3.2. Análisis ANOVA para la variable respuesta t_{ag} ($R^2 = 0,9934$) en función de las variables codificadas.

Factor	Coefficiente	p	
<i>Constante</i>	12,33	< 0,0001	<i>Significativo</i>
<i>T</i>	-18,00	< 0,0001	<i>Significativo</i>
<i>R</i>	-17,25	< 0,0001	<i>Significativo</i>
<i>T²</i>	16,42	< 0,0001	<i>Significativo</i>
<i>T*R</i>	11,50	< 0,0001	<i>Significativo</i>

Se puede observar que sólo las variables T y R resultaron significativas para t_{ag} . La ecuación 3.1 presenta el modelo para el t_{ag} (min) en función de T (°C) y R en variables no codificadas.

$$t_{ag} = 255,47596 - 12,39679 \times T - 141,53846 \times R + 0,16417 \times T^2 + 3,53846 \times T \times R \quad (3.1)$$

La Figura 3.3 muestra los gráficos de contorno (A) y de superficie de respuesta (B) obtenidos para la variable respuesta t_{ag} .

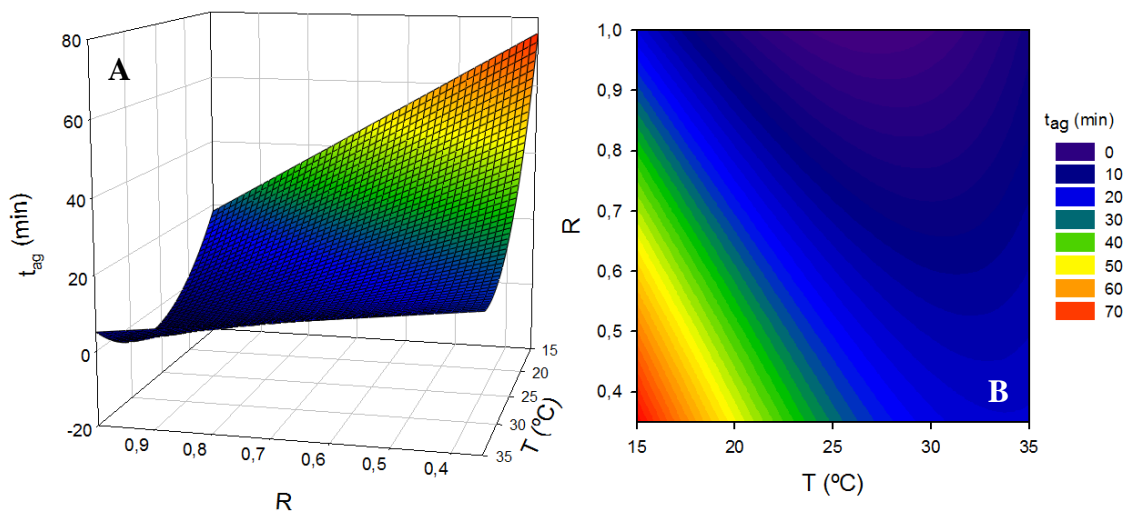


Figura 3.3. Gráficos de superficie de respuesta (A) y de contorno (B) de R y T (°C) vs t_{ag} .

De la ecuación 3.1 y de la Fig. 3.3, se infiere que T y R influyen negativamente sobre el t_{ag} . Teniendo en cuenta que la reacción de hidrólisis de la GDL es endotérmica, un aumento de la T produciría un aumento de la cantidad de ácido glucónico formado y, por ende, una mayor velocidad de acidificación del medio [125]. En consecuencia, los agregados proteicos iniciales de SPI se acercan más rápidamente a su pI y agregan a menores tiempos (menor t_{ag}). Además, un aumento en T favorecería las interacciones del tipo hidrofóbicas, fundamentales en este tipo de proceso de agregación proteica [167].

Por otro lado, un aumento de R induce también una disminución en el t_{ag} . A mayores R, se hidroliza mayor cantidad de GDL y, en consecuencia, la velocidad de protonación de los residuos ácidos proteicos es mayor. Esto produciría (al igual que con el efecto de T) un acercamiento más rápido al pI con la concomitante agregación proteica.

La variable respuesta pH_{ag} no fue afectada significativamente por ninguno de los tres factores estudiados en los rangos preestablecidos en el diseño experimental ($p > 0,05$) obteniéndose un valor constante de $5,7 \pm 0,2$. Esto puede indicar que, a las condiciones de trabajo ensayadas, no han existido modificaciones apreciables en la estabilidad electrostática de los los agregados iniciales de SPI, luego del proceso de desnaturalización térmica y rápido enfriamiento previo (sección 2.1.1). Se comprobó mediante el análisis de los β_0 , parámetro que estima el tamaño medio inicial de los agregados de SPI, que dicho tamaño no fue afectado significativamente por la concentración proteica, por lo cual la conformación inicial de los polipéptidos tendería a ser similar en todos los casos y, por ende, la accesibilidad de los protones a los residuos aminoacídicos protonables no presentaría cambios.

Por último, en la Tabla 3.3 se muestra el análisis ANOVA de la variable respuesta D_f .

Tabla 3.3. Análisis ANOVA para la variable respuesta D_f ($R^2 = 0,9872$) en función de las variables codificadas.

Factor	Coficiente	p	
<i>Constante</i>	3,90	< 0,0001	<i>Significativo</i>
<i>T</i>	$-6,625 \cdot 10^{-3}$	0,5868	<i>No significativo</i>
<i>R</i>	0,055	0,0016	<i>Significativo</i>
<i>%Prot</i>	0,22	< 0,0001	<i>Significativo</i>
<i>T²</i>	-0,26	< 0,0001	<i>Significativo</i>
<i>R*%Prot</i>	-0,055	0,0016	<i>Significativo</i>

La ecuación 3.2 representa el modelo para la variación de D_f en función de variables no codificadas de acuerdo al análisis ANOVA.

$$D_f = 1,62526 + 0,12874 \times T + 0,45038 \times R + 0,89733 \times \%Prot - 2,588 \cdot 10^{-3} \times T^2 - 0,45046 \times R \times \%Prot \quad (3.2)$$

Como los gráficos de contornos y de superficies de respuesta se hacen de a dos variables independientes, para cada caso se tomó como criterio fijar el valor de la tercer variable de acuerdo al punto central del diseño. Las Figuras 3.4, 3.5 y 3.6 muestran los gráficos de contorno y superficie de respuesta obtenidos para la variable respuesta D_f .

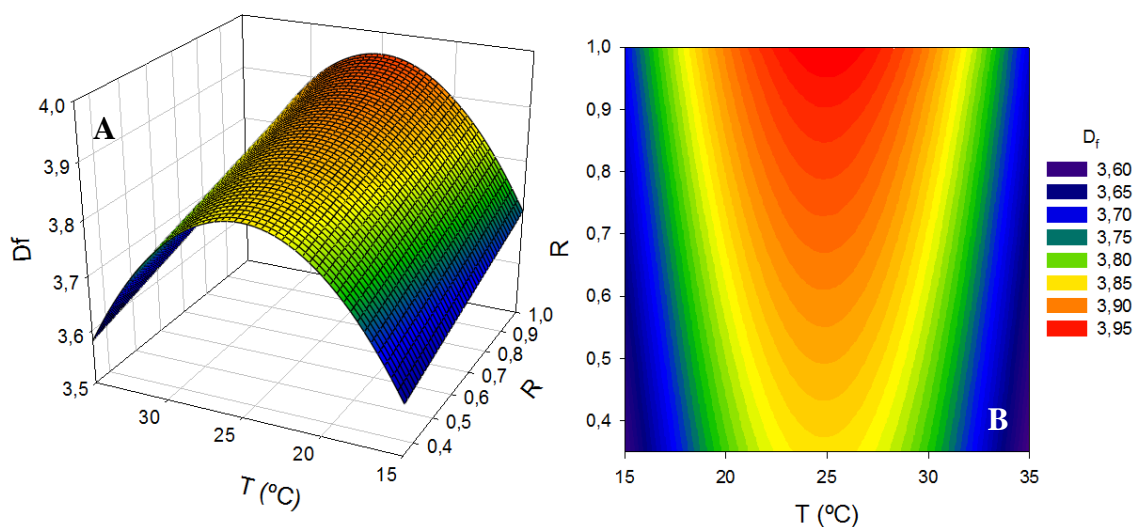


Figura 3.4. Gráficos de superficie de respuesta (A) y de contorno (B) de R y T (°C) vs D_f . El %Prot fue fijado en 0,625%^{P/P} de acuerdo al punto central del diseño.

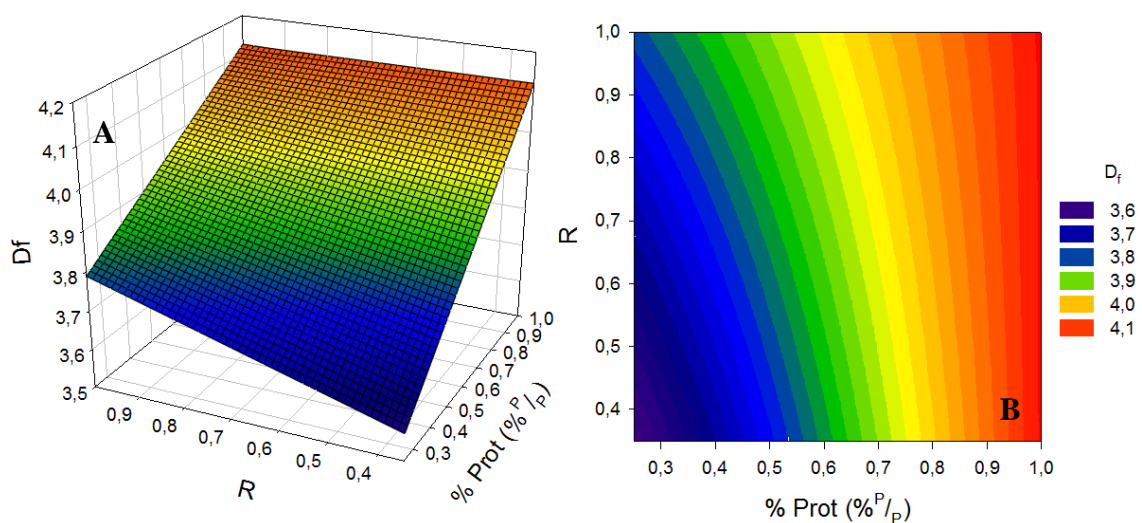


Figura 3.5. Gráficos de superficie de respuesta (A) y de contorno (B) de R y %Prot (%^P/_P) vs D_f . T constante de 25°C.

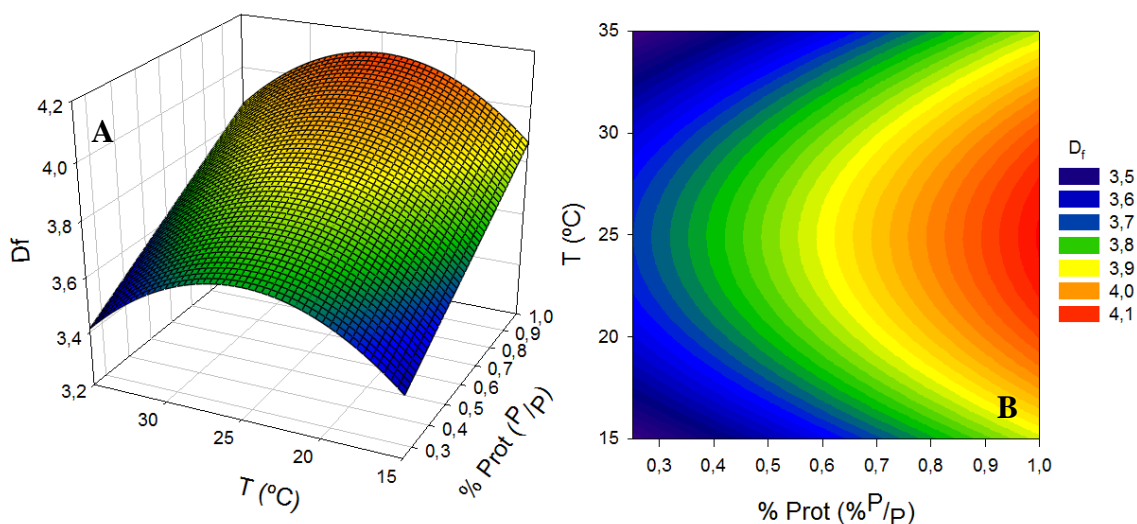


Figura 3.6. Gráficos de superficie de respuesta (A) y de contorno (B) de T (°C) y %Prot ($\%P/P$) vs D_f . R constante fijado en 0,675.

A valores constantes de %Prot (gráficos no mostrados) y, como puede observarse para el caso particular de la Figura 3.4 donde %Prot fue fijada en 0,625, la D_f aumenta conforme aumenta R a una T constante. Este comportamiento es contradictorio desde un punto de vista cinético, puesto a que se ha observado que el t_{ag} disminuye ante un aumento de R, por lo que los agregados proteicos tendrían menos tiempo para acomodarse, por lo que se esperaría la formación de agregados menos compactos (menor D_f). Sin embargo, el aumento de D_f es muy leve, e incluso podría no ser significativo si se tiene en cuenta el desvío estándar asociado al cálculo de este tipo de variable respuesta, donde se calcula D_f como el promedio de los últimos valores asintóticos a una recta perpendicular al eje de las ordenadas (sección 2.3.1.1). Lo mismo puede concluirse para el efecto de R a partir de lo observado en la Figura 3.5 a bajos valores de %Prot.

Por otro lado, para todos los R (Figura 3.4) y todos los %Prot (Figura 3.6) ensayados, se observa que la D_f adopta un valor máximo para $T \sim 25^\circ\text{C}$. Como se ha observado anteriormente, a mayores T las partículas proteicas agregan más rápidamente (menor t_{ag}), por lo que tendrían menos tiempo para que ocurran reordenamientos que promuevan la compactación de los agregados, esperándose menores valores de D_f . Esto es lo que explicaría el comportamiento de D_f en el rango $25^\circ\text{C} < T < 35^\circ\text{C}$. El aumento de T de 15°C a 25°C promueve, por el contrario, un incremento de D_f . Esto podría explicarse teniendo en cuenta la participación de las interacciones hidrofóbicas en el proceso de formación de los agregados ácidos. Como se mencionó anteriormente, si

bien este tipo de fuerzas contribuiría a la formación de agregados durante el proceso de acidificación (conduciendo a menores t_{ag}), en etapas finales del proceso tendrían un rol protagónico y determinante en el reordenamiento de los agregados, permitiendo un mayor grado de empaquetamiento de las partículas (mayores valores de D_f).

A partir de la Figura 3.6, puede observarse que a valores constantes de R y T, un aumento de %Prot promueve un aumento significativo de D_f . Este comportamiento resulta similar al publicado por Hidalgo y col. (2013) para la agregación ácida de caseinato de sodio bovino. En este caso, al aumentar la concentración proteica, aumenta la cantidad de partículas que forman parte de la red tridimensional formada al final del proceso de acidificación y, por lo tanto, los agregados resultante son más compactos (mayor D_f) [168].

Para la validación del diseño experimental, se procedió al cálculo de las variables respuesta t_{ag} y D_f del proceso de agregación ácida a 0,5 %Prot, R 0,35 y T en el rango 15-35°C (Figura 3.2), utilizando las ecuaciones modelo 3.1 y 3.2. Se comprobó que, para todos los casos, el error relativo entre los valores esperados y los experimentales no fueron superiores al 5%.

3.1.1.2. CLSM y análisis digital de imágenes

El análisis digital de imágenes se utilizó como complemento cuali y cuantitativo del seguimiento del proceso de agregación ácida. Como se indicó anteriormente en la sección 2.3.2.2, se tomaron micrografías por CLSM antes de la adición de GDL ($t = 0$ min) y a distintos tiempos una vez adicionada la misma, en las condiciones detalladas para el punto central del diseño de experimentos (Figura 3.7).

En la Figura 3.7A, los agregados solubles formados a partir de la desnaturalización proteica debido al calentamiento a 100 °C no son visualizados por esta técnica. Sin embargo, en la Figura 3.7B, a los 15 min de adicionada la GDL, ya se distinguen los primeros agregados observables distribuidos uniformemente en todo el sistema.

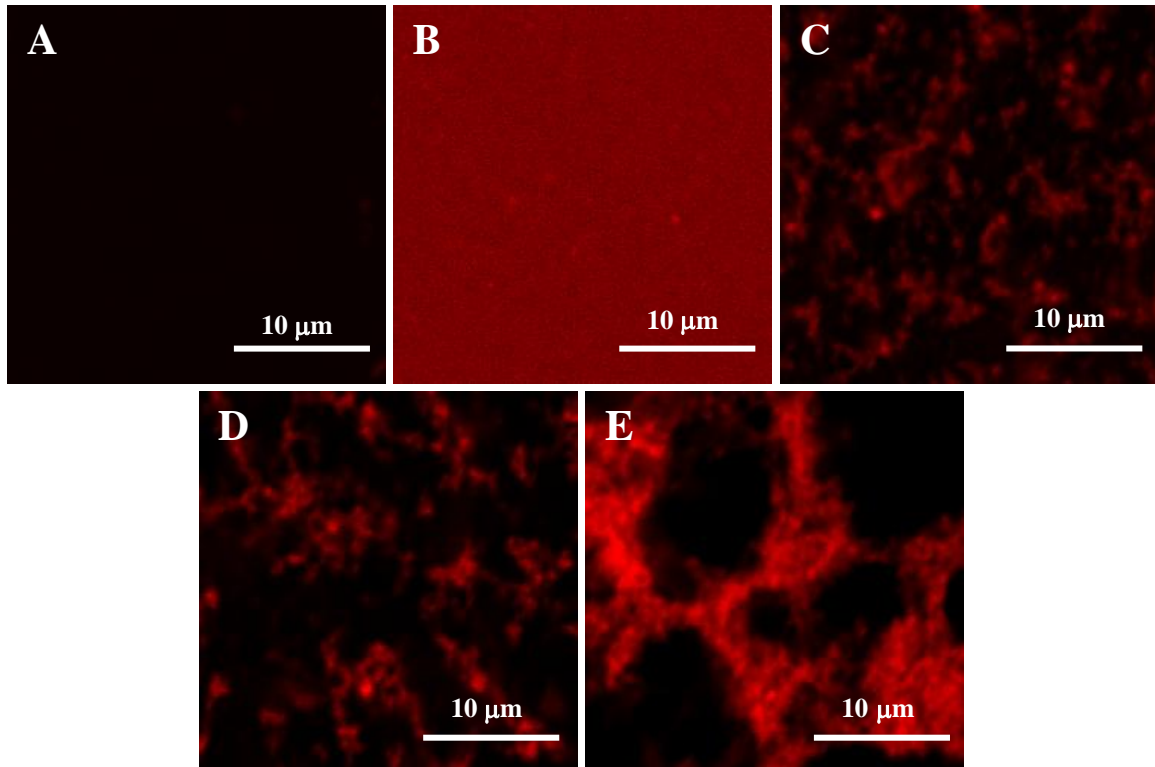


Figura 3.7. Micrografías tomadas por CLSM a diferentes t durante la agregación ácida del SPI una vez adicionada la GDL: 0 min (A); 15 min (B), 30 min (C), 45 min (D) y 60 min (E). %Prot 0,625; R 0,675 y T 25°C.

A medida que transcurre el t , estos agregados van aumentando de tamaño por subsiguientes asociaciones proteína-proteína evidenciándose una distribución más heterogénea en la imagen (Figura 3.7 C a E). En particular, en la Figura 3.7E se distingue la red o malla proteica.

Las imágenes obtenidas por CSLM fueron analizadas con el programa Python (sección 2.3.2.3) para calcular sus parámetros de textura, los cuales se presentan en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Parámetros de textura de las imágenes obtenidas por CLSM de dispersiones de SPI 0,625 %Prot a 25°C antes (0 min) y después de adicionada la GDL (15, 30, 45 y 60 min).

t (min)	S	K ($\times 10^{-3}$)	U ($\times 10^{-3}$)
0	$1,5 \pm 0,2^{*a}$	2 ± 1^a	420 ± 40^a
15	$3,81 \pm 0,07^b$	$8 \pm 3^{a,b}$	85 ± 5^b
30	$4,3 \pm 0,1^b$	17 ± 4^b	72 ± 4^b
45	$4,38 \pm 0,06^b$	14 ± 2^b	78 ± 8^b
60	$5,1 \pm 0,7^c$	46 ± 9^c	90 ± 90^b

(*) Valores expresados como promedio \pm desvío estándar.
Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Se puede evidenciar que, si bien antes de la adición de GDL (0 min) y a los 60 min de comenzada la acidificación existe un aumento significativo de S y K y una disminución significativa de U, los parámetros más representativos desde el punto de vista estadístico para un seguimiento gradual de la cinética del proceso (a tiempos intermedios) son S y K. Esto último convierte a esta técnica en una herramienta interesante para el estudio cinético de la agregación ácida y probablemente un complemento eficaz de otros seguimientos cinéticos más complejos como la espectroscopía de absorción (sección 3.1.1).

El aumento de los valores de S y K y la disminución de los valores de U a medida que transcurre la agregación ácida indica que las partículas coloidales proteicas que componen la red final de gel se localizan gradualmente en sectores bien definidos.

3.1.1.3. Evaluación de la gelación ácida por determinaciones reológicas

Las dispersiones de SPI con un contenido proteico de 3% P/P poseen la concentración suficiente para que el resultado final del proceso de agregación ácida sea la formación de un gel proteico detectable visualmente. En la Figura 3.8 se muestra la variación de los módulos G' y G'' con el t y el pH durante la formación del gel a distintas T.

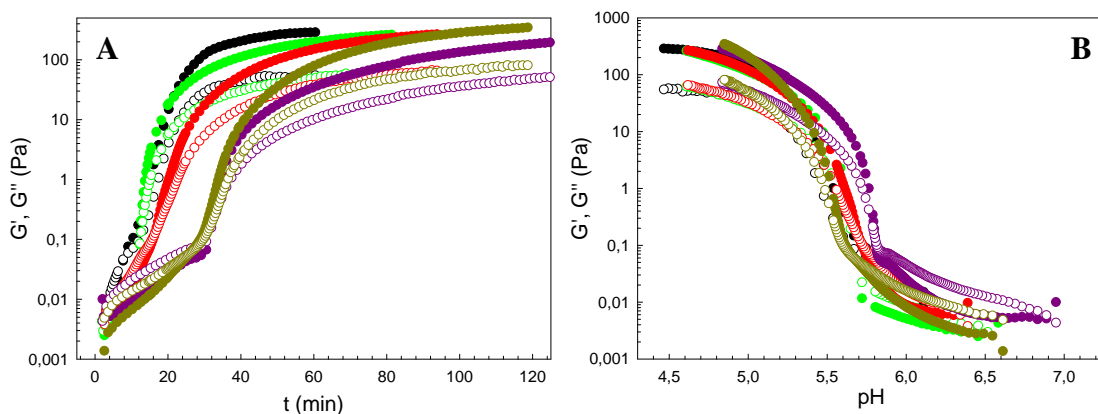


Figura 3.8. Variación de G' (símbolos llenos) y G'' (símbolos vacíos) en función del tiempo (A) y del pH (B) una vez adicionada la GDL a diferentes T: (●) 35°C; (●) 31°C; (●) 27°C; (●) 24°C; (●) 20°C. SPI 3 %Prot (P/P), R 0,35.

A partir de estas medidas se obtuvieron los valores de t_{gel} y pH_{gel} en el punto de gel al cual $G' = G''$, así como el valor de $G'_{máx}$ alcanzado, los cuales se informan en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Resultados de t_{gel} , pH_{gel} y $G'_{m\acute{a}x}$ obtenidos para los sistemas SPI 3%Prot posterior a la adici3n de GDL (R 0,35) a distintas T.

T (°C)	t_{gel} (min)	pH_{gel}	$G'_{m\acute{a}x}$ (Pa)
35	$8,6 \pm 0,4^{*a}$	$5,79 \pm 0,05^a$	$272 \pm 12^{*a}$
31	$12,7 \pm 0,6^b$	$5,66 \pm 0,06^a$	260 ± 14^a
27	$16,6 \pm 0,7^c$	$5,71 \pm 0,05^a$	264 ± 8^a
24	28 ± 2^d	$5,63 \pm 0,05^a$	337 ± 5^b
20	$31,3 \pm 0,9^e$	$5,81 \pm 0,05^a$	283 ± 10^a

(*) Valores expresados como promedio \pm desvıo estandar.
Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

El t_{gel} aumenta a medida que disminuye la T de trabajo, sin cambios significativos en el pH_{gel} . Por otro lado, el valor de $G'_{m\acute{a}x}$ fue significativamente mayor a los 24°C. Estos resultados refuerzan el comportamiento observado a travs del an\alisis espectrosc3pico para sistemas diluidos (secci3n 3.1.1.1). La T estarıa afectando al car\acter el\astico final de los geles a travs de dos procesos que ocurren simult\aneamente. Por una parte, un descenso de T disminuye la velocidad de gelaci3n permitiendo que se puedan realizar reordenamientos en la malla de gel por ruptura de algunas interacciones y formaci3n de otras nuevas que van aumentando el car\acter el\astico. Por otra parte, la mayor parte de las interacciones que participan en dichos reordenamientos son de tipo hidrof3bico y se hayan desfavorecidas al disminuir T. El valor del $G'_{m\acute{a}x}$ depender\a entonces del balance entre ambos efectos, siendo m\aximo a 24°C, T cercana a los 25°C en donde se inform3 la mayor D_f (apartado 3.1.1.1). Esto indicarıa que los geles con mayor elasticidad son aquellos cuya red es m\as compacta.

Adem\as, de acuerdo a trabajos previos [169], a diferencia de los geles de aislados proteicos de lactosuero, proteınas de conformaci3n globular al igual que las que componen los SPI, y obtenidos bajo las mismas condiciones, los geles de SPI no revirtieron y adem\as presentaron valores de $G'_{m\acute{a}x}$ aproximadamente 3 veces superiores. Esto puede deberse a la formaci3n de complejos solubles entre la glicinina y la β -conglucina. El calentamiento de los SPI a pH neutro (6,8-7,5) resulta en la desnaturalizaci3n de ambas proteınas y como consecuencia los puentes disulfuro entre los polip3ptidos \acidos y b\asicos de la glicinina se rompen produciendo la formaci3n de nuevos puentes disulfuro entre los polip3ptidos b\asicos de la glicinina y las subunidades β de la β -conglucina [170-171].

3.1.2. Efecto de la presencia de WSP sobre la agregación y gelación ácidas del SPI

Las muestras de WSP contienen una cantidad reducida de hidratos de carbono solubles del grano de soja que forman complejos estables con la lectina, proteína mayoritaria del suero de soja [172]. En los últimos años se realizaron estudios que demuestran que la glicosilación de las proteínas alimentarias, entre ellas las proteínas de soja, produce mejoras en sus propiedades funcionales (sección 1.3). Es por ello que resulta de interés investigar el efecto de la presencia de conjugados proteicos con pequeños azúcares del suero de soja sobre el proceso de agregación de los SPI. Por otro lado, se sabe que el calentamiento de dispersiones acuosas promueve la formación de agregados proteicos de tamaño y conformación significativamente influyente en el proceso de la formación de red proteica ante el agregado de GDL [118]. Es de esperarse que estos factores se vean influenciados por la composición proteica de la solución de partida. El análisis de éste fenómeno puede entonces además contribuir en dilucidar el proceso de gelación ácida en un medio mucho más complejo, como ocurre en el caso de dispersiones de harinas glicosiladas de soja.

Es de destacar que las soluciones de WSP no agregaron ante la adición de GDL en un rango de concentraciones entre 0,5 y 3 %Prot total y con R entre 0,35 y 1. A partir de esto, se decidió evaluar el efecto de la presencia de WSP sobre la agregación ácida de los SPI.

3.1.2.1. Evaluación de la agregación ácida por medidas turbidimétricas

Los WSP tienen un alto grado de pureza proteica (99%), son totalmente solubles en medio acuoso y las proteínas que los componen están en estado nativo. Como se indicó en el apartado 2.3.1.3, la agregación ácida del SPI y de las mezclas SPI/WSP en solución acuosa (0,5 %Prot total) fue evaluada por los cambios de τ en función del t y del pH luego de la adición de GDL con un R de 0,35 (Figura 3.9).

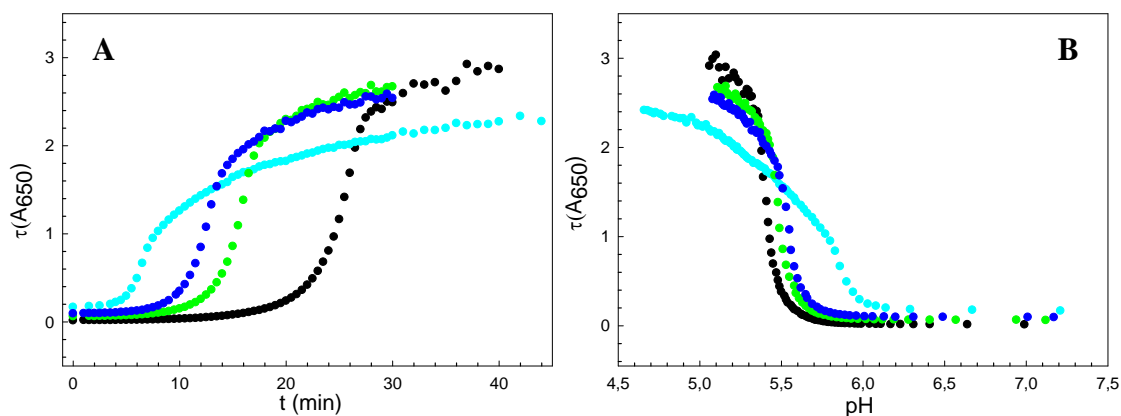


Figura 3.9. Variación de τ de dispersiones acuosas de mezclas de SPI/WSP de 0,5 %Prot en función del t (A) y del pH (B), luego de adicionada la GDL, para distintas relaciones proteicas de SPI/WSP: (●) 0,5/0; (●) 0,375/0,125; (●) 0,25/0,25; (●) 0,125/0,375. R 0,35, T 35°C.

Como puede observarse, en presencia de WSP el proceso de acidificación de los SPI sigue conservando dos etapas (sección 3.1.1.1).

En la Figura 3.10 se muestra la variación del tamaño medio de las partículas proteicas a través del seguimiento del parámetro β . A $t = 0$ se revela un aumento del tamaño medio inicial de las partículas en las mezclas SPI/WSP, de mayor magnitud a medida que aumenta la fracción de WSP. Esto indicaría la formación de complejos por interacción entre las proteínas que forman parte del SPI y WSP, que crecen en tamaño medio con el aumento de la cantidad relativa de WSP.

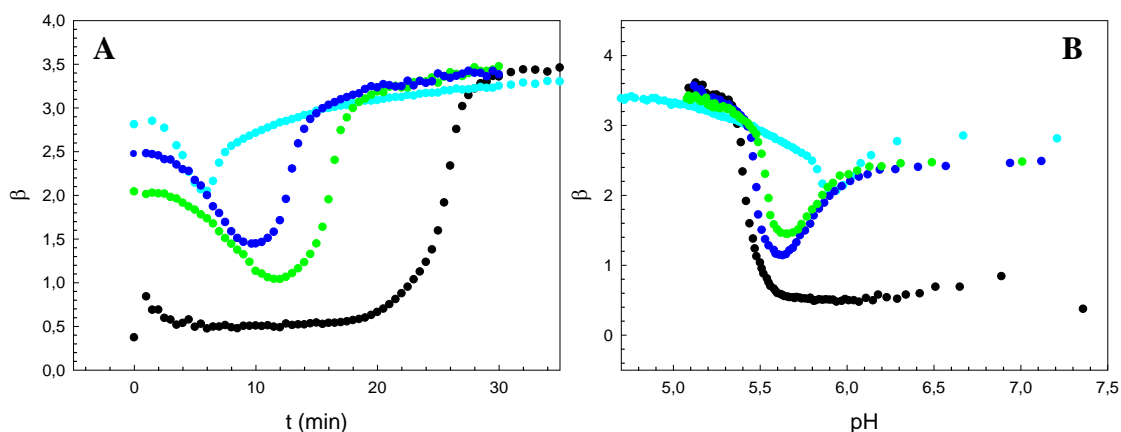


Figura 3.10. Variación del parámetro β de SPI y mezclas SPI/WSP 0,5 %Prot en función del t (A) y del pH (B), luego de adicionada GDL, para distintas relaciones proteicas de SPI/WSP: (●) 0,5/0; (●) 0,375/0,125; (●) 0,25/0,25; (●) 0,125/0,375. R 0,35, T 35°C.

Por otra parte, también se observa una disminución significativa del t_{ag} a medida que crece la relación WSP/SPI, como se indica en Tabla 3.6. Este aumento se ve

acompañado de un aumento significativo del pH_{ag} para la relación proteica con fracción de WSP más elevada. Las partículas iniciales de mayor tamaño serían más inestables y comenzarían el proceso de agregación antes.

Tabla 3.6. Valores de t_{ag} , pH_{ag} y D_f obtenidos para las diferentes mezclas SPI/WSP y SPI una vez adicionada GDL. 0,5 %Prot, R 0,35, T 35°C.

Relación proteica SPI/WSP (% P/p/% P/p)	t_{ag} (min)	pH_{ag}	D_f
0,5/0	$18,5 \pm 0,5^{*a}$	$5,60 \pm 0,02^a$	$3,61 \pm 0,08^a$
0,375/0,125	$12,8 \pm 0,3^b$	$5,61 \pm 0,05^a$	$3,47 \pm 0,04^b$
0,25/0,25	$9,5 \pm 0,3^c$	$5,69 \pm 0,04^a$	$3,44 \pm 0,04^b$
0,125/0,375	$5,5 \pm 0,3^d$	$5,90 \pm 0,02^b$	$3,37 \pm 0,02^c$

(*) Valores expresados como promedio \pm desvío estándar.
Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La causa de la disminución de t_{ag} se encuentra relacionada también al incremento de la velocidad de descenso de pH como se muestra en la Figura 3.11.

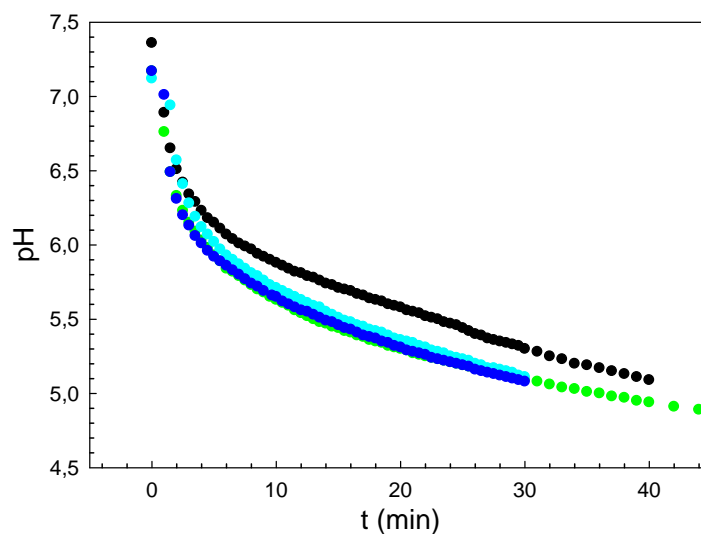


Figura 3.11. Variación del pH de SPI y mezclas de SPI/WSP 0,5 %Prot (% P/p) con el t luego de adicionada GDL, para distintas relaciones proteicas SPI/WSP: (●) 0,5/0; (●) 0,375/0,125; (●) 0,25/0,25; (●) 0,125/0,375. R 0,35, T 35°C.

El grado de compactación de los agregados disminuyó al aumentar la proporción de WSP, probablemente a causa de la disminución de la reestructuración de las interacciones por el aumento de la velocidad de agregación.

3.1.2.2. Evaluación de la gelación ácida

3.1.2.2.1. Evaluación de la microestructura por OCM y CLSM

Previo al estudio de la microestructura de los geles ácidos, se evaluó la microestructura de las dispersiones de SPI y sus mezclas con WSP por CLSM antes de la adición de la GDL ($t = 0$) preparadas como se indicó en el apartado 2.1.8. Las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 3.12.

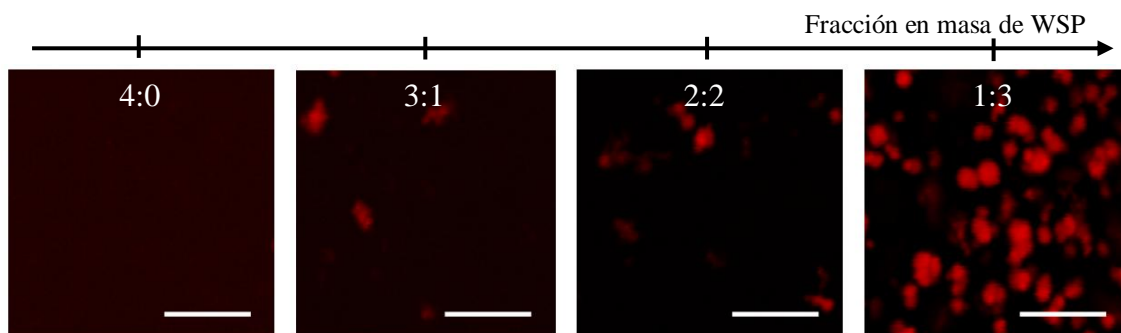


Figura 3.12. Microestructura de dispersiones acuosas de SPI y sus mezclas con WSP antes de ser adicionada la GDL. La concentración proteica fue constante para todos los casos e igual a 3% P/p. La barra de escala indica 10 μ m.

Puede observarse que, en ausencia de WSP, los agregados de los SPI teñidos con rodamina son tan pequeños que la resolución alcanzada por CLSM no es suficiente para una apreciación individual de los mismos, obteniéndose una imagen de un color levemente rosado y uniforme. Cuando las proteínas séricas están presentes, comienzan a visualizarse agregados cada vez en mayor número y tamaño a medida que la fracción proteica de WSP aumenta. Al mismo tiempo también se observa que el color levemente rosado del fondo de la imagen desaparece y esto se debe a que los agregados más pequeños van desapareciendo de la dispersión. Como se observó anteriormente para sistemas diluidos, las proteínas de reserva que conforman los SPI se encontrarían formando complejos con las proteínas del suero y de mayor tamaño a medida que aumenta la fracción en masa de estas últimas.

Distintos autores han reportado que durante el tratamiento hidrotérmico de proteínas globulares que presentan grupos sulfhidrilos ($-SH$) y enlaces disulfuro ($-S-S-$) pueden ocurrir entrecruzamientos covalentes entre las cadenas polipeptídicas ya sea por oxidación de los grupos $-SH$ y/o por reacciones de intercambio de enlaces disulfuro (inducidas por $-SH$) [173]. Debido a que el KTI y el BBTI poseen una mayor composición de aminoácidos azufrados que las proteínas de reserva, su presencia en el

sistema proteico de partida aumentaría la probabilidad de formación de puentes disulfuro entre las proteínas y, por ende, la aparición de agregados de mayor tamaño.

Para el estudio de la microestructura de los geles ácidos de los sistemas concentrados de SPI y SPI/WSP se tomaron imágenes de los sistemas por OCM y CLSM de acuerdo a las secciones 2.3.2.1 y 2.3.2.2 (Figura 3.13).

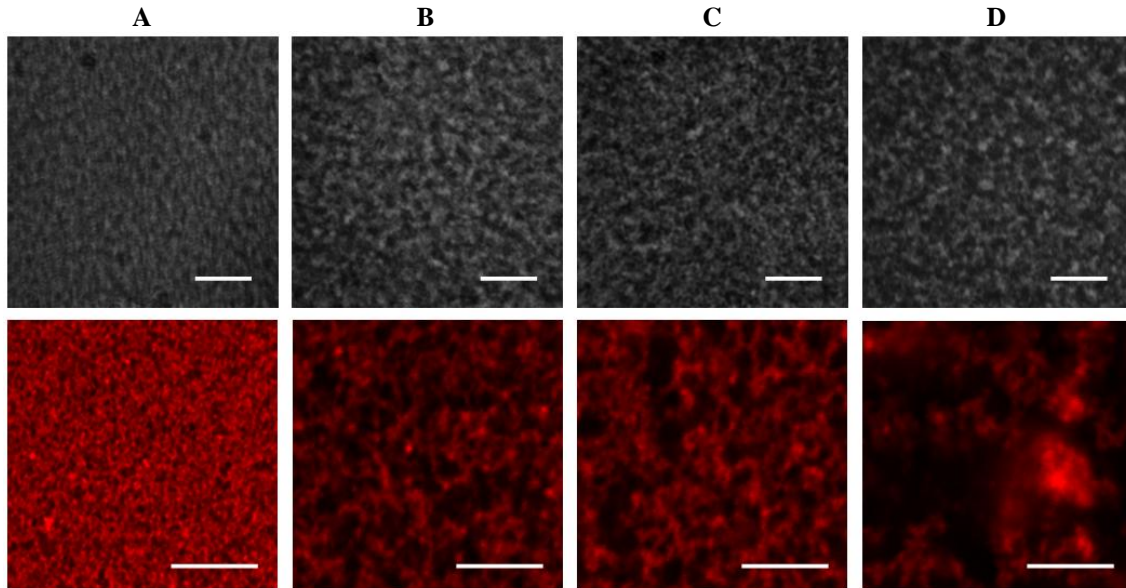


Figura 3.13. Imágenes digitales obtenidas por OCM (arriba) y CLSM (abajo) de geles ácidos de 3 %Prot (%^P/_P) de SPI (A) y sus mezclas con WSP para distintas relaciones proteicas SPI/WSP: 2,25/0,75 (B); 1,5/1,5 (C) y 0,75/2,25 (D). R 0,35, T 35°C. Las barras de escala indican 10µm.

A través del análisis digital de las imágenes obtenidas, se obtuvieron los diámetros promedio de los poros (sección 2.3.2.3) que se presentan en la Figura 3.14.

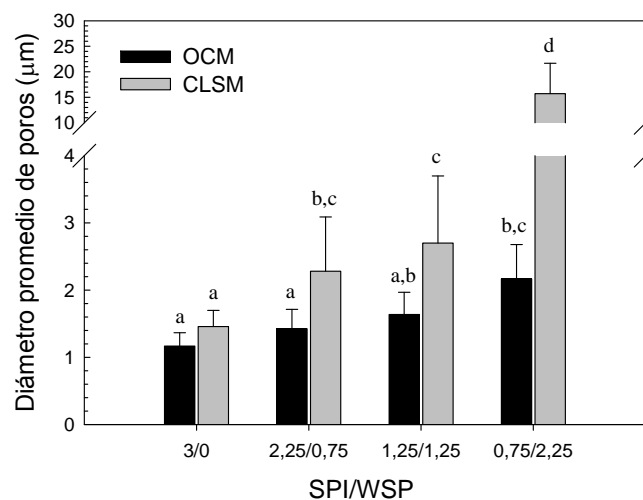


Figura 3.14 Valores de diámetros de poros para geles ácidos de SPI y sus mezclas con WSP (3% Prot total) de imágenes obtenidas por OCM y CLSM. Las relaciones proteicas SPI/WSP se expresan en %^P/_P. R 0,35 y T 35°C. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tanto para OCM como para CLSM se observa un aumento significativo del tamaño medio de los poros al aumentar la proporción de WSP en los sistemas, de manera que los geles de proteínas globulares de soja en presencia de proteínas séricas tienden a ser menos compactos. Este incremento fue más evidente para los sistemas evaluados por CLSM, especialmente en presencia de una mayor cantidad de WSP. Por otro lado, estos resultados demostraron una buena correlación con los obtenidos para los sistemas diluidos, donde se reveló una tendencia hacia un menor grado de compactación de los agregados proteicos a mayores cantidades relativas de WSP (sección 3.2.2.1).

En la Figura 3.15 se muestran los valores obtenidos de los parámetros seleccionados para evaluar la textura a partir de las imágenes de los geles ácidos.

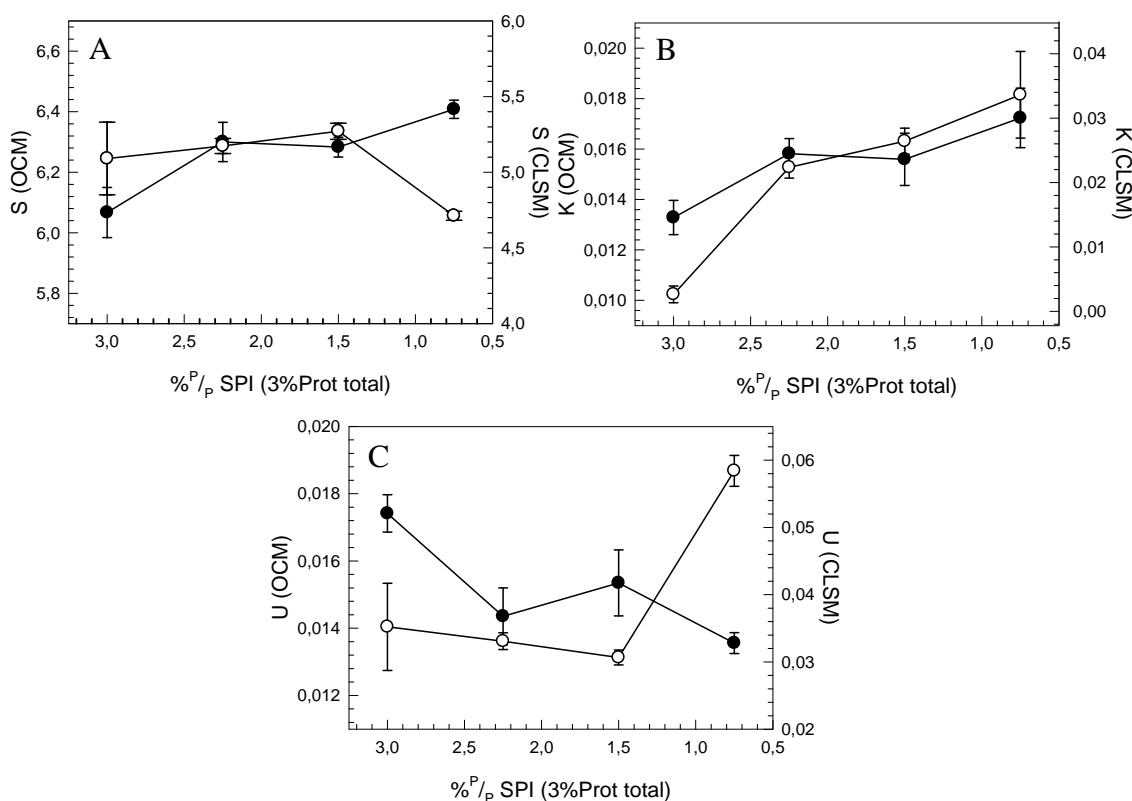


Figura 3.15. Parámetros de textura correspondientes a imágenes de geles ácidos de SPI y sus mezclas con WSP a diferentes relaciones proteicas (3% Prot total) obtenidas por OCM (●) y CLSM (○). R 0,5, T 35°C.

En primer lugar, se puede observar en la Figura 3.15A que los valores de S obtenidos a partir de las imágenes adquiridas por OCM aumentan significativamente a medida que se incrementa la fracción de WSP en las mezclas (menor fracción de SPI). Esta tendencia estaría indicando una disminución en las interconectividad de la red proteica asociada a un aumento en el diámetro promedio de poros. Sin embargo, las

imágenes obtenidas por CLSM presentaron un comportamiento opuesto y significativo solo a la mayor proporción de WSP ($p < 0,05$). Esto puede explicarse teniendo en cuenta que las proteínas están formando parte de agregados cada vez de mayor tamaño y, por ende, se encuentran en concentraciones locales cada vez más elevadas en todo el volumen del sistema. Es sabido que para CLSM es necesaria la utilización de un colorante fluorescente para lograr la visualización de proteínas (Rodamina B en nuestro caso), y que las imágenes son obtenidas a través de cortes (plano xy) a diferentes profundidades de las muestras (eje z). En consecuencia, la distribución del color rojo se va perdiendo a lo largo y a lo ancho de la imagen debido a que el colorante se encuentra asociado a las cadenas polipeptídicas que conforman dichos agregados. Por lo tanto, la variabilidad e intensidades de la escala de grises de la imagen es menor y S disminuye.

Por otra parte, los valores obtenidos de U presentan tendencias exactamente opuestas a las observadas para el parámetro S en OCM y CLSM (Figura 3.15C). Esto es debido a que su valor aumenta con la falta de variabilidad del histograma de grises de las imágenes.

Por último, se observa que para ambas técnicas microscópicas el parámetro K aumenta a medida que la cantidad relativa de WSP se incrementa. Por lo tanto, independientemente de la metodología aplicada para la obtención de las imágenes, es el único estimador que representa con mayor fidelidad la influencia de la presencia de WSP en el grado de empaquetamiento de los geles ácidos de SPI, generándose mallas menos ordenadas con poros menos definidos.

Es de destacar que el procedimiento basado en la determinación de parámetros de textura de imágenes obtenidas por OCM demostró ser más adecuado para la evaluación de cambios en la microestructura de geles ácidos de SPI/WSP debido a que los 3 estimadores propuestos representaron en mejor medida los cambios observados en el entramado proteico. Además, esta técnica no presenta otras desventajas asociadas a CLSM, como la necesidad de personal especializado para el manejo del equipo, la utilización de marcadores fluorescentes, etc.

3.1.2.2.1. Determinación de las propiedades reológicas

Como se indica en el apartado 2.3.1.3, se promovió la gelificación por adición de GDL (R 0,35) a una dispersión de SPI y a diferentes dispersiones de mezclas con WSP para una concentración de proteína total constante de 3% P/P a 35°C. Se registraron los módulos G' y G'' en función del t y el pH de manera tal que se pudieron obtener las siguientes gráficas (Figura 3.16 A y B).

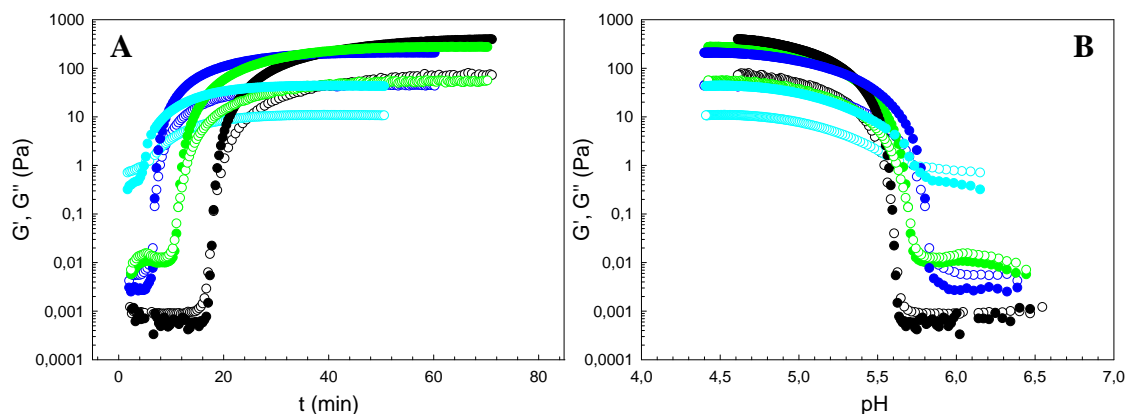


Figura 3.16. Variación de G' (símbolos llenos) y G'' (símbolos vacíos) en función del tiempo (A) y del pH (B) una vez adicionada la GDL para SPI (●) y sus mezclas con WSP de 3 %Prot total (% P/P) a diferentes relaciones proteicas SPI/WSP: (●) 2,25/0,75; (●) 1,5/1,5 y (●) 0,75/2,25. R 0,35, T 35°C.

A simple vista, puede observarse que, al aumentar la proporción de WSP, los t_{gel} son más cortos. Esto también se evidenció para los sistemas más diluidos (menor t_{ag}), lo cual corroboraría que la presencia de WSP disminuye la estabilidad coloidal del SPI y, por lo tanto, acelera el proceso de gelificación ácida. Por otro lado, también se observaron G'_{max} cada vez más pequeños, en correlación con lo observado anteriormente en lo que respecta a los valores de D_f . En la tabla 3.7 se presentan los valores obtenidos de t_{gel} , pH_{gel} y G'_{max} para estos sistemas.

Tabla 3.7. Tiempo y pH al cual comienza la gelificación (t_{gel} y pH_{gel}), G'_{max} durante gelificación de SPI y sus mezclas con WSP por acción de la GDL (R 0,35) a 35°C. La concentración total proteica fue de 3% para todos los sistemas.

SPI/WSP	t_{gel} (min)	pH_{gel}	G'_{max} (Pa)
3/0	$16 \pm 1^{*a}$	$5,64 \pm 0,04^a$	$389 \pm 3^{*,a}$
2,25/0,75	$10,4 \pm 0,5^b$	$5,71 \pm 0,07^{a,b}$	275 ± 6^b
1,5/1,5	$6,0 \pm 0,2^c$	$5,8 \pm 0,1^b$	184 ± 30^c
0,75/2,25	5 ± 1^c	$5,76 \pm 0,02^b$	44 ± 2^d

(*) Valores expresados como promedio \pm desvío estándar.
Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Al igual que lo observado en los sistemas diluidos y como se observara en las imágenes digitales de la Figura 3.13, la presencia de los WSP aumenta la desestabilización coloidal debido a la presencia de agregados (previo a la adición de GDL) de tamaño y cantidad cada vez mayor a medida que se incrementa la proporción de WSP.

Por otra parte, como se observa en la Figura 3.17, la velocidad de descenso del pH para estos sistemas se ve afectada por la proporción de SPI y WSP, de manera tal que es cada vez mayor al aumentar la de WSP. Esto trae como consecuencia que el aumento de pH_{gel} sea significativo cuando la proporción de WSP es el 50% en la mezcla.

Además, la presencia de los WSP trae como consecuencia la disminución del grado de elasticidad de los geles ácidos (menor G'_{max}). Es decir, que las proteínas del suero que estarían formando agregados por interacción con las proteínas de reserva que forman los SPI, disminuirían las interacciones proteína-proteína entre estas últimas, fundamentales para la formación de la red de gel.

En conclusión, los geles ácidos obtenidos son cada vez menos compactos, con poros cada vez más grandes y con menor elasticidad a medida que aumenta la proporción de WSP.

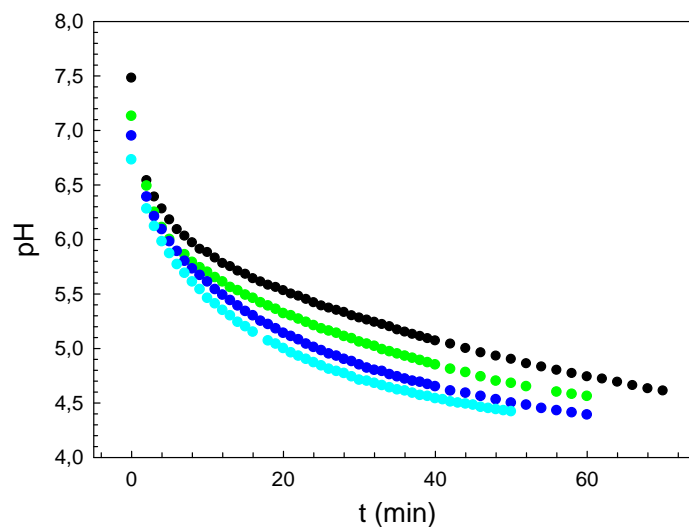


Figura 3.17. Velocidad de descenso del pH durante la gelificación ácida de SPI 3% (●) 0,5/0 y sus mezclas con WSP: (●) 2,25/0,75; (●) 1,5/1,5 y (●) 0,75/2,25. R 0,35, T 35°C.

3.2. Evaluación de las propiedades estructurales y funcionales de harinas glicosiladas de soja

3.2.1. Caracterización de harinas glicosiladas de soja

3.2.1.1. Análisis de la harina de soja activa de partida

Con el fin de evaluar los efectos producidos por los tratamientos térmicos en dispersión acuosa y en seco se realizó, en primer lugar y a fines comparativos, una caracterización de la harina de partida control (muestra F). La fracción proteica fue totalmente soluble en KOH 0,2% P/P presentando un valor de $(51,9 \pm 1,2) \% P/P$, idéntico al obtenido por el método de referencia para el dosaje de proteínas totales (Método de Kjeldahl) y coherente con la composición de la harina de soja en general. Sin embargo, la solubilidad en agua fue de un 59% P/P de la obtenida en KOH. El proceso de extracción industrial de materia grasa utiliza un solvente orgánico como el n-hexano, el cual induce agregación de las proteínas de la soja. No obstante, los agregados están formados mayoritariamente por interacciones no covalentes y son fácilmente disociables en medio alcalino, explicando de esta manera la diferencia observada entre ambas solubilidades.

Por otro lado, la harina activa presentó una AU igual a 2,0, una AA igual a (559 ± 12) UTI/mg y un contenido de Lys reactiva de 6,44 g/16gN. Los ensayos de DSC de sus dispersiones concentradas sin tratamiento térmico indican que las globulinas de reserva y las proteínas del suero de soja están en estado nativo. La existencia de una endoterma de desnaturalización, con temperatura de pico (T_p) de 77 °C, a la cual contribuye el KTI, está de acuerdo con los altos valores obtenidos de AU y AA.

3.2.1.2. Evaluación del grado de glicosilación sobre las propiedades estructurales de las proteínas de soja en harina tratada

3.2.1.2.1. Influencia del estado de subdivisión de la dispersión de harina de soja frente a diferentes tratamientos térmicos

Los resultados mostrados en la Figura 3.18 para %LG, %S_w y %S_{KOH} indican que la glicosilación fue notablemente influida por el estado de homogenización de la dispersión. Independientemente de las condiciones de calentamiento, los valores obtenidos para %LG mantuvieron la tendencia en el orden: dispersión V > dispersión U > dispersión M.

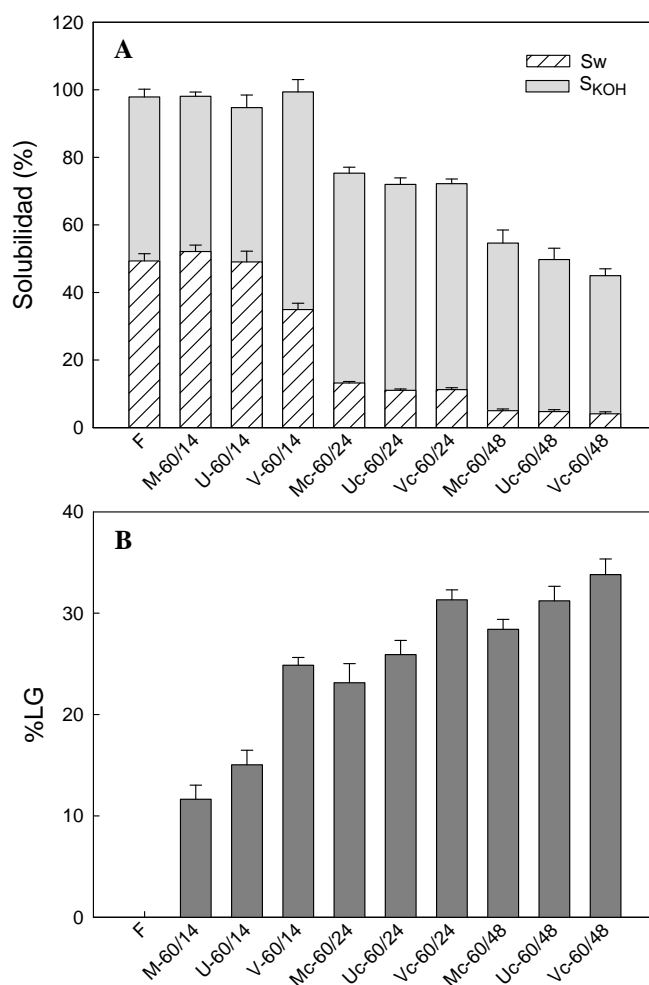


Figura 3.18. Solubilidad proteica en agua destilada y en 0,2% P/P KOH (A) y %LG (B) correspondientes a muestras provenientes de dispersiones de diferente grado de subdivisión de harina de soja desgrasada tratada térmicamente en distintas condiciones.

Como se describió detalladamente en las secciones 1.2.2 y 1.2.1, la harina desgrasada de soja activa contiene aproximadamente 50% de proteínas y 38% de carbohidratos. Debido a esta composición, el tratamiento térmico de las dispersiones de harina de soja induce reacciones de glicosilación, en un grado que depende de la temperatura y la HR pero también de la disponibilidad de proteínas y carbohidratos dada por granulometría inicial de la muestra. La homogeneización favorece la extracción proteica de los cuerpos de inclusión, donde se encuentran las proteínas de reserva mayoritarias en el grano (y harina) de soja.

Es importante destacar que a pesar de que los tratamientos térmicos condujeron en la mayoría de los casos hacia una pérdida de S_{KOH} y S_w , la disminución de %LG no es atribuible a una menor cantidad de proteína soluble debido a que cada muestra fue solubilizada en su totalidad en una solución SDS 1% P/V a 100°C para la determinación de LG (sección 2.1.6). Por lo tanto, un aumento del grado de

glicosilación está asociado al bloqueo de los grupos ϵ -amino de residuos de Lys y, en menor medida, al bloqueo de grupos α -amino terminales.

Con la homogeneización a válvula, que es la condición de más alta energía de ruptura y dispersión utilizada, se alcanzaron los valores promedio más altos de %LG (24,9; 31,3 y 33,8 para V-60/14, Vc-60/12 y Vc-60/24 respectivamente) (Figura 3.18B). A similares condiciones de homogeneización, los valores de %LG fueron decreciendo a menor tiempo de almacenamiento en HR controlada.

Respecto a las muestras tratadas, la solubilidad en agua fue notablemente baja en las almacenadas a HR controlada (9-10% y 4-5% para 24 y 48 h de almacenamiento respectivamente) con respecto a las muestras sin HR controlada (35-50%). Al ser medida en KOH 0,2% P/P , la solubilidad fue más baja (70-75% y 45-55% para 24 y 48 h de almacenamiento respectivamente) frente a 95-100% para las muestras sin HR controlada (Figura 3.18A). Para una misma condición de homogeneización, se observó una buena correlación entre %LG y la solubilidad en ambos medios (Figura 3.19).

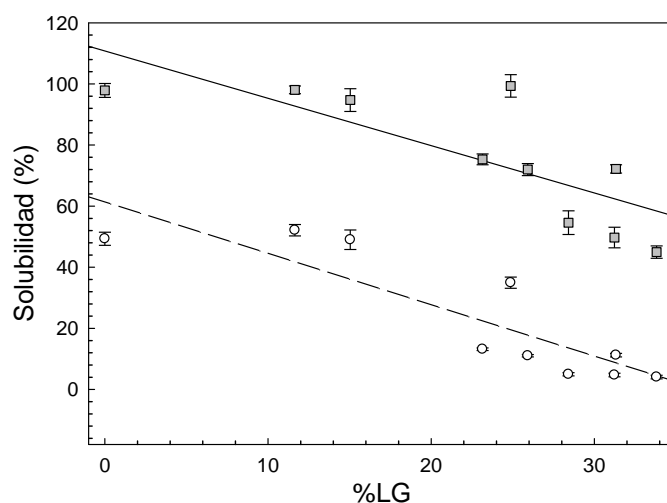


Figura 3.19. Correlación entre los porcentajes de solubilidad proteica y lisina glicosilada en harina de soja tratada térmicamente en distintas condiciones iniciales de homogeneización. R^2 : 0,76 y 0,75 para la correlación lineal de solubilidad en agua (○) y en KOH 0,2% P/P (■), respectivamente.

La reducción de residuos de Lys reactiva por efecto de la glicosilación es menor a la disminución de solubilidad en ambas condiciones (Figura 3.19). Este resultado sería atribuible a la agregación proteica por interacciones no covalentes y en menor medida por intercambio $-SH/-S-S-$, dado que las condiciones de tratamiento térmico no son lo suficientemente drásticas para favorecer la formación de isopéptidos. Sin embargo, de acuerdo a Araba y Dale (1990), una pérdida aproximada del 20% en la

S_{KOH} puede considerarse aceptable, por lo que las muestras tratadas a 60°C y HR 79% por 48 h (Mc, Uc y Vc -60/48) tendrían un sobreprocesamiento térmico [111]. Además, éstas últimas presentaron valores de contenido de Lys reactiva menores a $5\text{g}/16\text{g N}$, el valor mínimo estipulado por el CAA (capítulo XIX, artículo 1407) [163].

Con el objetivo de evaluar el efecto de los tratamientos térmicos sobre el grado de desnaturalización de las proteínas constituyentes de la harina, se llevaron a cabo estudios de DSC.

Un termograma de dispersiones de harina de soja en agua destilada presenta dos endotermas de desnaturalización bien definidas. La globulina 7S, el KTI, la fracción más termolábil del BBTI y otras proteínas minoritarias como la lipoxigenasa y α -amilasa contribuyen a la endoterma de menor T_p , en tanto que la globulina 11S y la lectina contribuyen a la endoterma de mayor T_p [13]. Además, Sorgentini y Wagner (1999) mostraron que las globulinas de reserva, a diferencia de las proteínas del suero de soja, tienen una estabilidad térmica fuertemente dependiente de la fuerza iónica, de modo que si se calienta una dispersión de aislado de soja en una solución de NaCl 1M, las transiciones térmicas 7S y 11S se producen a $17,4$ y $20,3^{\circ}\text{C}$, respectivamente, por encima de las obtenidas en agua. En este contexto, la Figura 3.20 muestra para la harina de partida control (F) las tres endotermas características.

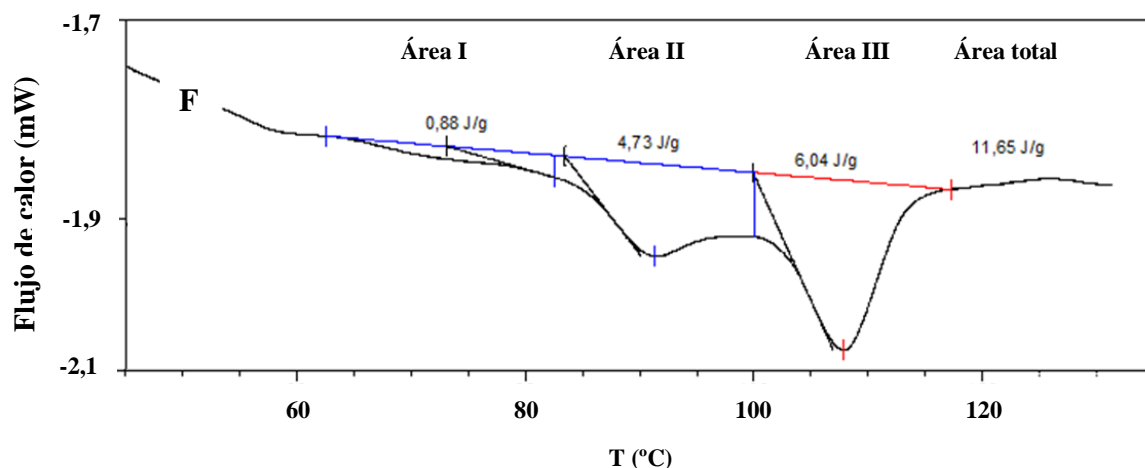


Figura 3.20. Termograma obtenido por DSC de una dispersión 30%^{P/P} de la muestra de harina de soja control (F) en NaCl 1M.

Las dos endotermas de mayor T_p (~ 90 y $\sim 110^{\circ}\text{C}$, aproximadamente) corresponden a la desnaturalización térmica de las globulinas de reserva 7S y 11S, mientras que el pico de menor T_p ($70\text{-}72^{\circ}\text{C}$) corresponde mayoritariamente a la desnaturalización del KTI. Dado que la estabilidad de las proteínas del suero de soja

permanece inalterada a alta fuerza iónica, existe un solapamiento entre las endotermas de desnaturalización de la globulina 7S y la lectina.

Para todas las muestras analizadas, no se observaron diferencias significativas de las T_p , por lo que los procesos de agregación y/o desnaturalización proteica no producirían cambios en su estabilidad térmica ($p > 0,05$). Sin embargo, a pesar que el análisis de los termogramas permitió corroborar que en todas las muestras se conservan las endotermas correspondientes a 7S + lectina y 11S, se observó una reducción de las entalpías parciales (Áreas II y III respectivamente), en mayor grado en las muestras Vc-60/24 y Vc-60/48 (Tabla 3.8).

Tabla 3.8. Entalpías de desnaturalización parcial ($\% \Delta H_d$) obtenidas a partir de los termogramas obtenidos por DSC para la muestra control F y las dispersiones acuosas de harinas de soja glicosiladas en condiciones de HR controlada. Se consideró como 100% ΔH_d a los valores obtenidos para la harina de partida F. El desvío estándar no supera el 5%.

Muestra	$\% \Delta H_d$		
	Área I	Área II	Área III
F	100	100	100
Uc-60/24	21,8	67,0	68,6
Uc-60/48	1,0	60,2	67,5
Mc-60/24	26,6	80,7	75,7
Mc-60/48	5,1	78,9	86,1
Vc-60/24	6,9	68,5	62,7
Vc-60/48	3,9	47,6	38,4

Si bien durante los tratamientos térmicos la temperatura no superó los 60 °C, el tiempo prolongado de almacenamiento en condiciones de alta HR provocó la desnaturalización parcial de las proteínas de reserva (Áreas II y III). Este fenómeno donde proteínas naturalmente estables a la T de tratamiento demuestran un incremento en el grado de desnaturalización, fue reportado por Liu y col. (2014) para sistemas formados por proteínas de lactosuero y glucosa y fue atribuido exclusivamente a procesos de glicosilación proteica. Estos autores explican que la reducción de ΔH_d puede deberse a la ruptura de fuerzas intramoleculares de las proteínas cuando éstas se unen covalentemente a los azúcares. Incluso, infieren que también ocurre un aumento en los sitios hidrofóbicos de la superficie proteica que promovería la agregación proteína-proteína [77].

Además, se pudo observar que el menor grado de subdivisión inicial de la dispersión promovió una mayor desnaturalización proteica en condiciones controladas de HR, especialmente a las 48 h de tratamiento.

Por otra parte, el Área I (KTI-Ureasa) se redujo ampliamente, en un mayor grado para las muestras tratadas en condiciones de HR controlada, y en mayor medida para la muestra Vc-60/24 y todas las muestras tratadas a 48 h, lo cual indicaría una avanzada desnaturalización del KTI a altos grados de glicosilación.

Debido a la complejidad de la muestra y a las nuevas interacciones que surgen durante los tratamientos térmicos, sería esperable que puedan detectarse diferencias entre tratamientos mediante los espectros FTIR, fundamentalmente en las bandas amida I y II que son características de proteínas [174]. Sobral y col. (2012) observaron que el proceso de inactivación industrial de la harina de soja desgrasada por desolventización-tostado produjo una importante disminución de intensidad en las bandas de amida I y II, a pesar de que la pérdida de Lys reactiva fue menor al 5% y la de la S_{KOH} de 14-18%, poniendo de manifiesto la sensibilidad de la técnica de FTIR para cambios inducidos por tratamientos térmicos [175]. Además, otros autores han demostrado que la reacción de Maillard promueve una disminución de la intensidad de las bandas amida I y II cuando se forman glicoconjugados entre SPI/carboximetilcelulosa y proteínas de lactosuero/glucosa [77, 176]. En este contexto, la Figura 3.21A muestra los espectros FTIR de las harinas homogeneizadas a alta presión y tratadas térmicamente (V-60/14, Vc-60/24 y Vc-60/48) comparativamente con el control F. Es en estas muestras tratadas con el método de homogeneización de mayor energía, donde se observó la mayor pérdida de S_w y S_{KOH} y el mayor %LG respecto a aquellas tratadas por agitación magnética y el dispositivo Ultraturrax.

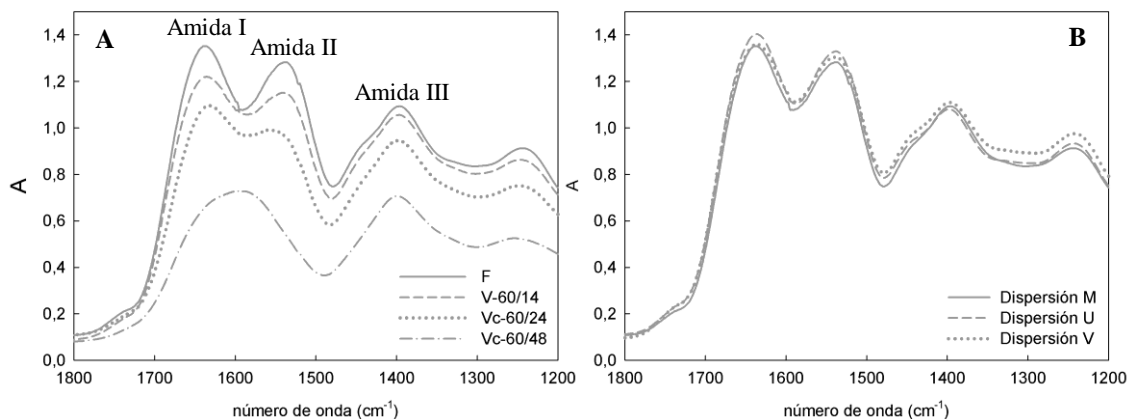


Figura 3.21. Espectros FTIR de obtenidos a partir de dispersiones 10%Prot de muestras obtenidas con diferente grado de glicosilación a partir de diferentes tratamientos térmicos (A) y controles de dispersiones sin tratamiento térmico (B).

Las muestras V-60/14, Vc-60/24 y Vc-60/48 exhibieron no sólo una disminución significativa de la intensidad de las bandas de amida I y II, sino también un solapamiento de ambas bandas, detectado en mayor medida en la muestra Vc-60/48.

Por otro lado, es importante destacar que la granulometría inicial de la muestra en las dispersiones acuosas no tuvo efecto sobre la intensidad de las bandas de amida I y II dado que las muestras control (F) sometida a los tres métodos diferentes de homogeneización propuestos en el presente trabajo (dispersiones M, U y V) exhibieron espectros FTIR solapados (Figura 3.22B). Por lo tanto, este importante resultado refleja que la técnica FTIR permite detectar sensiblemente los cambios producidos en la harina de soja sometida a distintos tratamientos térmicos, de la misma manera que lo informado por Sobral y col. (2012) en un trabajo previo [175].

Para lograr una mejor comparación y análisis, los resultados obtenidos de las AA y AU fueron relativizados al obtenido para la muestra de harina de partida F (100% actividad) y se muestran en la Figura 3.22.

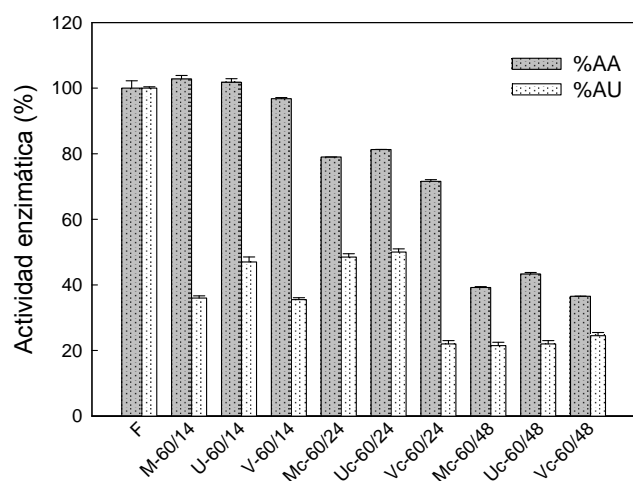


Figura 3.22. Valores obtenidos de AA y AU de las muestras de harina glicosilada a partir de dispersiones con diferente grado de subdivisión y distintos tratamientos térmicos. Los mismos están relativizadas a la AA y AU de la muestra control F (100% AA y AU).

En general, las muestras tratadas a HR 79% durante 24 h son las que presentaron una mayor inactivación (disminución de un 61-63% y 75-79% de AA y AU respectivamente), independientemente del estado de subdivisión inicial de la dispersión de partida. Además, puede observarse que la inactivación en las condiciones ensayadas es sólo parcial, siendo la AU más afectada que la AA. Esto puede atribuirse al BBTI, el cual es particularmente muy termoestable debido al elevado número de residuos de cistina en su composición aminoacídica (Tp por encima de los 110°C). Por

otro lado, Sobral y col. (2011) mostraron que la T_p de KTI es superior a 150 °C cuando el contenido de agua es menor a 10% P/P [177]. La presencia de BBTI y KTI residual nativo en la muestra obtenida en las condiciones más extremas (Vc-60/48) explica el valor de AA residual, el cual a pesar de presentar un termograma con ausencia de la endoterma a 70-72°C característica del KTI, exhibe una AA cercana al 36%.

Los estudios de DSC realizados por Sorgentini y Wagner (1999) revelaron que en agua destilada, el KTI purificado exhibe una T_p de 75 °C, en tanto que la ureasa purificada posee una fracción termolábil ($T_p > 72$ °C) y otra más estable ($T_p > 85$ °C), la cual sería responsable de la actividad ureásica residual observada [13]. Si bien, de acuerdo Caskey y col. (1944) la actividad ureásica tolerable en términos comerciales se encuentra en el rango 0,2-0,5 unidades de pH, el CAA permite un máximo de 0,3 [163, 178]. Todas las muestras ensayadas en este apartado no se lograron ajustar a estos últimos requisitos, por lo que debería aplicarse un tratamiento térmico adicional por vía húmeda para permitir la inactivación del factor antitriptico de Kunitz.

3.2.1.2.2. Influencia de los tratamientos térmicos controlados de harina de soja activa y sus dispersiones acuosas homogenizadas a alta velocidad

Con el objetivo de obtener un rango de harinas con diferente grado de glicosilación, evitando el sobreprocesamiento térmico pero a su vez promoviendo la inactivación de antinutrientes, se realizaron tratamientos a 60°C de la harina activa y a sus dispersiones en agua destilada al 10% P/P homogenizadas con el dispositivo de alta velocidad, en condiciones de HR controlada (79%) y no controlada, a tiempos de almacenamiento de 12, 24 y 48 h.

La Figura 3.23 muestra los valores de S_w y S_{KOH} de las harinas tratadas térmicamente en seco (A) y en dispersión acuosa (B). Las muestras tratadas a HR no controladas (U-60/12/24/48 y F-60/12/24/48) exhibieron valores de S_{KOH} cercanos a 100% independientemente del período de incubación. A HR 79%, en cambio, se observó una gradual pero significativa disminución de S_{KOH} en función del tiempo de almacenamiento ($p < 0,05$). Según Whittle y Araba (1992), los ensayos de S_{KOH} exhiben variabilidad en función de la granulometría de la muestra [179]. En el tratamiento en seco las partículas no están totalmente hidratadas, en tanto que en dispersión, el alto contenido de agua asegura una total hidratación sumada a la reducción del tamaño medio de las partículas por la homogeneización a alta velocidad. No obstante, no se observaron importantes diferencias de S_{KOH} en función de las características iniciales de

la muestra sino en función del tratamiento térmico. Como era esperable, la S_W fue para todas las muestras tratadas menor respecto a la S_{KOH} , lo cual se atribuye a que sólo hay una solubilización parcial de las proteínas de la harina a pH cercano a la neutralidad (pH 6,4-6,7). No obstante, a excepción de las muestras tratadas en seco a HR no controlada, en todos los demás casos se observó una significativa disminución de S_W en función del período de incubación ($p < 0,05$), por lo que estos tratamientos térmicos inducirían la formación de agregados insolubles por interacciones covalentes y/o no covalentes.

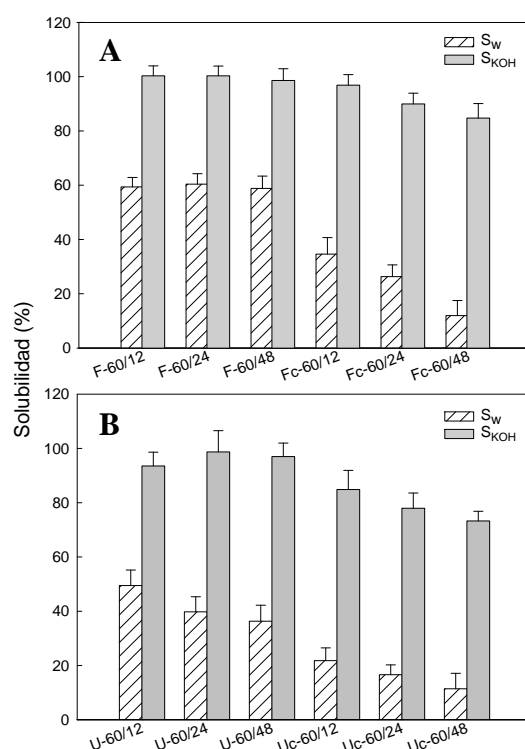


Figura 3.23. Solubilidad proteica en agua (S_W) y en KOH 0,2% P/P (S_{KOH}) de harina desgrasadas de soja (F) tratadas térmicamente a 60 °C en seco sin control de HR y a HR 79% por 12, 24 y 48 h (A) y en dispersión acuosa sin control de HR y a HR 79% por 12, 24 y 48 h (B).

Un análisis comparativo en función del tipo de tratamiento térmico revela que la S_W fue siempre menor a HR controlada (79%). Este valor se encuentra dentro del rango óptimo para que ocurra la reacción de Maillard [1]. Dado que la S_{KOH} también fue menor en esta condición, un proceso de desnaturalización parcial y agregación, que también involucra reacciones de intercambio -SH/-S-S-, sería plausible para explicar los cambios adicionales que tienen lugar a HR 79%. Como se indicara en el apartado anterior, la endoterma de desnaturalización de KTI desaparecía casi completamente en muestras que sufrieron extensiva glicosilación, aun cuando la temperatura de tratamiento fue moderada (60 °C).

Por otra parte, en la Figura 3.24 se muestran los resultados obtenidos de %LG.

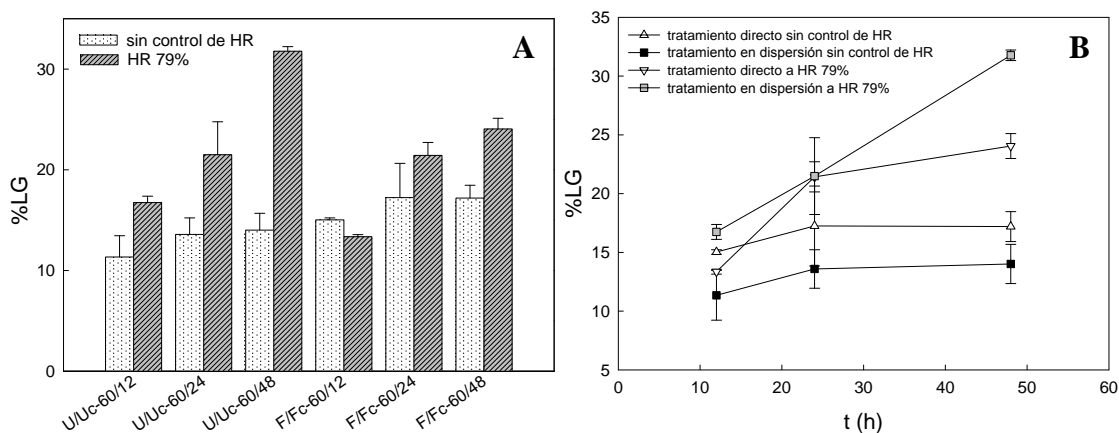


Figura 3.24. Valores obtenidos de %LG de las diferentes muestras de harina de soja obtenidas por diferentes tratamientos de la harina activa de partida (A) y en función del t de almacenamiento (B).

En todas las condiciones se observó una tendencia hacia el incremento de LG en función del período de incubación. Sin embargo, las mayores diferencias de %LG en función del tipo de tratamiento térmico se observaron en los ensayos en dispersión acuosa. Según Van Boekel (2001), el alto contenido inicial de agua disminuye la velocidad de formación de productos de reordenamiento de Amadori y de reacciones de condensación que generan agua como producto en etapas posteriores de la reacción de Maillard [47]. En las dispersiones acuosas, durante la incubación en condiciones no controladas de HR, la HR es inicialmente muy alta y la reacción de Maillard estaría desfavorecida, lo cual explica el valor relativamente bajo de %LG desde las 12 h de incubación. Durante el tratamiento a HR controlada, la HR local inicial disminuye hasta alcanzar un valor cercano al 79% y en el transcurso del tiempo la glicosilación se ve favorecida. Luego de 48 horas de almacenamiento, la muestra Uc-60/48 exhibió el valor más elevado de %LG (>31%) y fue la única que presentó un sobreprocesamiento térmico dado que la S_{KOH} fue menor a 80% P/P (sección 3.2.1.2.1). Además, el contenido de Lys reactiva fue menor a 5g/16 g N, el valor mínimo estipulado por el CAA.

Por otro lado, se observaron tendencias diferentes en los tratamientos térmicos de las muestras en seco. A HR no controlada, las muestras exhibieron a valores de %LG más altos respecto a los de las muestras en dispersión, probablemente debido al bajo porcentaje de humedad inicial de la harina de partida (< 10% P/P). A HR 79%, los valores de %LG fueron más bajos que los correspondientes en dispersión, lo cual fue

más evidente luego de 48 h de tratamiento. Este resultado podría explicarse en función de la granulometría inicial de la muestra. En este contexto, como se ha mostrado en la sección anterior, las dispersiones acuosas de la harina activa desgrasada sometidas a homogeneización fueron más susceptibles a la glicosilación. Luego de 48 h de incubación, este factor contrarresta el efecto inhibitor del alto contenido acuoso inicial de las dispersiones, el cual se manifiesta fundamentalmente en tiempos iniciales de tratamiento.

Por otra parte, la Figura 3.25A muestra que, a HR no controlada, los valores de AA de las dispersiones sometidas a tratamiento térmico fueron similares ($p > 0,05$) y, si bien se observó una disminución significativa, sólo fue leve respecto a la AA de la harina control. Además, la AU fue similar a la del control sólo cuando el tratamiento térmico se hizo directamente sobre la harina en seco (Figura 3.25B), disminuyendo significativamente hasta un 40% en las dispersiones acuosas para todos los t de tratamiento térmico ($p < 0,05$). Esta diferencia en la AU no tendría que ver directamente con el grado de glicosilación, sino más bien con el grado de agregación proteica reflejado en los valores de S_w puesto a que las muestras tratadas en seco presentaron valores de S_w mayores que las muestras obtenidas de las dispersiones (Figura 3.23).

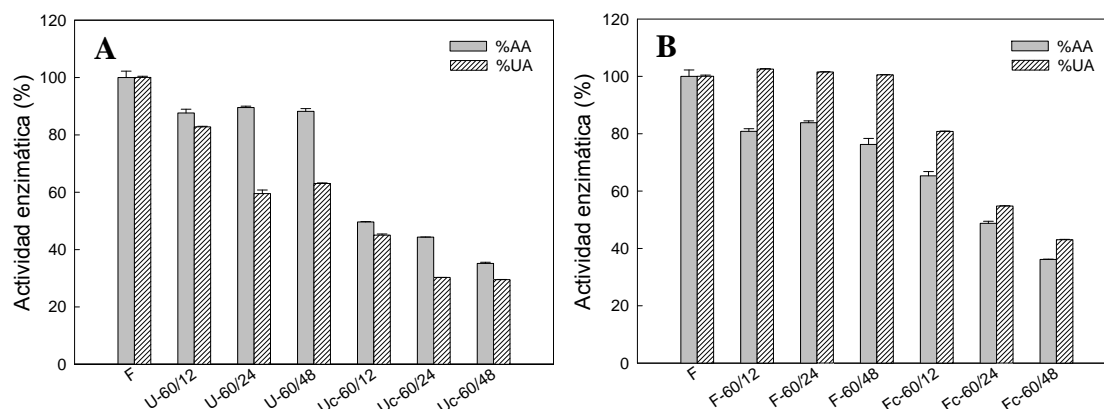


Figura 3.25. Valores obtenidos de AU y AA relativizados a los de la harina activa de partida (100%) a partir de las muestras de harina de soja glicosiladas obtenidas por tratamientos térmicos a 60°C a partir de dispersiones homogeneizadas con Ultraturax (A) o por tratamiento directo (B).

Para todos los casos en que las muestras fueron tratadas en condiciones de HR 79% se observó una disminución significativa de AA y AU, cada vez mayor a medida que aumentó el t de almacenamiento. Este comportamiento puede atribuirse a dos procesos que promueven la inactivación enzimática por medio de cambios estructurales y, por ende, la pérdida de la configuración del sitio activo: formación de

agregados proteína-proteína (evidenciado por la aparición de agregados insolubles revelados por una disminución de S_w en la Figura 3.23) y glicosilación proteica (reflejado en los valores de %LG en la Figura 3.24).

La Tabla 3.9 muestra los valores de entalpía de desnaturalización parcial obtenidos para las muestras de la harina activa tratada térmicamente, relativizados a los valores ΔH_d de la muestra de harina de soja de partida F (100%) para un mejor análisis.

Tabla 3.9. Entalpías de desnaturalización parcial (% ΔH_d) de la muestra F y las muestras obtenidas a partir de tratamientos directos. El desvío estándar no supera el 5%.

Muestra	% ΔH_d		
	Área I	Área II	Área III
F	100	100	100
Fc-60/12	100	72,0	79,1
Fc-60/24	53,0	72,1	83,5
Fc-60/48	44,3	76,2	92,0
F-60/12	87,7	64,2	82,1
F-60/24	85,8	52,9	72,2
F-60/48	81,3	70,4	88,0

Al igual que lo que ocurre para las muestras tratadas inicialmente en dispersión (sección 3.2.1.2.1), los parámetros obtenidos por DSC indicaron que a mayor grado de glicosilación existe una disminución de la entalpía total, no sólo por la desnaturalización del KTI y la Ureasa, sino también de las fracciones 7S, lectina y 11S. Además, se observó la disminución de los valores de entalpía para el Área I, responsable de la inactivación parcial del KTI y la ureasa. Para las muestras tratadas a HR controlada, los valores de % ΔH_d disminuyeron hasta un valor residual menor al 50% luego de 48 h de tratamiento térmico. Por el contrario, para las harinas calentadas sin control de HR, el % ΔH_d del Área I disminuyó aproximadamente un 14% a las 12 h, observándose una leve disminución adicional (~6%) al final del periodo de calentamiento. Además se verificó que el tratamiento térmico directo de la harina sin control de HR produce una deshidratación casi total a partir de las 12 h de incubación. En estas condiciones, todos los procesos que dependen de la movilidad molecular, como la desnaturalización y la agregación, están desfavorecidos, lo que explicaría no sólo la leve disminución del % ΔH_d del Área I que se produce a las 24 y 48 h de calentamiento, sino también la ausencia de una tendencia definida para el % ΔH_d de las Áreas II y III.

El tratamiento a HR 79%, además de inducir la desnaturalización-agregación proteica (estudios de solubilidad y DSC) y un grado más avanzado de glicosilación, promueve una significativa disminución de AA y AU en función del tiempo de tratamiento. Las modificaciones químicas inducidas en estas condiciones son lo suficientemente extensivas para producir la inactivación parcial del KTI y la ureasa. Además, como puede observarse en la Tabla 3.9, los valores del $\% \Delta H_d$ de las Área II y III se incrementaron con el tiempo de tratamiento, con un leve aumento asociado de las Tp (datos no mostrados). Este resultado se atribuiría al hecho de que, a diferencia de lo que sucede con la harina en dispersión, las globulinas 7S y 11S residen en los cuerpos de inclusión durante el calentamiento. Las proteínas de reserva modificadas químicamente en esta condición incrementarían levemente su estabilidad térmica a medida que aumenta el tiempo de calentamiento. Este aumento de la estabilidad térmica ya fue reportado por Liu y col. (2014) para las proteínas del suero lácteo glicosiladas con glucosa [77].

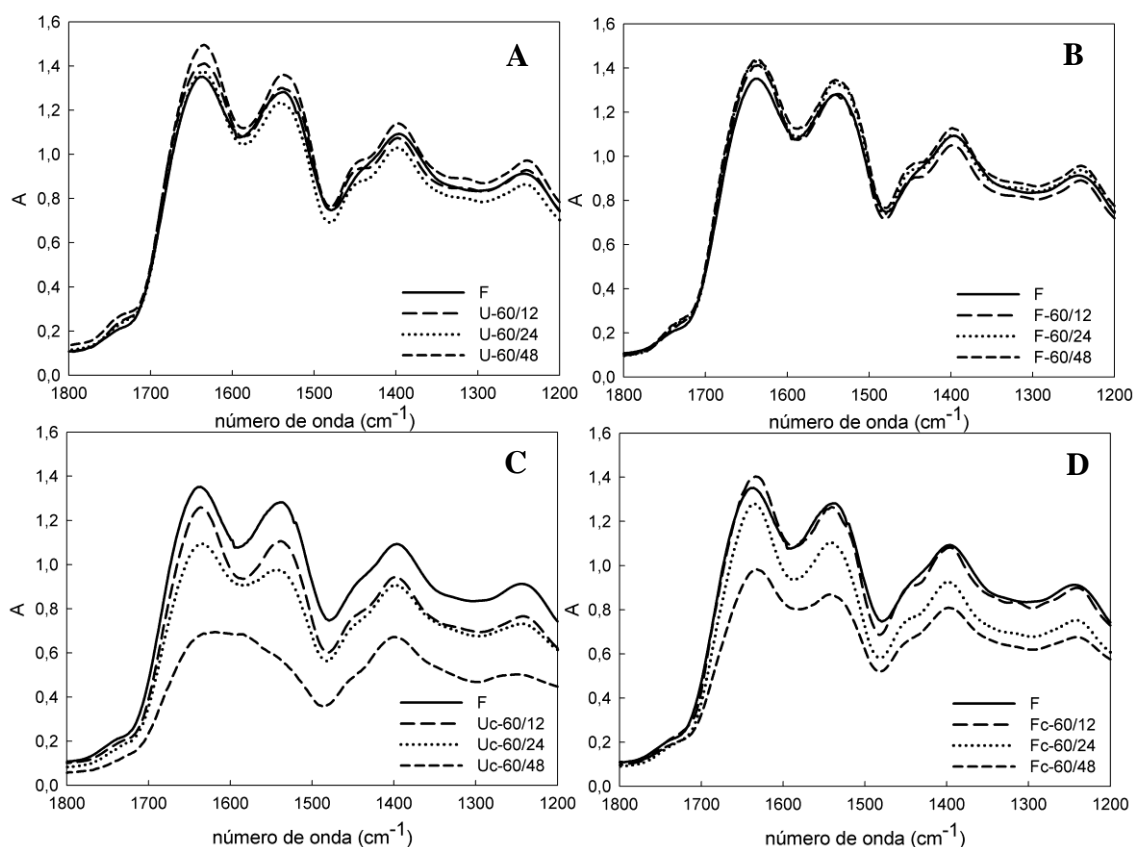


Figura 3.26. Espectros FTIR de muestras obtenidas a partir del tratamiento térmico sin control de HR de dispersiones acuosas de harina homogeneizadas inicialmente con un dispositivo de alta velocidad (A) o por tratamiento directo de la harina (B) y de muestras obtenidas a partir del tratamiento térmico con control de HR de dispersiones acuosas de harina homogeneizadas inicialmente con un dispositivo de alta velocidad (C) o por tratamiento directo de la harina (D).

Al igual que en la sección anterior (sección 3.2.1.2.1), los estudios de FTIR (Figura 3.26) demostraron que los cambios estructurales inducidos por los tratamientos térmicos se revelaron por una menor intensidad y solapamiento de las bandas de Amida I y II, especialmente observado para las muestras tratadas en condiciones de humedad relativa controlada (Figura 3.26C y D). Este solapamiento fue más evidente para la muestra sobreprocesada Uc-60/48 (Figura 3.26 C).

Si bien este comportamiento espectral demostró una buena correlación con la pérdida de Lys reactiva (%LG), también puede relacionarse a una pérdida de S_w , por lo que no puede ser atribuible únicamente al efecto de glicosilación proteica sino que también a procesos de agregación proteína-proteína, especialmente teniendo en cuenta la baja relación proteína:carbohidrato en los sistemas utilizados.

Con el objetivo de confirmar la presencia de agregados proteicos, se realizaron corridas electroforéticas en medio desnaturalizante (SDS-PAGE) de las dispersiones de muestras de harinas tratadas (muestras F-60/12/24/48 y Fc-60/12/24/48) y del control F, en condiciones no reductoras. En la Figura 3.27A se muestra el resultado obtenido para las muestras que presentaron la menor S_w .

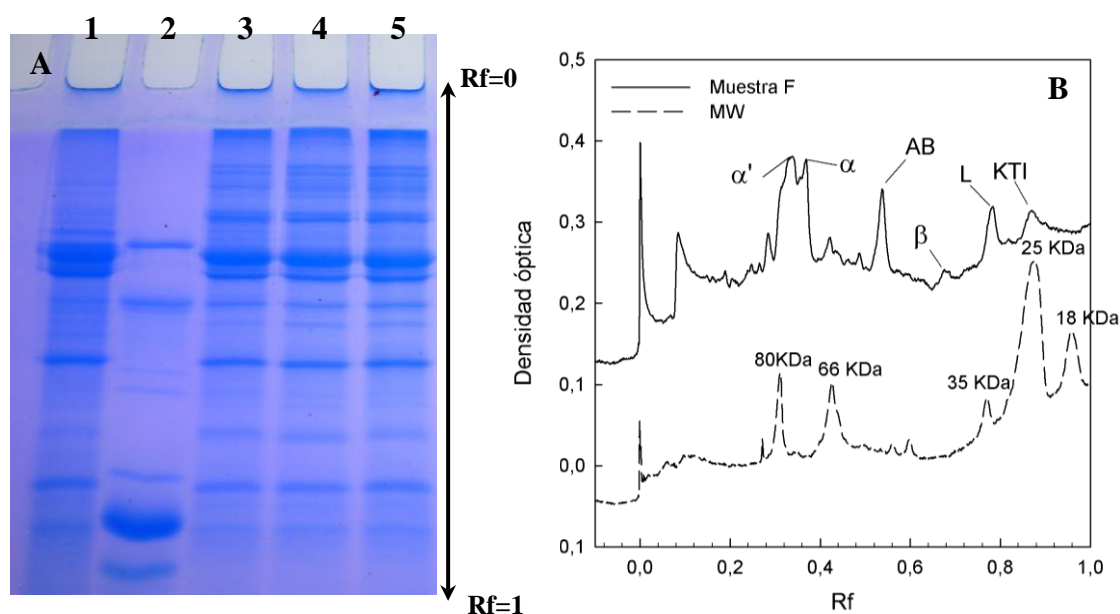


Figura 3.27. SDS-PAGE de la muestra F (calle 1), MW (calle 2), y harinas glicosiladas en condiciones de humedad controlada durante 12, 24 y 48 hj: muestra Fc-60/12 (calle 3), Fc-60/24 (calle 4) y Fc-60/48 (calle 5) (A). Densitogramas de las calles de la muestra F (control) y marcadores de PM (M) del SDS-PAGE en condiciones no reductoras (B).

Para todos los casos, las muestras presentaron siempre el mismo perfil electroforético, identificándose las fracciones proteicas típicas de la harina de soja. A

modo de ejemplo, en la Figura 3.27B, se muestra el densitograma de la muestra F y de los marcadores de PM (MW). Como criterio para la determinación de la movilidad electroforética (R_f) se determinó como cero (0) el comienzo del gel de concentración y se asignó el valor uno (1) al final del frente de corrida. A partir de los valores de PM y R_f de los marcadores de PM se logró estimar el valor de los PM de las bandas de las harinas de soja.

A elevados PM, entre los 80 y 66 KDa, se encuentran las bandas de las subunidades α y α' de la β -conglucina (fracción 7S). La subunidad AB de la globulina hexamérica, la glicina (fracción 11S), se encuentra posicionada a un $R_f \sim 0,5$ acorde a su PM de ~ 56 KDa. A continuación, se observa una banda tenue de 43 KDa que corresponde a la subunidad β de la β -conglucina. Como era esperable, también se encuentran las bandas correspondientes a las proteínas del suero de soja (fracción 2S). La banda de 30 KDa corresponde a los monómeros de la lectina (proteína homotetramérica de 120 KDa) y alrededor de los 20 KDa se encuentra la banda correspondiente al KTI. Es de destacar que las demás proteínas de soja son minoritarias y no se logran detectar por SDS-PAGE. Inclusive, algunas son de muy bajo PM (como el BBTI, de tan solo 8 KDa), por lo que también se dificulta su visualización por esta técnica electroforética convencional.

En la parte superior de los geles de poliacrilamida, donde comienza tanto el gel de concentración como el de corrida (Figura 3.27 A, calles 1, 3, 4 y 5), puede observarse la presencia de agregados proteicos de elevado PM. Para un mejor análisis, es de especial importancia observar en detalle desde la parte superior de las calles de los SDS-PAGE, donde comienza el gel de concentración ($R_f = 0$). Es por ello que en la Figura 3.28 se presentan los densitogramas obtenidos para todas las muestras que sufrieron un tratamiento térmico directo.

En todos los densitogramas, pueden evidenciarse dos picos de una importante densidad óptica a $R_f = 0$ y 0,08 que indican el comienzo exacto de los geles de concentración y corrida, respectivamente. A $R_f > 0,08$ se puede observar la presencia de agregados proteicos en mayor cantidad para las muestras de harinas glicosiladas en condiciones de humedad controlada (Figura 3.28B) respecto de las tratadas en condiciones de humedad no controlada (Figura 3.28A). En principio, estas bandas podrían indicar la presencia de agregados responsables de la pérdida de S_w .

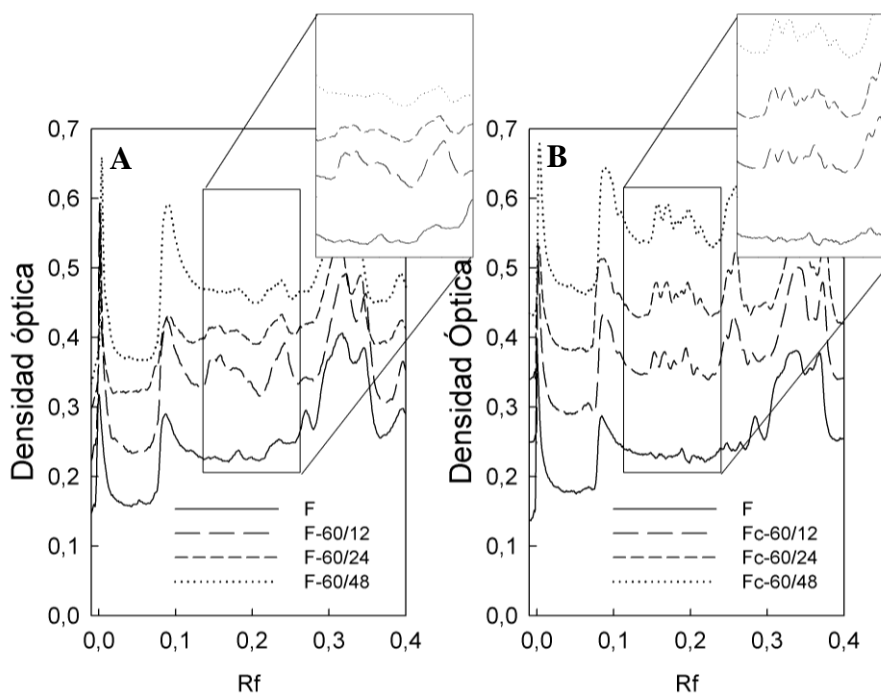


Figura 3.28. Densitogramas de la parte superior de las calles del SDS-PAGE en condiciones no reductoras de la muestra F (control) y harinas glicosiladas en condiciones de humedad no controlada durante 12, 24 y 48 h (muestras F-60/12, F-60/24 y F-60/48 respectivamente) (A) y harinas glicosiladas en condiciones de humedad controlada durante 12, 24 y 48 hs (muestras Fc-60/12, Fc-60/24 y Fc-60/48 respectivamente) (B).

Con el objetivo de profundizar el estudio del perfil electroforético de las proteínas componentes de las diferentes muestras, se realizaron SDS-PAGE en medio no reductor de los sobrenadantes de las dispersiones centrifugadas para analizar las proteínas solubles (sección 2.1.9). Los resultados pueden observarse en la Figura 3.29.

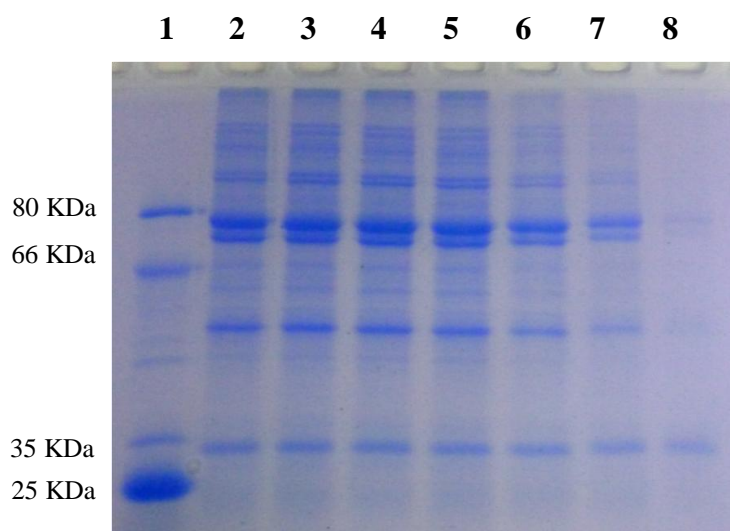


Figura 3.29. SDS-PAGE de sobrenadantes de dispersiones de la muestra control F (calle 2) y harinas glicosiladas en condiciones de humedad no controlada durante 12, 24 y 48 hs: muestra F-60/12 (calle 3), F-60/24 (calle 4) y F-60/48 (calle 5), y en condiciones de humedad controlada: muestra Fc-60/12 (calle 6), Fc-60/24 (calle 7) y Fc-60/48 (calle 8). Los marcadores de PM se encuentran en la calle 1.

Una de las principales diferencias que se pueden observar en comparación con los perfiles electroforéticos de las muestras sin centrifugar, es la pérdida total de la presencia de los agregados en el gel de concentración y la pérdida parcial de los agregados en el comienzo del gel de corrida. Debido a que esto puede observarse para todas las muestras de harina, incluyendo la control, no resultarían ser de relevancia a la hora de otorgar las propiedades diferenciadas. Por otro lado, puede evidenciarse una pérdida de solubilidad proteica por disminución de la intensidad de la mayoría de las bandas en el orden calle 5 < calle 6 < calle 7. Esta observación está bien correlacionada con la pérdida de S_w . Sin embargo, la banda correspondiente al KTI no acompaña esta disminución de intensidad, por lo que se infiere que no estaría participando en gran medida de la formación de agregados proteicos.

Por último, se realizaron ensayos adicionales para analizar la naturaleza de la interacción entre los agregados proteicos observados a través de la realización de las experiencias de SDS-PAGE en medio reductor (β -mercaptoetanol), los cuales se muestran en la Figura 3.30.

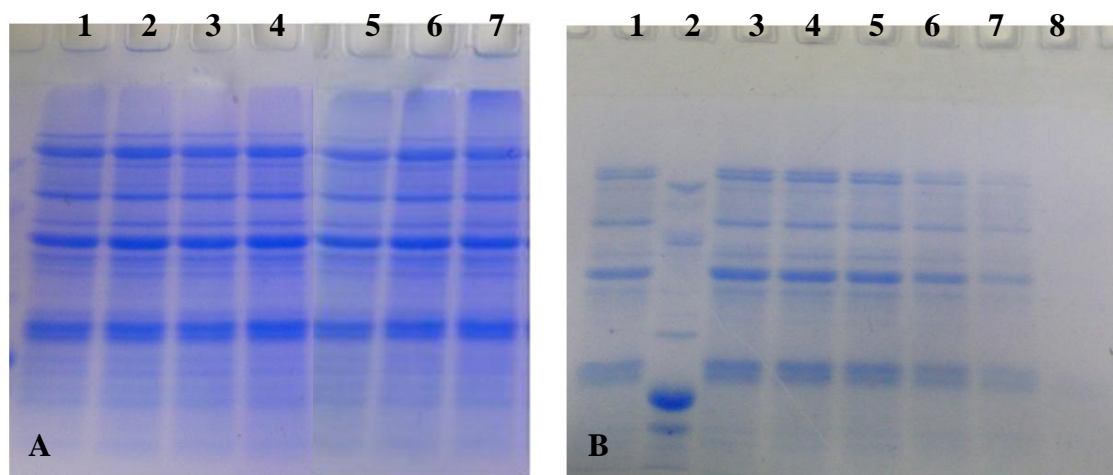


Figura 3.30. SDS-PAGE en medio reductor de dispersiones de la muestra control F (calle 1) y harinas glicosiladas en condiciones de humedad no controlada durante 12, 24 y 48 hs: muestra F-60/12 (calle 2), F-60/24 (calle 3) y F-60/48 (calle 4), y en condiciones de humedad controlada: muestra Fc-60/12 (calle 5), Fc-60/24 (calle 6) y Fc-60/48 (calle 7) (A); y de los sobrenadantes de dispersiones de la muestra control F (calle 1) y de harinas glicosiladas en condiciones de humedad no controlada durante 12, 24 y 48 hs: muestra F-60/12 (calle 3), F-60/24 (calle 4) y F-60/48 (calle 5), y en condiciones de humedad controlada: muestra Fc-60/12 (calle 6), Fc-60/24 (calle 7) y Fc-60/48 (calle 8). Los marcadores de PM se encuentran en la calle 2 (B).

Si bien en todas las muestras ensayadas, incluida la muestra control F, se evidenció la desaparición de la presencia de agregados proteicos covalentes en el comienzo del gel de concentración y corrida debido a la reducción de enlaces -S-S-, ésta

fue sólo parcial para las muestras Fc-60/24 y Fc-60/48 (Figura 3.30A). Esto confirmaría que los agregados proteicos están formados por enlaces del tipo covalente, algunos de naturaleza no disociable en medio reductor de acuerdo a las condiciones experimentales detalladas en la sección 2.1.9. Por otro lado, cuando se realizaron corridas electroforéticas en medio reductor de los sobrenadantes de las dispersiones, se observó el mismo comportamiento que en las muestras en condiciones no reductoras, donde existe una disminución gradual de las bandas en el orden Fc-60/12 < Fc-60/24 < Fc-60/48.

Los resultados obtenidos indican que fue factible obtener muestras de harinas con diferente grado de glicosilación y/o agregación de sus proteínas constituyentes. Es importante destacar que las reacciones a partir del estado sólido, a través del tratamiento térmico directo de la harina desgrasada activa de partida, son más adecuadas desde un punto de vista industrial. En este contexto, se seleccionaron las muestras F-60/12/24/48 y las muestras Fc-60/12/24/48 para ensayos de propiedades gelificantes y emulsionantes que se describen a continuación.

3.2.2. Análisis de las propiedades gelificantes de las harinas glicosiladas de soja

3.2.2.1. Evaluación de las propiedades reológicas durante la formación de geles ácidos y en el equilibrio

Para estudiar la capacidad de gelación ácida de las harinas glicosiladas se seleccionaron 6 de las 24 muestras preparadas previamente: harinas desgrasadas desolventizadas de soja almacenadas durante 12, 24 y 48 h a 60°C con control de HR (79%) y sin control de HR (muestras F-60/12, F-60/24, F-60/48 y Fc-60/12, Fc-60/24, Fc-60/48 respectivamente). El criterio de selección utilizado tuvo como objetivo evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento en estufa a 60°C y HR, factores que afectan el grado de glicosilación y/o agregación proteica, sobre la capacidad de formación de geles por adición de GDL. La harina sin tratamiento térmico fue utilizada como muestra control (muestra F).

Las dispersiones acuosas de las muestras seleccionadas y de la muestra control, a excepción de la muestra Fc-60/48, demostraron ser capaces de gelificar como resultado final del proceso de acidificación en las condiciones detalladas en la sección 2.1.4.

En la Figura 3.31A, a modo de ejemplo, se muestra la variación del módulo elástico (G'), el módulo viscoso (G'') y el pH con el tiempo durante la formación del gel a 25 °C y R 0,5 para la muestra F (control). Por otro lado, se sabe que la dependencia de los parámetros reológicos con la frecuencia provee información sobre la estructura del gel [180]. Es por ello que, para profundizar el análisis reológico del gel final obtenido, se realizaron barridos de frecuencia en el equilibrio en el rango 0,1-10 Hz, como se muestra en la Figura 3.31B.

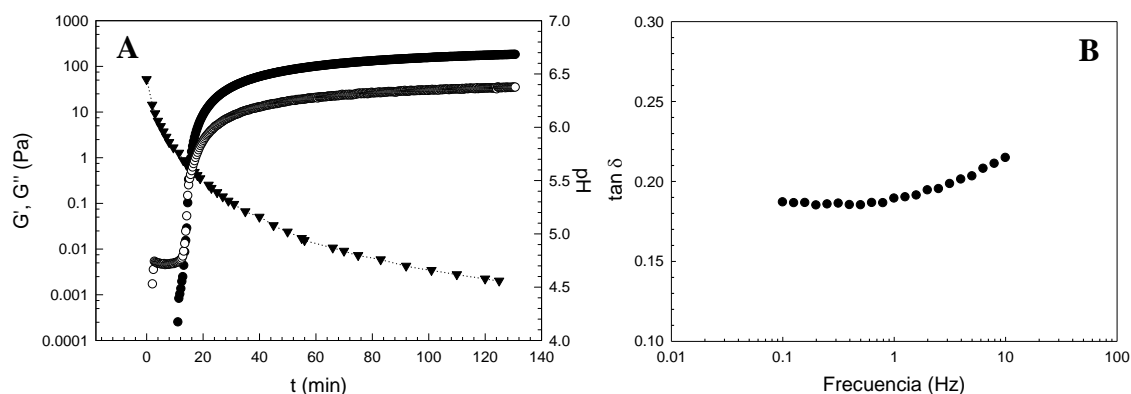


Figura 3.31. Variación de G' (●), G'' (○) y pH (▼) en función del tiempo una vez adicionada la GDL a una dispersión 3 %Prot de harina control F (A). Barrido de frecuencia de 0,1 a 10 Hz (B). R= 0,5 y T=25°C

Para todas las muestras ensayadas, la variación de $\tan \delta$ con la frecuencia presentó la misma tendencia. Como se muestra para el control F (Figura 3.1B), $\tan \delta$ aumenta al aumentar la frecuencia de oscilación por encima de 1 Hz. Esto indica que, a altas frecuencias, los geles presentan un menor G' , es decir, pierden carácter elástico.

A partir de los reogramas se obtuvieron los valores de t y pH de punto de gel (t_{gel} y pH_{gel} respectivamente) así como el valor $G'_{\text{máx}}$. Los resultados se informan en la Tabla 3.10.

Como puede observarse, no se detectaron cambios significativos en el pH_{gel} durante la gelación ácida de las dispersiones acuosas de las harinas glicosiladas y la control, presentándose un valor promedio de $5,63 \pm 0,09$. En principio, esto indicaría que cualquier posible cambio estructural inducido durante el tratamiento térmico en las diferentes muestras, no produjo cambios apreciables en la estabilidad electrostática de las proteínas presentes en la harina de soja.

Tabla 3.10. Resultados de t_{gel} , pH_{gel} y $G'_{m\acute{a}x}$ obtenidos para las harinas de soja glicosiladas y sin glicosilar al 3% P/p (proteína total) posterior a la adición de GDL, R 0,5; T 25°C

Muestra	t_{gel} (min)	pH_{gel}	$G'_{m\acute{a}x}$ (Pa)
F	$14,4 \pm 0,8^{*a}$	$5,66 \pm 0,02^a$	159 ± 6^a
F-60/12	$16,9 \pm 0,3^a$	$5,5 \pm 0,2^a$	176 ± 20^a
F-60/24	$16,0 \pm 0,03^a$	$5,67 \pm 0,04^a$	180 ± 10^a
F-60/48	$16,0 \pm 0,9^a$	$5,56 \pm 0,04^a$	200 ± 40^a
Fc-60/12	$15,5 \pm 0,1^a$	$5,7 \pm 0,1^a$	125 ± 10^b
Fc-60/24	19 ± 4^a	$5,70 \pm 0,05^a$	74 ± 5^c
Fc-60/48	ND [†]	ND	ND

(*) Valores expresados como promedio \pm desvío estándar.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). [†]ND = no detectado.

Por otro lado, como se muestra en la Figura 3.32, la velocidad de descenso de pH fue aproximadamente la misma para todas las muestras ensayadas, lo que explica que el t_{gel} no cambiara significativamente para las distintas muestras.

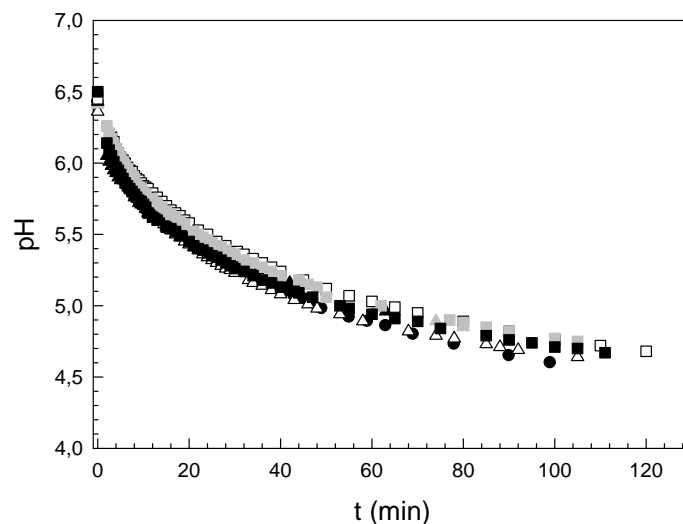


Figura 3.32. pH vs. t una vez adicionada GDL a dispersiones 3%Prot de harinas tratadas térmicamente: (Δ) Fc-60/12; (\blacktriangle) Fc-60/24; (\blacktriangle) Fc-60/48; (\square) F-60/12; (\blacksquare) F-60/24; (\blacksquare) F-60/48. (\bullet) F (control). R 0,5 y T 25°C

A pesar de no haberse modificado la estabilidad electrostática de las partículas proteicas de todas las muestras, como fue demostrado por los valores de pH_{gel} , las muestras Fc-60/12 y Fc-60/24 presentaron disminuciones significativas en sus valores de $G'_{m\acute{a}x}$ en el orden Fc-60/12 < Fc-60/24 (Tabla 3.10). Es importante destacar que estas muestras, obtenidas a partir de tratamientos térmicos de la harina desgrasada activa en condiciones de humedad controlada, fueron las que presentaron el mayor grado de

glicosilación, cada vez mayor al aumentar el t de tratamiento (Figura 3.24, sección 3.2.1.2.2). Este aumento en el grado de glicosilación puede evidenciarse además, como se muestra en la Figura 3.33, como un aumento en la coloración parda, característico de la presencia de melanoidinas, polímeros pardos de N que se producen en las últimas etapas de la reacción de Maillard.

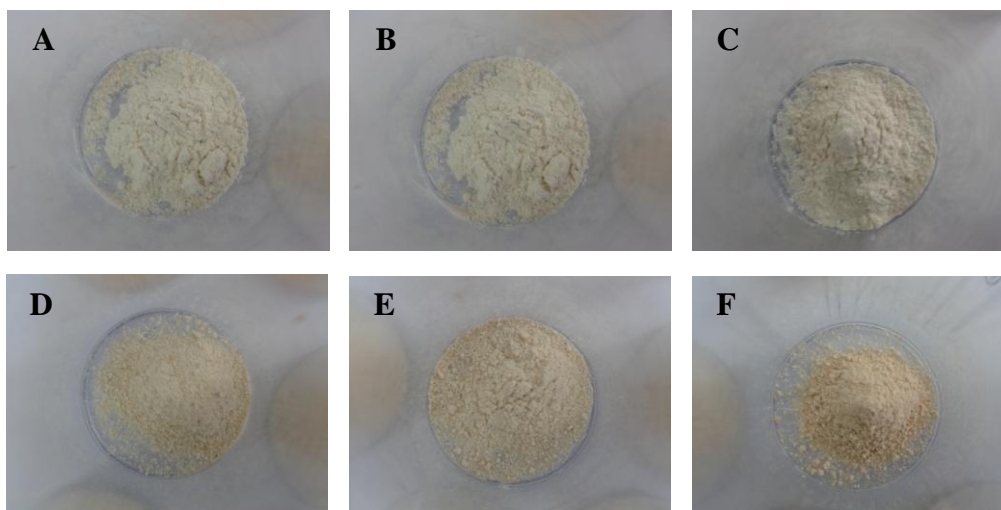


Figura 3.33. Fotografías de muestras de harina de soja activa tratadas a 60°C en condiciones de humedad no controlada: F-60/12 (A), F-60/24 (B), F-60/48 (C); y en 79% HR: Fc-60/12 (D), Fc-60/24 (E), Fc-60/48 (F).

Como se ha mencionado anteriormente, la gelación fría se basa en una primera etapa de desnaturalización de una dispersión proteica a pH isoiónico, donde se produce un desplegamiento polipeptídico de manera tal de promover la exposición de residuos hidrofóbicos al solvente y, por lo tanto, su disponibilidad para participar de interacciones hidrofóbicas. En el apartado 3.1.1.3 se explicó que el calentamiento de los SPI a pH isoiónico (6,8-7,5) resulta en la desnaturalización y formación de complejos solubles entre la glicinina y la β -conglucina, proteínas mayoritarias de la harina de soja y, como consecuencia, los puentes disulfuro entre los polipéptidos ácidos y básicos de la glicinina se rompen produciendo la formación de nuevos puentes disulfuro entre los polipéptidos básicos de la glicinina y las subunidades β de la β -conglucina [170].

Además, como se ha demostrado en los apartados 3.1.2.1 y 3.1.2.2.1, el calentamiento de dispersiones de aislados de estas globulinas (SPI) en presencia de aislados de proteínas del suero de soja (WSP) también induce la formación de agregados proteicos, por lo que es de esperarse que estas últimas también participen en

la interacción con las globulinas de reserva durante el proceso de gelificación ácida de harinas de soja.

Campbell y col. (2009) han reportado que, a bajos pH, la red de gel se forma a partir de agregados proteicos que involucran principalmente interacciones hidrofóbicas y formación de puentes disulfuro [118]. Durante el descenso de pH, la formación de enlaces disulfuro entre residuos de cisteína se encuentra disminuida, por lo que los procesos de agregación y gelificación posteriores se producen principalmente debido a interacciones del tipo hidrofóbicas. Como se muestra en la Tabla 3.10 y la Figura 3.24, la disminución del carácter elástico de los geles formados a partir de las muestras glicosiladas en condiciones de humedad controlada está estrechamente vinculada con la disponibilidad de residuos de Lys. La unión de polisacáridos a la estructura proteica produciría un aumento de la hidrofiliidad superficial y, por lo tanto, una disminución de las interacciones hidrofóbicas, lo que conduce a la formación de geles más débiles.

Por otra parte, la glicosilación produciría un aumento en la estabilidad estérica residual del sistema coloidal (por efecto osmótico y/o entrópico), inhibiendo la reestructuración y compactación de la malla de gel. Esto se encuentra respaldado por estudios de gelación térmica de glicoconjugados formados a partir de aislados proteicos de lactosuero con dextranos, donde se sugiere que el impedimento estérico debido a la conjugación podría debilitar la asociación proteica mediante interacciones principalmente del tipo hidrofóbicas. Estos autores también hallaron valores de G' significativamente menores respecto a la muestra control (sin glicosilar) [103, 181-182]. Para estos últimos sistemas, Spotti y col. (2013) han llegado a sugerir incluso que la presencia de las melanoidinas formadas durante las últimas etapas de la reacción de Maillard interferirían también de alguna manera con las interacciones proteína-proteína, produciéndose geles más débiles [98].

3.2.2.2. Evaluación de geles ácidos de harina de soja por CLSM

Como se describió en la sección 2.3.2.2, se tomaron imágenes de las dispersiones de harina de soja glicosiladas, luego del tratamiento térmico a 100°C y antes de la adición de GDL, teñidas con Rodamina B utilizando CLSM. En una primera instancia, al comparar la imagen de las dispersiones de la muestra F en modo de transmisión y con el filtro rojo (Figura 3.34 A y B respectivamente), puede evidenciarse la potencialidad de esta técnica para observar señales específicas que indican la presencia de proteínas, gracias a la coloración del marcador fluorescente.

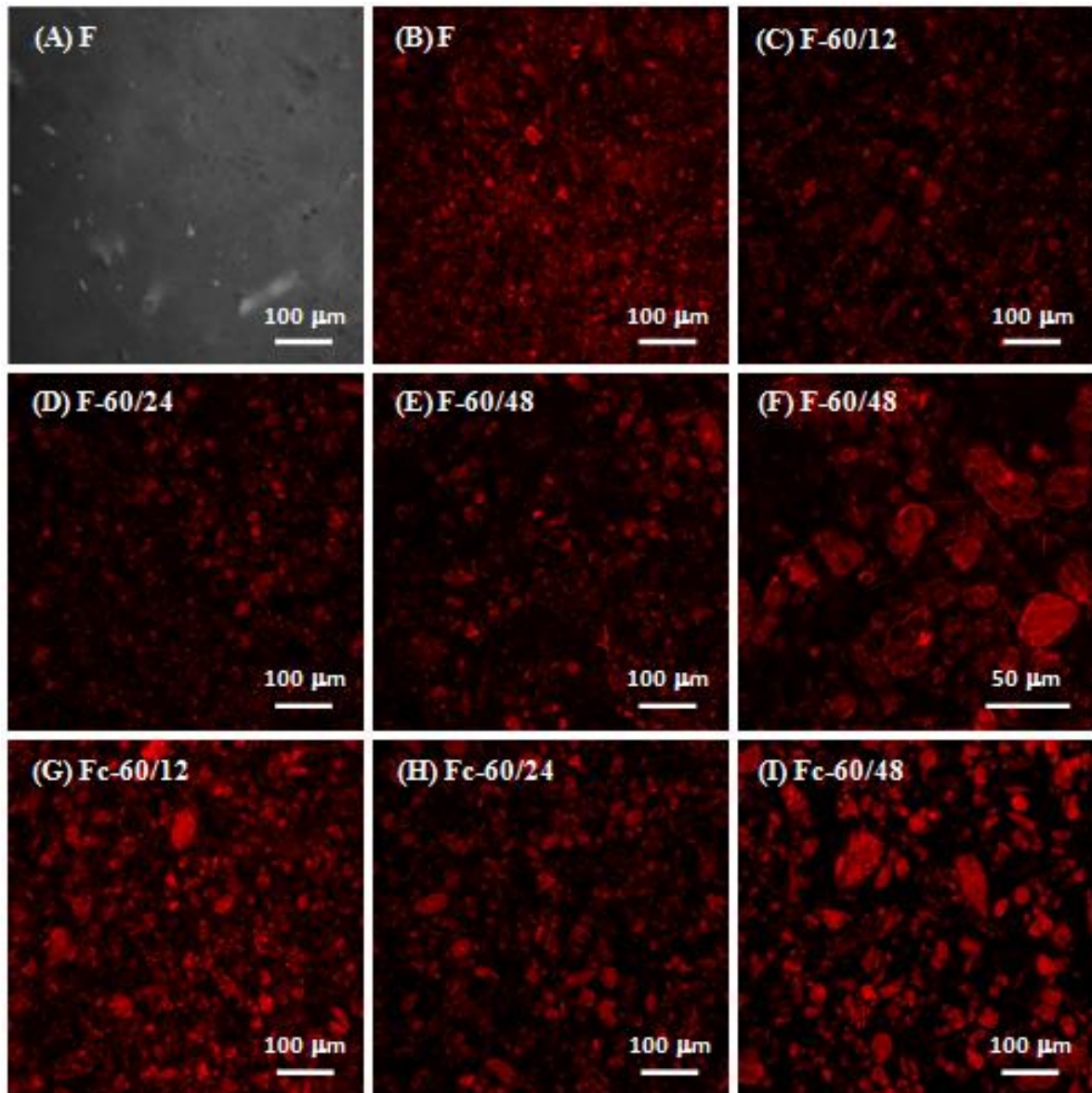


Figura 3.34. Imágenes obtenidas por CLSM de dispersiones acuosas de 3 %Prot de la muestra de harina activa de partida (F) y las obtenidas por tratamiento térmico directo luego de ser sometidas al tratamiento hidrotérmico (100°C, 5 min), previo a la adición de GDL.

En general, en todas las imágenes se observan estructuras proteicas de diferentes tamaños y/o grados de dispersión. Esto demuestra la elevada heterogeneidad de las partículas que componen la harina desgrasada de soja. Durante su preparación, posteriormente a la molienda, se utilizó un tamiz de 500 μm (sección 2.1.3), por lo que resulta esperable que no se observen partículas de mayor tamaño. Posiblemente las partículas más grandes con estructura de tipo “panal de abejas” sean pequeñas porciones del grano con restos celulares del cotiledón. Este tipo de estructura se observa claramente en la imagen obtenida con mayor resolución para la muestra F-60/48 (Figura 3.34 F). Si bien esta heterogeneidad de tamaños puede ser observada en todas las

dispersiones calentadas, puede notarse que en las muestras obtenidas en condiciones de humedad controlada los tamaños más grandes se vuelven más predominantes respecto a las muestras equivalentes obtenidas en condiciones de humedad no controlada. El caso más extremo es el de la muestra Fc-60/48 (Figura 3.34 I), donde prácticamente no pueden observarse componentes proteicos pequeños, e incluso aparecen agregados de gran tamaño que alcanzan los 100 μm .

Por lo tanto, existiría una correlación negativa entre la distribución de tamaños de las partículas proteicas de las dispersiones y el carácter elástico de los geles obtenidos (sección 3.2.3), acompañado también de una disminución de S_w y un aumento en el grado de glicosilación (sección 3.2.1.2). Los geles ácidos de las muestras F-60/12, F-60/24 y F-60/48 no presentaron cambios significativos de $G'_{\text{máx}}$ respecto a la muestra control F (Tabla 3.10), así como no pueden evidenciarse cambios notorios en los tamaños de las partículas de sus dispersiones calentadas (Figura 3.34 C, D y E, respectivamente).

En cambio, la disminución de $G'_{\text{máx}}$ (Tabla 3.10) en las muestras Fc-60/12 y Fc-60/24 (Figura 3.34 G y H respectivamente), hasta la pérdida total de la capacidad de formar un gel de la muestra Fc-60/48 (Figura 3.34 I), estaría asociada al aumento del tamaño de los agregados proteicos. Estos últimos no participarían en la formación de la red de gel, lográndose un entramado mucho más débil, con una concomitante disminución en el carácter elástico de los mismos. Este fenómeno estaría acompañado del aumento en la estabilidad estérica residual del sistema coloidal ocasionado por la glicosilación proteica, desfavoreciéndose las interacciones hidrofóbicas proteína-proteína e inhibiendo la reestructuración y compactación del entramado proteico.

Es de destacar que el análisis de las imágenes obtenidas por CLSM para estas dispersiones acuosas previo al tratamiento hidrotérmico (100°C, 5 min) no permitió evidenciar cambios del tamaño medio de las partículas. Por lo tanto, el incremento del tamaño observado en la Figura 3.34 pudo deberse exclusivamente a reacciones de agregación proteica debido al proceso de desnaturalización térmica ocurrido durante el tratamiento hidrotérmico y favorecido por la glicosilación.

Los geles ácidos de harinas glicosiladas y la muestra control, obtenidos por acidificación con GDL, también fueron analizados por CLSM. En primer lugar, se observó un gel de harina control F en las tres dimensiones, tomándose imágenes en el plano xy a distintos cortes del eje z. A partir de las mismas, se construyó un *stack*. La

Figura 3.35 muestra dos planos ubicados a alturas diferentes del pocillo donde se encontraba el gel de la muestra F.

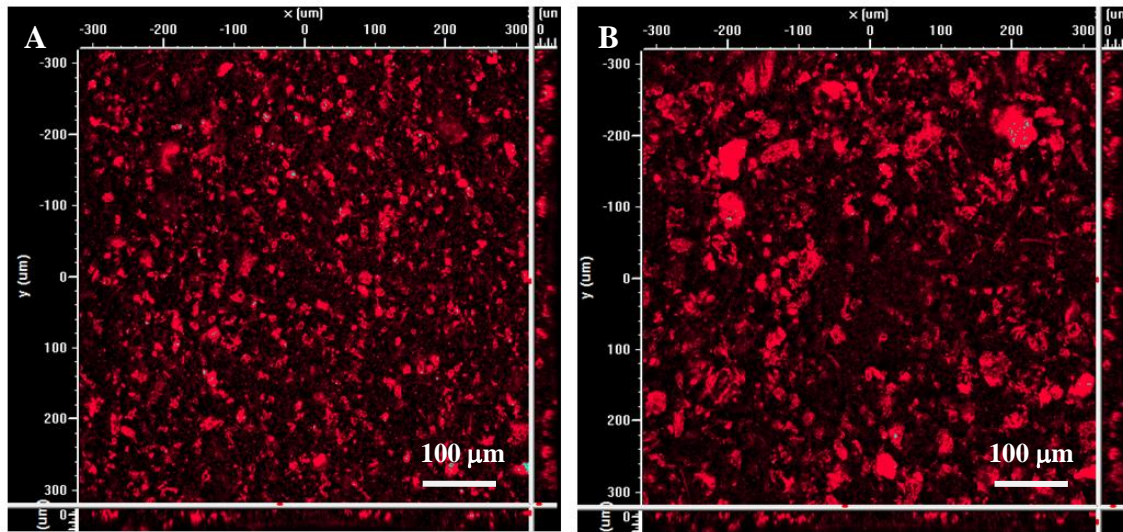


Figura 3.35. Stack de imágenes obtenidas por CLSM de un gel ácido de la muestra F (control) hacia la superficie superior (A) y hacia la superficie inferior (B) del pocillo. 3%Prot; R 0,5 y T 25°C.

La Figura 3.35A muestra una red de gel regularmente distribuida con la presencia de un gran número de agregados proteicos. Estos agregados son de mayor tamaño al situarse en la superficie inferior del gel (Figura 3.34 B). Aparentemente estos agregados de alto peso molecular sedimentan en el transcurso del proceso de gelación de manera tal que se distribuyen preferencialmente en el fondo del pocillo de las placas.

En conclusión, para una evaluación comparativa adecuada de los gels ácidos de las diferentes muestras, las imágenes del plano xy fueron tomadas siempre a una misma altura del pocillo (eje z). Estas imágenes se presentan en la Figura 3.36.

Se puede observar el gel formado a partir de la muestra control F (Figuras 3.35A y 3.36A), el cual mostró una malla de gel proteico con un entramado regular, al igual que los gels de las muestras F-60/12, F-60/24 y F-60/48 (Figura 3.36 B, C y D respectivamente). Sin embargo, los gels de las muestras Fc-60/12 y Fc-60/24 (Figura 3.36 E y F respectivamente) evidencian una red de gel cada vez más abierta y discontinua, casi imperceptible en las imágenes obtenidas por CLSM.

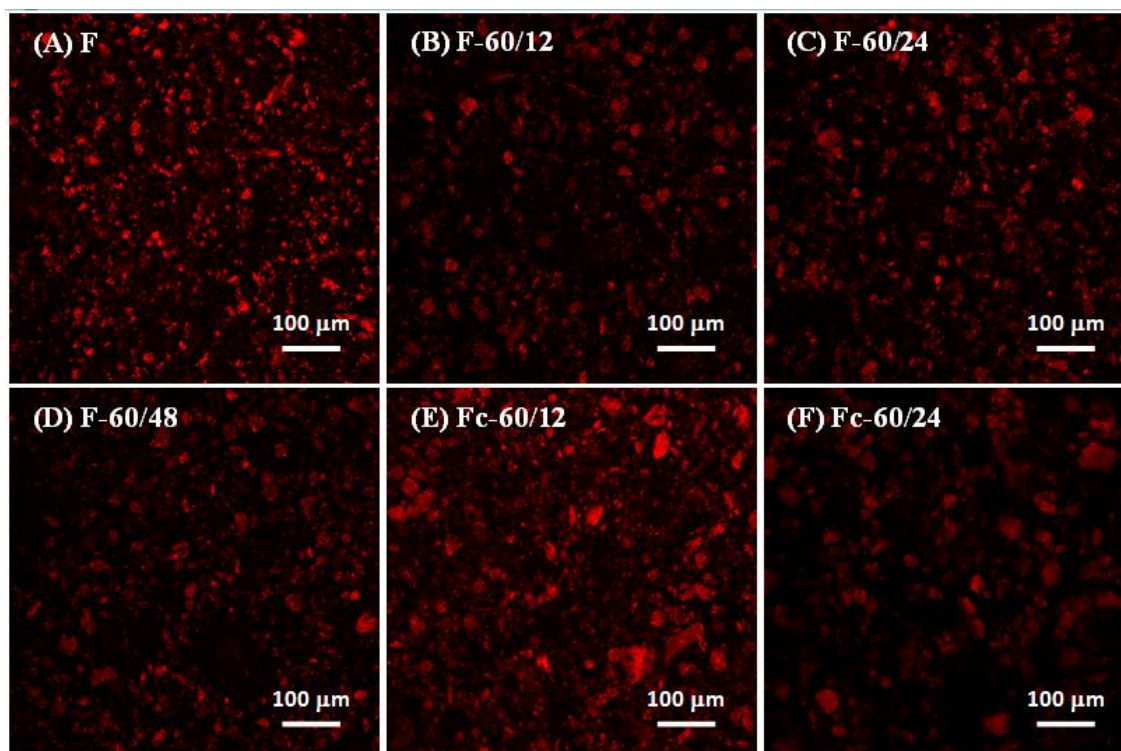


Figura 3.36. Imágenes obtenidas por CLSM a partir de geles ácidos de harina control F (A) y de harinas obtenidas por tratamiento térmico directo a 60°C en condiciones de HR no controlada: F-60/12 (B), F-60/24 (C), F-60/48 (D) y en 79% HR: Fc-60/12 (E), Fc-60/24 (F). 3 %Prot; R 0,5 y T 25°C.

3.2.3. Evaluación de las propiedades emulsionantes de harinas glicosiladas

Se analizó la formación y estabilidad de emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas de harinas de soja sin glicosilar (F) y glicosiladas en condiciones de humedad relativa no controlada y controlada (muestras F-60/24 y Fc-60/24) a pH 7,0 y 3,5. Como se informó anteriormente (sección 3.2.1.2.2), las muestras F-60/24 y Fc-60/24 exhiben importantes diferencias estructurales evidenciadas en los distintos valores asumidos por los parámetros evaluados, como por ejemplo, el grado de desnaturalización (DSC), AA, AU y la pérdida de Lys reactiva (%LG).

3.2.3.1. Solubilidad y tamaño de partícula de las dispersiones utilizadas para preparar las emulsiones O/W

Debido a la composición compleja de la harina de soja (sección 1.2) y a que los polisacáridos insolubles no se eliminaron al preparar las dispersiones acuosas, las mismas tienen una fracción soluble y otra insoluble, con una composición relativa diferente en función del pH. Por tal motivo, antes de abordar el estudio de la formación y estabilidad de las emulsiones, se analizó la influencia del método de

dispersión/homogeneización en la solubilidad proteica y la distribución de tamaño de partícula de la fracción insoluble de las dispersiones acuosas utilizadas para preparar las emulsiones. Los tratamientos de dispersión realizados a pH 7,0 y 3,5 fueron: I) homogeneización a alta velocidad y II) homogeneización a alta velocidad con un tratamiento adicional de alta presión (HPH).

Como puede observarse en la Figura 3.37, la solubilidad proteica a pH 7,0 fue significativamente mayor que a pH 3,5 en todas las muestras ensayadas, independientemente del tratamiento de dispersión realizado. Este resultado es consistente con la insolubilización de las proteínas de reserva de soja (glicinina y β -conglucina) en medio ácido, dado que éstas exhiben una mínima solubilidad en el punto isoelectrico (pH 4,5) y una baja solubilidad en el rango de pH 3,0-5,0.

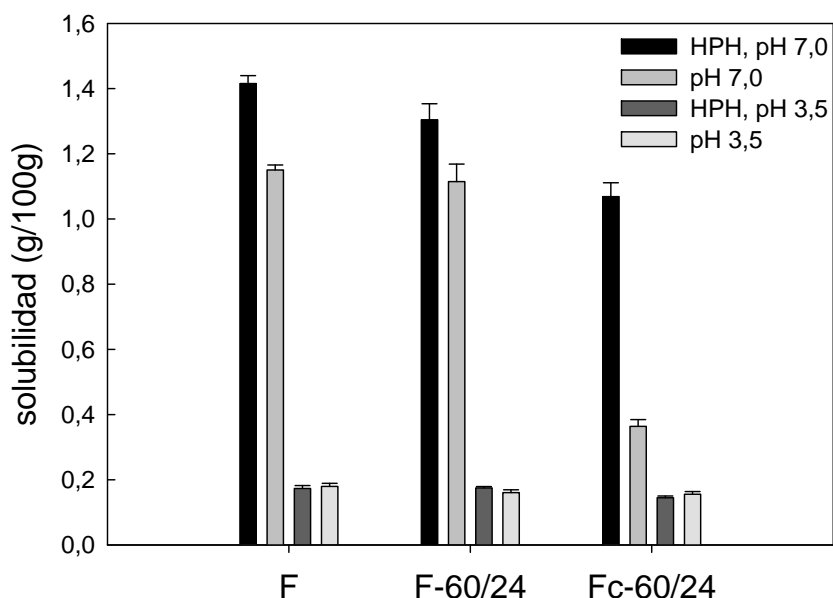


Figura 3.37. Solubilidad proteica de las dispersiones preparadas a partir de la muestra control sin glicosilar (Muestra F) y a partir de las muestras tratadas a 60°C por 24 h, sin control de humedad y con control de 79% humedad (muestras F-60/24 y Fc-60/24, respectivamente) a pH 7,0 y 3,5, sin y con tratamiento HPH.

No obstante, a pH 7,0, el tratamiento adicional HPH incrementó la solubilidad proteica de todas las muestras, siendo especialmente evidente en la harina glicosilada en condiciones de humedad relativa controlada (Fc-60/24). En cambio, a pH 3,5, el tratamiento HPH no tuvo un efecto significativo sobre la solubilidad proteica. Es altamente probable que en medio ácido, más allá de las modificaciones químicas sufridas por las proteínas durante los tratamientos térmicos, las proteínas de reserva

constituirían principalmente la fracción proteica de agregados insolubles y las proteínas del suero de soja contribuirían casi por completo a la solubilidad observada en condiciones ácidas.

La distribución de tamaño de partícula (DTP) de la muestra F a pH 7,0 y sin tratamiento HPH fue multimodal, con un ancho pico principal que estaría formado por dos poblaciones diferentes solapadas y una importante fracción del volumen total disperso en partículas mayores a 100 μm (Figura 3.38). No se observaron cambios apreciables en la DTP de las dispersiones correspondientes a las muestras F-60/24 y Fc-60/24.

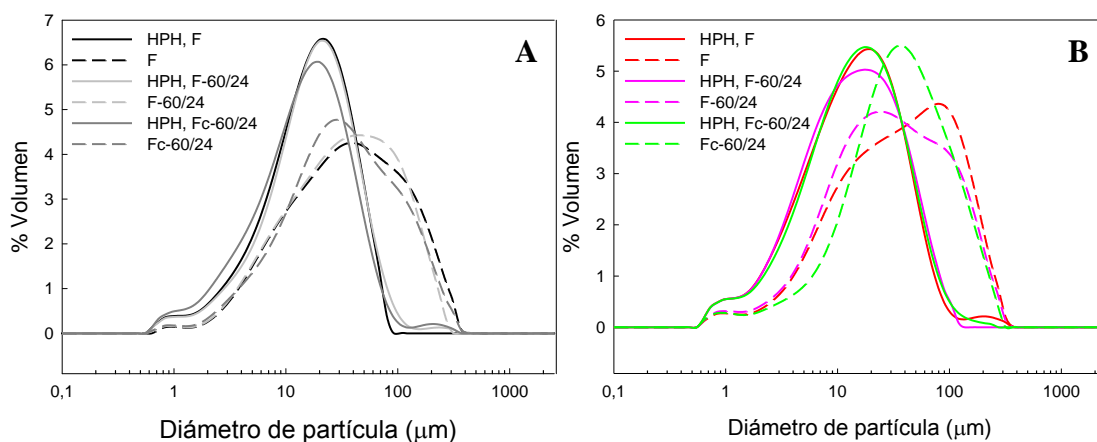


Figura 3.38. Distribución de tamaño de partícula de las dispersiones F, F-60/24 y Fc-60/24 a pH 7,0 (A) y 3,5 (B), con y sin tratamiento HPH.

Cuando estas dispersiones se trataron por HPH, las DTP exhibieron un carácter multimodal, con una moda principal en el rango 19-22 μm . La dispersión F exhibió la totalidad del volumen disperso en partículas menores a 100 μm , en tanto que para las muestras glicosiladas se observó una población minoritaria con diámetros superiores a 100 μm . Evidentemente, el tratamiento de homogeneización con un dispositivo de alta energía disociaría agregados existentes en las dispersiones.

A pH 3,5, se genera una nueva población de partículas insolubles que son evidenciadas en el análisis de las DTP obtenidas con el dispositivo de difracción láser. Como se mencionó anteriormente, este hecho se atribuye a la disminución de solubilidad debido a la desestabilización electrostática de las globulinas de reserva. En la dispersión de la muestra F tratada sólo por homogeneización de alta velocidad, la DTP exhibió un carácter multimodal similar a la de pH 7,0. No obstante, el solapamiento de las dos poblaciones principales de partículas (16 y 80 μm) fue más

evidente en este caso, revelándose además la presencia de una población minoritaria de partículas menores a $1 \mu\text{m}$. Para la muestra F-60/24 se observaron perfiles similares a ambos pH. Respecto a las dispersiones preparadas con Fc-60/24, a pH 7,0 la DTP fue claramente multimodal, en tanto que a pH 3,5 se observó una población mayoritaria con una moda cercana a $35 \mu\text{m}$. Al analizar comparativamente las tres dispersiones en medio ácido las DTP fueron diferentes, aunque no se observaron diferencias significativas en los diámetros promedio $D_{4,3}$ ($p > 0,05$).

Al igual que a pH 7,0, el tratamiento HPH redujo notablemente el tamaño de las partículas insolubles dispersas en medio ácido. Todas las DTP exhibieron un pico principal (moda $\sim 19 \mu\text{m}$) y dos poblaciones minoritarias de partículas menores a $1 \mu\text{m}$ y mayores a $100 \mu\text{m}$, respectivamente. Este comportamiento fue consistente con los diámetros promedio $D_{4,3}$, que fueron significativamente inferiores cuando las dispersiones acuosas se trataron por HPH, tanto a pH 3,5 como a pH 7,0 ($p < 0,05$, Figura 3.39).

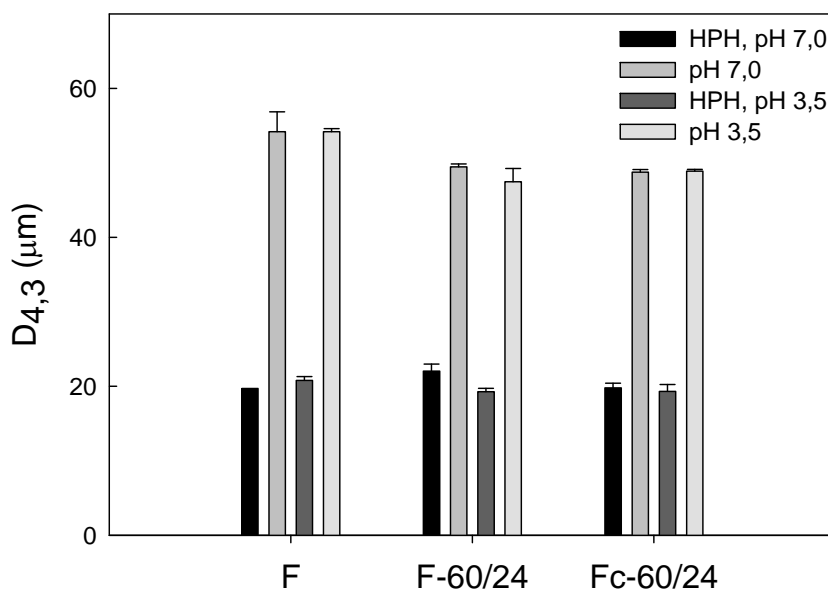


Figura 3.39. Diámetro promedio $D_{4,3}$ de las dispersiones a pH 7,0 y 3,5 preparadas con las muestras F, F-60/24 y Fc-60/24, con y sin tratamiento HPH.

3.2.3.2. Evaluación de la formación y estabilidad de emulsiones O/W

En la Figura 3.40A y B se muestran las DTP de las emulsiones iniciales preparadas a partir de dispersiones sin y con tratamiento HPH, respectivamente. Independientemente del tratamiento de homogeneización, la principal población de partículas de las emulsiones a pH 3,5 exhibió modas superiores respecto a las preparadas a pH 7,0. Esto se atribuiría a la menor concentración de proteína soluble de la dispersión en medio ácido y que los agregados solubles que podrían adsorberse en la interfase, no tienen la capacidad de estabilizar electrostáticamente a las gotas.

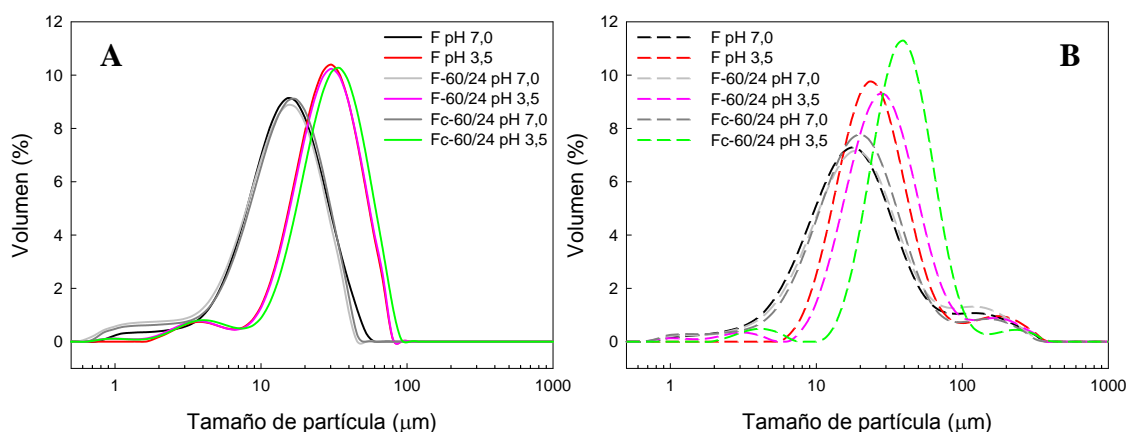


Figura 3.40. Distribución de tamaño de partícula de las emulsiones iniciales preparadas a partir de las dispersiones a pH 7,0 y 3,5 de las muestras F, F-60/24 y Fc-60/24 con (A) y sin (B) tratamiento HPH.

Además, puede observarse que el tratamiento HPH promovió la formación de emulsiones con DTP cuyas modas están desplazadas hacia menores tamaños de partículas a ambos pH. Esto se debería a que el tratamiento HPH de las dispersiones induce la disociación de los agregados preexistentes y, en el caso particular de pH 7,0, al incremento de la concentración de proteína soluble (Figura 3.37).

En la Figura 3.41 se muestran los diámetros promedio $D_{4,3}$ de las emulsiones iniciales a pH 7,0 y 3,5 preparadas con dispersiones (F, F-60/24 y Fc-60/24) sin y con tratamiento HPH. Los resultados refuerzan lo explicado en el párrafo anterior, además de revelar que las emulsiones obtenidas a pH 7,0 y con tratamiento HPH exhibieron los valores más bajos de $D_{4,3}$. Es importante destacar que a pH 3,5, no se observaron cambios en la solubilidad proteica de las dispersiones como consecuencia del tratamiento HPH (Figura 3.37). La disminución de $D_{4,3}$ se atribuiría a la presencia de agregados más pequeños que los presentes en las dispersiones sin tratamiento HPH, que

tendrían mayor capacidad de adsorberse en la interfase agua/aceite durante la preparación de las emulsiones. A modo de ejemplo, se muestran fotografías digitales de la emulsión F en las cuatro condiciones ensayadas, donde se puede observar la presencia de agregados en la fase continua y el mayor diámetro de las gotas en medio ácido. Además, a pH 3,5, las emulsiones Fc-60/24 presentaron los mayores valores de $D_{4,3}$, es decir, la menor capacidad de las proteínas glicosiladas para adsorberse en la interfase agua/aceite.

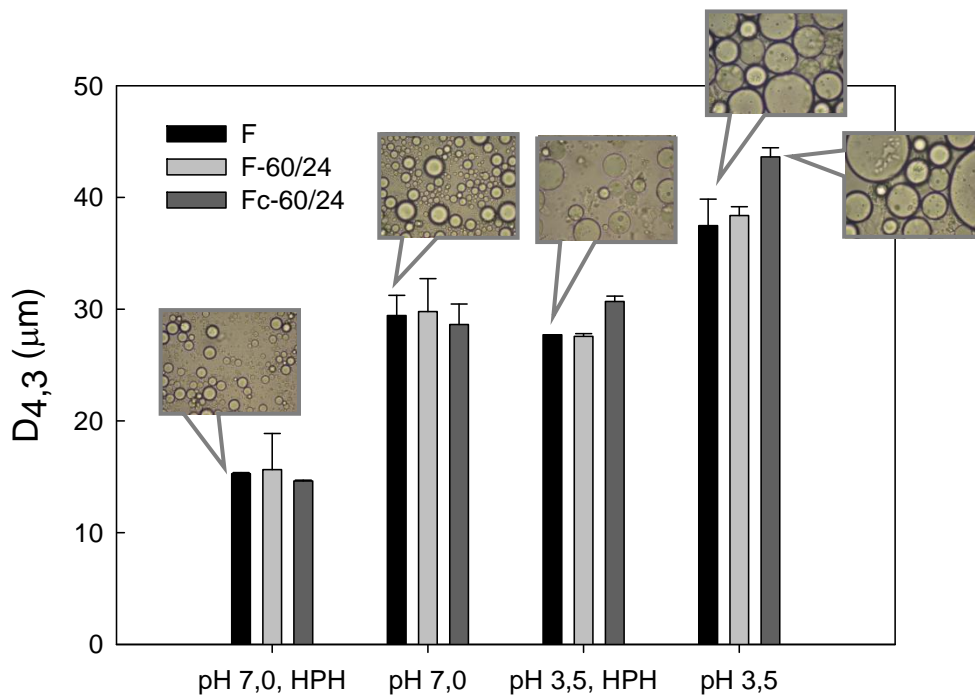


Figura 3.41. Diámetro promedio $D_{4,3}$ (μm) de las emulsiones iniciales preparadas a partir de dispersiones de las muestras F, F-60/24 y Fc-60/24 preparadas a pH 7,0 y 3,5, con y sin tratamiento HPH.

Por otra parte, la Figura 3.42 muestra las DTP de las emulsiones luego de 24 h de almacenamiento estacionario, obtenidas a partir de dispersiones con y sin tratamiento HPH (A y B, respectivamente). En principio, se observó la misma tendencia general respecto a la observada en las emulsiones iniciales (Figuras 3.40 y 3.41). En las emulsiones preparadas con dispersiones ácidas sin tratamiento HPH, la moda de la DTP se incrementó para la muestra Fc-60/24, lo cual sería consistente con una desestabilización por coalescencia. No obstante, cuando las dispersiones ácidas se trataron por HPH, las emulsiones resultantes evidenciaron DTP bimodales y similares entre sí, pero con una disminución más evidente en los valores de $D_{4,3}$ para las muestras glicosiladas. De hecho, las emulsiones F-60/24 y Fc-60/24 exhibieron valores de $D_{4,3}$

levemente inferiores respecto al de la preparada con la muestra control (Figura 3.43). A pH 7,0 los valores de $D_{4,3}$ de las emulsiones almacenadas no exhibieron diferencias significativas respecto a los de las iniciales. Este comportamiento se evidenció para las preparadas con dispersiones sin y con HPH, en concordancia con la similitud de las correspondientes DTP (Figuras 3.40 y 3.42).

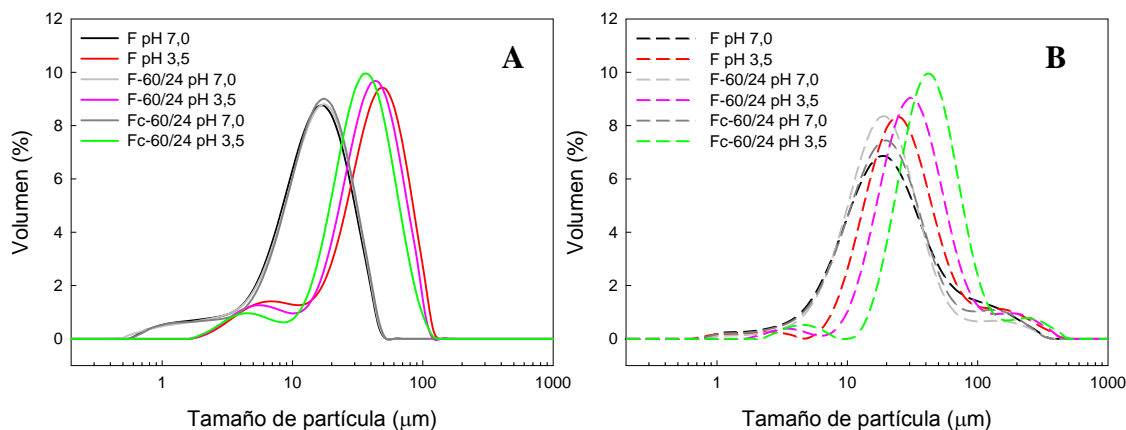


Figura 3.42. Distribución de tamaño de partícula de las emulsiones obtenidas a partir de dispersiones F, F-60/24 y Fc-60/24 a pH 7,0 y 3,5 con (A) y sin (B) tratamiento HPH luego de 24 h de almacenamiento estacionario.

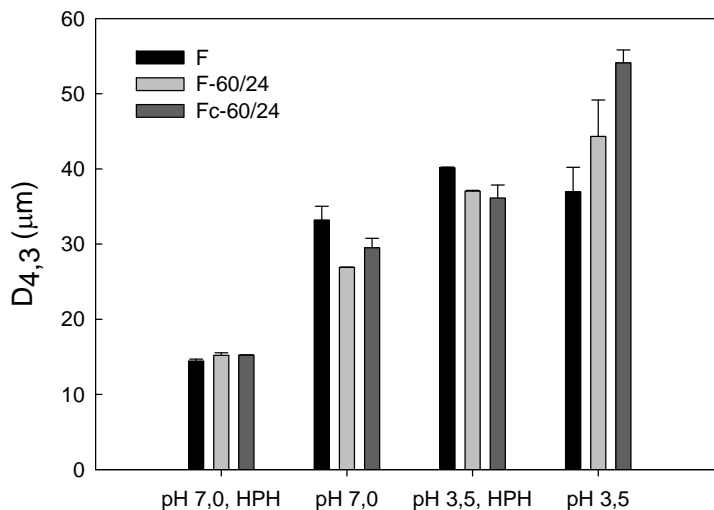


Figura 3.43. Diámetro promedio $D_{4,3}$ de las emulsiones preparadas a partir de dispersiones de F, F-60/24 y Fc-60/24 a pH 7,0 y 3,5, con y sin homogeneización previa HPH, luego de ser almacenadas 24 h de manera estacionaria.

Es importante destacar que, de acuerdo al método de homogeneización empleado para la preparación de las emulsiones y las modas de las poblaciones mayoritarias de partículas (en todos los casos $> 10 \mu\text{m}$), es esperable que durante el almacenamiento estacionario se produzca separación gravitacional.

La cinética de cremado de las emulsiones, obtenida por ensayos directos de observación visual y los correspondientes IC a las 24 h se muestran en la Figura 3.44. Para las emulsiones preparadas con las dispersiones sin tratamiento de HPH, el grado de desestabilización fue superior para la muestra Fc-60/24, siendo este hecho claramente evidente a pH 3,5. A 24 h, el IC mostró el orden $Fc-60/24 > F-60/24 > F$ (Figura 3.44 A y B). La desestabilización de la emulsión Fc-60/24 fue consistente con un mayor valor de $D_{4,3}$ fundamentalmente a las 24 h de almacenamiento estacionario (Figura 3.43).

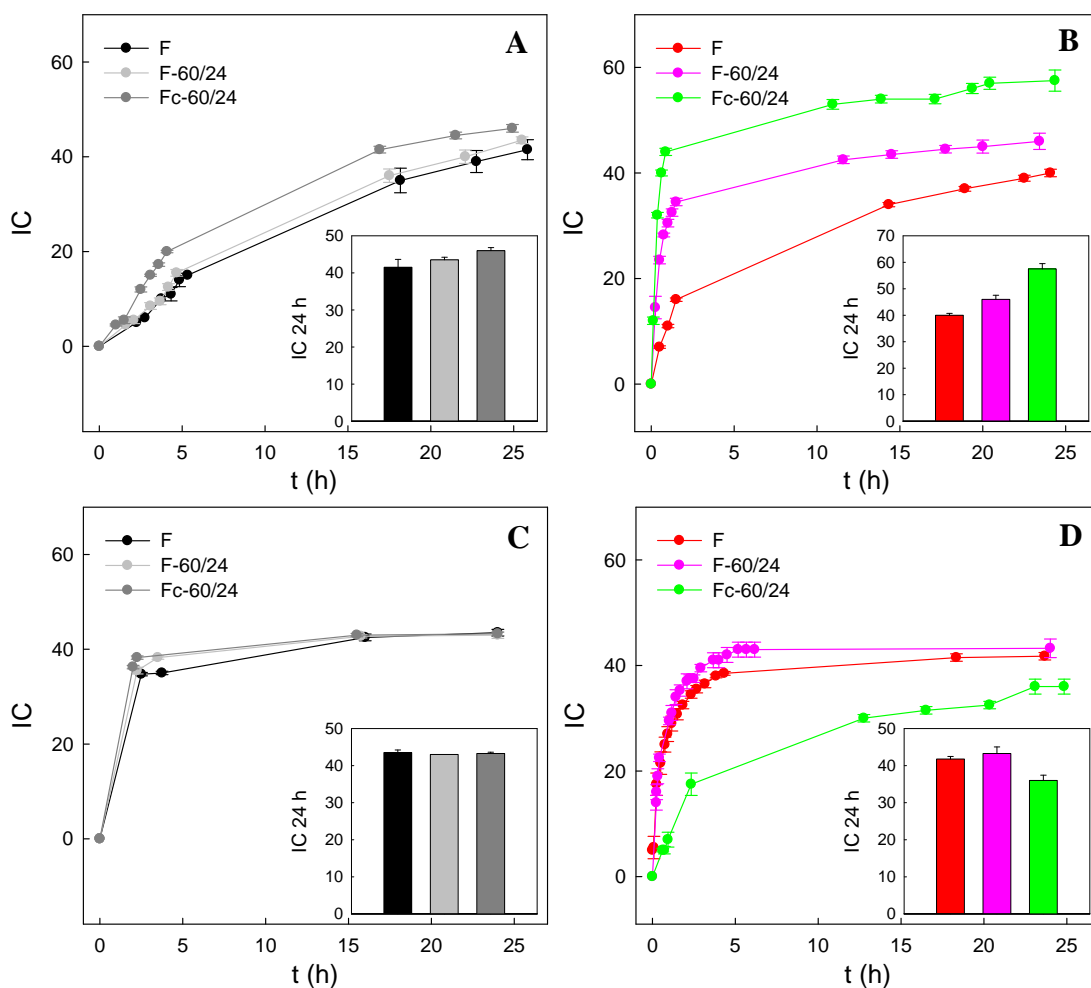


Figura 3.44. Índice de cremado (IC) en función del t (h) para las emulsiones preparadas a partir de las dispersiones de F, F-60/24 y Fc-60/24 preparadas a pH 7,0 (A) y 3,5 (B) y las homogeneizadas por HPH a pH 7,0 (C) y 3,5 (D).

Respecto a las emulsiones obtenidas a partir de dispersiones tratadas por HPH, el grado de desestabilización por cremado fue similar a pH 7,0: a las 24 h, el IC no mostró diferencias significativas para todas las muestras ($p > 0,05$, Figura 3.44C). Sin embargo, a pH 3,5, se observó un notable incremento de la estabilidad de las emulsiones

Fc-60/24 durante el tiempo de observación, fundamentalmente al inicio del almacenamiento. De todos modos, a las 24 h el IC de la emulsión mencionada fue significativamente menor al de las otras muestras ($p < 0,05$, Figura 3.44D).

Como se mencionó anteriormente, tanto a pH 3,5 como a pH 7,0 se observaron agregados en la fase acuosa continua de las emulsiones iniciales (Figura 3.41). Sin embargo, como se observa en la Figura 3.45, a pH neutro, los agregados sedimentan durante el almacenamiento de las emulsiones y por lo tanto, se separan de la fase oleosa dispersa. Por el contrario, en medio ácido los agregados migran conjuntamente con las gotas de aceite durante el cremado. Este hecho se atribuiría a la desestabilización electrostática proteica, consistente con una mayor interacción entre los agregados de la fase acuosa y los adsorbidos en la interfase agua/aceite. Sin embargo, el tratamiento HPH disminuiría el tamaño de los agregados, facilitando su adsorción en la interfase agua/aceite aumentando así la estabilidad frente al cremado.

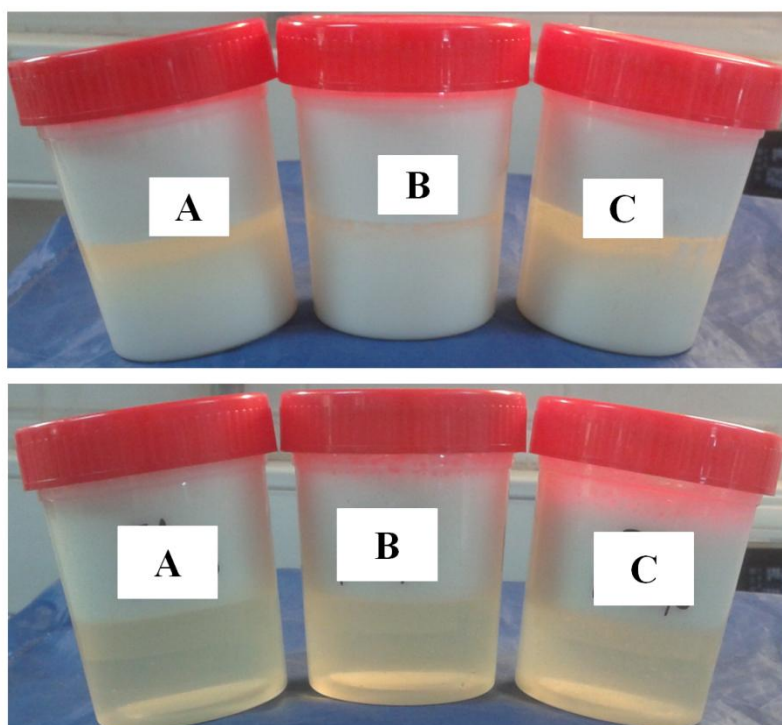


Figura 3.45. Imágenes tomadas de emulsiones almacenadas de manera estacionaria durante 24 h obtenidas a partir de dispersiones de muestras F (A), F-60/24 (B) y Fc-60/24 (C) preparadas a pH 7,0 (arriba) y 3,5 (abajo) homogeneizadas por HPH.

Los resultados precedentes indicarían que la combinación de la glicosilación en condiciones de humedad relativa controlada con el tratamiento HPH, mejora la estabilidad de las emulsiones O/W preparadas con harinas de soja en medio ácido, donde la solubilidad de sus principales proteínas, las globulinas de reserva, es notablemente reducida.

Por otra parte, se han publicado diversos trabajos donde se comprueba que, en determinadas condiciones, las partículas insolubles son capaces de adsorberse en la interfase aceite/agua de emulsiones O/W creando una barrera mecánica que previene la coalescencia mediante un efecto estérico [183-185]. Éste tipo de estabilización fue denominada *Pickering* [186] y sería consistente con la estabilización observada para la dispersión ácida de la muestra Fc-60/24 homogeneizada por el tratamiento HPH. La combinación entre la formación de agregados más pequeños y una mayor hidrofiliidad que compensa las atracciones hidrofóbicas (glicosilación proteica), permitiría una mejor adsorción y acomodamiento en la interfase agua/aceite, previniendo la coalescencia de las gotas de aceite por un mecanismo de repulsión estérica.

CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES

Las proteínas globulares que constituyen los SPI pueden formar agregados o asociaciones estables y solubles por calentamiento de la solución proteica a pH lejano al punto isoeléctrico e inmediato enfriamiento de la muestra. Estas suspensiones pueden agregar o gelificar, según la concentración de las mismas, por pérdida de su estabilidad electrostática inducida por la glucono- δ -lactona.

En todos los casos estudiados, pudo observarse la existencia de dos etapas bien definidas durante la acidificación. En la primera etapa, más lenta, hay un proceso de disociación de las partículas proteicas y/o un cambio conformacional, seguida por la segunda etapa más rápida de formación de los agregados, que crecen en tamaño hasta formar una red o malla de gel. El grado de compactación de dicha malla o red está vinculado principalmente con la velocidad de acidificación. Dicha compactación demostró ser máxima a los 25°C, tanto para los sistemas diluidos como para los sistemas más concentrados. La temperatura estaría afectando al carácter elástico final de los geles a través de la competencia entre dos procesos que ocurren simultáneamente y que involucran a la velocidad de gelación y a las interacciones hidrofóbicas.

La adición de WSP a los SPI induce la asociación de las partículas proteicas, formándose micropartículas de tamaño cada vez mayor a medida que aumenta la fracción másica proteica de WSP. Esto conduce a un aumento de la velocidad de agregación inducida por la adición de GDL. Teniendo en cuenta que el WSP no agrega al disminuir el pH, la disminución del tiempo y el aumento del pH a los cuales comienza la agregación estaría en un principio vinculada con una disminución de la estabilidad electrostática de los SPI al interactuar con el WSP a cantidades proteicas de WSP > 75% y > 50% para sistemas diluidos y concentrados respectivamente. Esto trae como consecuencia la formación de agregados o geles menos compactos. Esto último pudo confirmarse a través de análisis de imágenes tomadas por microscopía confocal y convencional.

Por lo tanto, fue posible obtener agregados y geles con características estructurales diferentes controlando el estado inicial de las muestras proteicas, el tipo y proporción de cosoluto y la velocidad del proceso de agregación/gelación (control de la temperatura).

La glicosilación de harinas de soja desgrasada usando los propios carbohidratos de soja fue factible y los resultados exhibidos constituyen un punto de partida para

trabajos posteriores. Si bien los tratamientos térmicos indujeron una pérdida de lisina, este aminoácido no es limitante en la harina de soja y, salvo en algunas excepciones, el contenido de lisina reactiva fue mayor a 5g/16 g N, el mínimo estipulado por el Código Alimentario Argentino. Además, los tratamientos de glicosilación fueron acompañados de formación de agregados insolubles en agua e KOH 0,2% P/P, pérdida parcial de actividad ureasa y antitriptica y desnaturalización parcial de sus proteínas componentes. La espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier permitió detectar cambios estructurales en las muestras por efecto del tratamiento térmico. El grado de agregación proteica se podría minimizar a través de modificaciones en la temperatura, HR y la relación proteínas/hidratos de carbono. Además, en las condiciones ensayadas en este trabajo, debería aplicarse un tratamiento térmico adicional por vía húmeda para permitir la inactivación adecuada del factor antitriptico de Kunitz.

Los resultados de SDS-PAGE corroboraron la presencia de los agregados de alto peso molecular, indicando una distribución de tamaños diferente y discreta para el caso de las muestras obtenidas en condiciones de humedad controlada (de mayor grado de glicosilación y agregación). Estos agregados de naturaleza covalente demostraron ser incluso bastante estables en medio reductor.

Las proteínas presentes en la harina de soja, glicosiladas con los carbohidratos de origen por tratamientos térmicos directos, no modificaron su estabilidad electrostática durante la formación de geles ácidos. Sin embargo, las muestras obtenidas en condiciones controladas de humedad presentaron cambios significativos en sus valores de módulo elástico al final del proceso de acidificación. A medida que aumentó el tiempo de tratamiento, mayor fue la pérdida del carácter elástico, llegando incluso a la pérdida total de la capacidad de formar geles después de las 48 h de tratamiento previo. Estas muestras fueron las que presentaron el mayor grado de glicosilación, lo que produciría un aumento de la hidrofiliidad superficial y, por lo tanto, una disminución de las interacciones hidrofóbicas, conduciendo a la formación de geles cada vez más débiles. Además, la glicosilación produciría aumento en la estabilidad estérica residual del sistema coloidal inhibiendo la reestructuración y compactación de la red de gel.

Por otro lado, a través del análisis de las imágenes digitales obtenidas por microscopía confocal de las dispersiones que formaron geles ácidos con disminución de carácter elástico, se observó la presencia de agregados de tamaño heterogéneo, predominando la presencia de agregados cada vez más grandes. Estos últimos no

participarían en la red de gel, como se observa en las imágenes de los geles ácidos, observándose un entramado menos interconectado, evidenciado por una red de gel cada más abierta y discontinua. Este mismo fenómeno contribuiría a explicar el comportamiento de mezclas SPI/WSP frente a la agregación y gelación ácida. A medida que aumenta la proporción de WSP en la mezcla se formaron agregados de mayor tamaño, conduciendo a la formación de geles cada vez menos elásticos. Además, el aumento de la cantidad relativa de una glicoproteína naturalmente presente en el suero de soja, como la lectina, contribuiría a la desestabilización de los agregados formados durante el tratamiento hidrotérmico debido a la hidrofiliidad aportada por los carbohidratos conjugados en su estructura proteica.

Con respecto a las propiedades emulsificantes de la harina control y las harinas glicosiladas, el tratamiento previo de las dispersiones utilizando un homogeneizador a válvula de alta presión fue fundamental para la disociación de los agregados preexistentes, tanto a pH 7,0 como a pH 3,5. Las emulsiones O/W preparadas con dispersiones previamente tratadas por alta presión, exhibieron menores tamaños promedio de partícula respecto a aquellas preparadas con las mismas dispersiones sin el tratamiento mencionado. Este resultado, observado a ambos pH, sería consistente con una mayor capacidad de los agregados de adsorberse en la interfase agua/aceite durante el proceso de homogeneización.

Es importante destacar que, de acuerdo al método de homogeneización empleado para la preparación de las emulsiones y la proporción relativamente baja de fase oleosa, es esperable que todas exhiban separación gravitacional durante el almacenamiento estacionario, dado que las modas de las poblaciones principales de partículas fueron siempre superiores a 10 μm . No obstante, a pH 7,0 los agregados insolubles no adsorbidos en la interfase sedimentaron hacia la parte inferior del recipiente en tanto que a pH 3,5, éstos migraron hacia la fase superior conjuntamente con las gotas de la emulsión. Este hecho se atribuiría a la desestabilización electrostática proteica, consistente en una mayor interacción entre los agregados presentes en la fase acuosa y los adsorbidos en la interfase agua/aceite.

En medio ácido, la combinación del tratamiento térmico de la harina en condiciones de humedad relativa controlada y la homogeneización por alta presión de la dispersión acuosa fueron necesarias para el incremento de la estabilidad frente al cremado y la coalescencia de las emulsiones resultantes. La presencia de agregados más pequeños en la dispersión permite una mejor adsorción y acomodamiento en la interfase

agua/aceite y las modificaciones químicas como la glicosilación proteica aseguran una adecuada estabilización por repulsión estérica, que compensa la atracción hidrofóbica evitando la coalescencia durante el almacenamiento estacionario. Este mecanismo de estabilización interfacial por repulsión estérica es consistente con el fenómeno de *Pickering*, observado en emulsiones O/W estabilizadas con partículas insolubles y activas superficialmente.

La utilización de harinas desgrasadas de soja para la preparación emulsiones O/W en medio ácido, dentro del rango de pH de interés alimentario, sería factible siempre que se utilice un método de homogeneización de alta energía que reduzca convenientemente el tamaño de los agregados insolubles. Además, un tratamiento de glicosilación controlada asegura un incremento de la hidrofiliidad por la conjugación con hidratos de carbono favoreciendo la estabilización por repulsión estérica.

Los resultados demuestran que cuando se desean elaborar nuevos ingredientes funcionales compuestos por proteínas de reserva y de suero de soja con distintos grados de glicosilación, empleando los propios hidratos de carbono reductores presentes en las materias primas de partida, pueden ocurrir paralelamente procesos de agregación proteica. Ambos procesos de agregación y/o glicosilación influyen significativamente sobre diversas propiedades tecnofuncionales como la solubilidad proteica, la gelación ácida y el poder emulsificante. Por lo tanto, los resultados presentados en esta tesis constituyen una base para futuras investigaciones y el desarrollo de productos alimenticios con características organolépticas optimizadas utilizando a las proteínas de soja como ingredientes y/o aditivos.

CAPÍTULO 5: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Liu, J., Ru, Q. y Ding, Y. (2012). *Glycation a promising method for food protein modification: Physicochemical properties and structure, a review*. Food Research International, 49(1): p. 170-183.
2. Ridner, E. *Alimentos transgénicos - Mitos y realidades*. 1^a ed, Ed. Grupo Q S.A., 2006, Buenos Aires. Sociedad Argentina de Nutrición.
3. MINCYT. *Argentina Innovadora 2020* (2013). http://www.argentinainnovadora2020.mincyt.gob.ar/?page_id=312.
4. Friedman, M. y Brandon, D. L. (2001). *Nutritional and health benefits of soy proteins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: p. 1069-1086.
5. Foegeding, A. E., Çakır, E. y Koç, H. (2010). *Using dairy ingredients to alter texture of foods: Implications based on oral processing considerations*. International Dairy Journal, 20(9): p. 562-570.
6. Foegeding, A. E., Brown, J., Drake, M. y Daubert, C. R. (2003). *Sensory and mechanical aspects of cheese texture*. International Dairy Journal, 13(8): p. 585-591.
7. Cheftel, J.-C., Cuq, J. L. y Lorient, D. *Proteínas alimentarias*. Ed. Acribia S.A., Vol. 6., 1989, Zaragoza: p. 257-275.
8. Kinsella, J. E. (2001). *Functional properties of soy Proteins*. Journal of American Oil Chemical Society, 56: p. 242-258.
9. Johnson, L. A., Myers, D. J. y Burden, D. J. (1992). *Early uses of soy. Protein in far east*. Inform, 3(4): p. 429-444.
10. Hutton, C. W. y Campbell, A. M. (1977). *Functional properties of soy concentrate and soy isolate in simple systems and in food systems*. Journal of Food Science, 42(2): p. 454 - 456.
11. Espinoza-Martos, I., Préstamo, G. y Rupérez, P. *Composición y propiedades del suero de soja, un subproducto de la elaboración del tofu*. Ed. Alimentaria, 2006: p. 72-73.
12. Espinoza-Martos, I. y Rúperéz, P. (2006). *Soy bean oligosaccharides. Potential as new ingredients in functional food*. Nutrición Hospitalaria, 21(1): p. 92-96.
13. Sorgentini, D. A. y Wagner, J. R. (1999). *Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins*. Journal of Food Biochemistry, 23(5): p. 489-507.

14. Kishi, K. y Inoue, G. *Soy protein in human nutrition*, en International Symposium, 1987: p. 45-57.
15. Yamauchi, F., Yamagishi, T. y Iwabuchi, S. (1991). *Molecular understanding of heat induced phenomena of soybean protein*. Food Reviews International, 7: p. 283-322.
16. Utsumi, S., Matsamura, Y. y Mori, T. *Structure-function relationships of soy proteins* en *Food proteins and their applications*. S. Damodaran y A. Paraf Editores, Ed. Marcel Dekker Inc., 1997, Nueva York: p. 257- 291.
17. Fukushima, D. *Soy proteins*, en *Proteins in food processing*. Editor Yada, R. Y., CRC Press and Woodhead Publishing limited, 2004, Cambridge.
18. Yamauchi, F., Sato, M., Sato, W., Kamata, Y. y Shibasaki, K. (1981). *Isolation and identification of β -conglycinin in soybean globulins*. Agricultural and Biological Chemistry, 45: p. 2863-2868.
19. Koide, T., Ikenaka, T. y Tsunasawa, S. (1973). *Studies on soybean trypsin inhibitors*. European Journal of Biochemistry, 32(3): p. 408-416.
20. Koshiyama, I., Kikuchi, M. y Fukushima, D. (1981). *2S globulins of soybean seeds. 2. Physicochemical and biological properties of protease inhibitors in 2S globulins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 29(2): p. 340-343.
21. Lin, P. y Ng, T. B. (2008). *Stable trypsin inhibitor from chinese dull black soybeans with potentially exploitable activities*. Process Biochemistry, 43: p. 993-998.
22. Odani, S., Koide, T. y Ikenaka, T. (1972). *Studies on soybean trypsin inhibitors*. The journal of Biochemistry, 71(5): p. 831-838.
23. DiPietro, C. M. y Liener, I. E. (1989). *Heat inactivation of the Kunitz and Bowman-Birk soybean protease inhibitors*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37(1): p. 39-44.
24. Birk, Y. *Proteinase inhibitors*, en *Hydrolytic Enzymes*. A. Neuroberger & K. Brocklehurst Editores. Ed. Elsevier Science, 1987, Amsterdam: p. 257-300.
25. Kennedy, A. R. *Anticarcinogenic activity of protease inhibitors*, en *Protease Inhibitors as Cancer Chemopreventive Agents*. W. Troll & A. R. Kennedy Editores, Ed. Plenum, 1993, Nueva York: p. 9-64.
26. Harms-Ringdahl, M., Forsberg, J., Fedorcsák, I. y Ehrenberg, L. (1979). *Trypsin inhibitory activity of a polypeptide isolated from red kidney beans that also*

- enhances lymphocyte stimulation.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 86: p. 492-499.
27. Lotan, R., Siegelman, H. W., Lis, H. y Sharon, N. (1974). *Subunit structure of soybean agglutinin.* Journal of Biological Chemistry, 249(4): p. 1219-1224.
 28. Morita, Y., Yagi, F., Aibara, S. y Yamashita, H. (1976). *Chemical composition and properties of soybean β -amylase.* The Journal of Biochemistry, 79(3): p. 591-603.
 29. Eskin, N. A. M., Grossman, S., Pinsky, A. y Whitaker, J. R. (1977). *Biochemistry of lipoxygenase in relation to food quality.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 9(1): p. 1-40.
 30. Karr-Lilienthal, L. K., Kadzere, C. T., Grieshop, C. M. y Fahey Jr, G. C. (2005). *Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: A review.* Livestock Production Science, 97(1): p. 1-12.
 31. Crittenden, R. G. y Playne, M. J. (1996). *Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides.* Trends in Food Science & Technology, 7(11): p. 353-361.
 32. Liying, Z., Li, D., Qiao, S., Johnson, E. W., Li, B., Thacker, P. A. y Han, I. K. (2003). *Effects on stachyose on performance, diarrhoea incidence and intestinal bacteria in weanling pigs.* Archives of Animal Nutrition, 57(1): p. 1-10.
 33. Aspinall, G. O., Begbie, R., Hamilton, A. y Whyte, J. N. C. (1967). *Polysaccharides of soy-beans. Part III. Extraction and fractionation of polysaccharides from cotyledon meal.* Journal of the Chemical Society C: Organic, (0): p. 1065-1070.
 34. Aspinall, G. O. y Cottrell, I. W. (1971). *Polysaccharides of soybeans. Part VI. Neutral polysaccharides from cotyledon meal.* Canadian Journal of Chemistry, 49(7): p. 1019-1022.
 35. Aspinall, G. O., Hunt, K. y Morrison, I. M. (1966). *Polysaccharides of soy-beans. Part II. Fractionation of hull cell-wall polysaccharides and the structure of a xylan.* Journal of the Chemical Society C: Organic, (0): p. 1945-1949.
 36. Nakamura, A., Yoshida, R., Maeda, H. y Corredig, M. (2006). *Soy soluble polysaccharide stabilization at oil-water interfaces.* Food Hydrocolloids, 20(2-3): p. 277-283.
 37. Nakauma, M., Funami, T., Noda, S., Ishihara, S., Al-Assaf, S., Nishinari, K. y Phillips, G. O. (2008). *Comparison of sugar beet pectin, soybean soluble*

- polysaccharide, and gum arabic as food emulsifiers. 1. Effect of concentration, pH, and salts on the emulsifying properties.* Food Hydrocolloids, 22(7): p. 1254-1267.
38. Valentas, K. J., Leon Levine, L. S. y Clark, J. P. *Food processing operations and scale-up.* 1° ed, Ed. Marcel Dekker Inc., CRC Press, 1991, Nueva York: p. 92-137.
 39. Friedman, M. (1996). *Nutritional value of proteins from different food sources. A review.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44(1): p. 6-29.
 40. Zayas, J. F. *Functionality of proteins in food.* Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1997, Nueva York.
 41. Oliver, C. M., Melton, L. D. y Stanley, R. A. (2006). *Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: A review.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 46(4): p. 337-350.
 42. Caer, D., Baniel, A., Subirade, M., Gueguen, J. y Colas, B. (1990). *Preparation and physicochemical properties of glycosylated derivatives of pea legumin.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38(8): p. 1700-1706.
 43. Stowell, C. P. y Lee, Y. C. *Neoglycoproteins the Preparation and Application of Synthetic Glycoproteins,* en *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry,* R. Stuart Tipson and Horton Derek Editores, Academic Press, 1980: p. 225-281.
 44. Colas, B., Caer, D. y Fournier, E. (1993). *Transglutaminase-catalyzed glycosylation of vegetable proteins. Effect on solubility of pea legumin and wheat gliadins.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41(11): p. 1811-1815.
 45. Hattori, M., Aiba, Y., Nagasawa, K. y Takahashi, K. (1996). *Functional improvement of alginic acid by conjugating with β -lactoglobulin.* Journal of Food Science, 61(6): p. 1171-1176.
 46. Kitabatake, N., Cuq, J. L. y Cheftel, J. C. (1985). *Covalent binding of glycosyl residues to beta-lactoglobulin: effects on solubility and heat stability.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 33(1): p. 125-130.
 47. van Boekel, M. A. J. S. (2001). *Kinetic aspects of the Maillard reaction: a critical review.* Food / Nahrung, 45(3): p. 150-159.
 48. Katayama, S., Shima, J. y Saeki, H. (2002). *Solubility improvement of shellfish muscle proteins by reaction with glucose and its soluble state in low-ionic-*

- strength medium*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(15): p. 4327-4332.
49. Maitena, U., Katayama, S., Sato, R. y Saeki, H. (2004). *Improved solubility and stability of carp myosin by conjugation with alginate oligosaccharide*. Fisheries Science, 70(5): p. 896-902.
 50. Saeki, H. y Inoue, K. (1997). *Improved solubility of carp myofibrillar proteins in low ionic strength medium by glycosylation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45(9): p. 3419-3422.
 51. Sato, R., Katayama, S., Sawabe, T. y Saeki, H. (2003). *Stability and emulsion-forming ability of water-soluble fish myofibrillar protein prepared by conjugation with alginate oligosaccharide*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(15): p. 4376-4381.
 52. Shepherd, R., Robertson, A. y Ofman, D. (2000). *Dairy glycoconjugate emulsifiers: casein-maltodextrins*. Food Hydrocolloids, 14(4): p. 281-286.
 53. Aoki, T., Hiidome, Y., Kitahata, K., Sugimoto, Y., Ibrahim, H. R. y Kato, Y. (1999). *Improvement of heat stability and emulsifying activity of ovalbumin by conjugation with glucuronic acid through the Maillard reaction*. Food Research International, 32(2): p. 129-133.
 54. Chevalier, F., Chobert, J.-M., Genot, C. y Haertlé, T. (2001). *Scavenging of free radicals, antimicrobial, and cytotoxic activities of the maillard reaction products of β -lactoglobulin glycated with several sugars*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(10): p. 5031-5038.
 55. Fujiwara, K., Oosawa, T. y Saeki, H. (1998). *Improved thermal stability and emulsifying properties of carp myofibrillar proteins by conjugation with dextran*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(4): p. 1257-1261.
 56. Hattori, M., Ogino, A., Nakai, H. y Takahashi, K. (1997). *Functional improvement of β -lactoglobulin by conjugating with alginate lyase-lysate*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45(3): p. 703-708.
 57. Sato, R., Sawabe, T. y Saeki, H. (2005). *Characterization of fish myofibrillar protein by conjugation with alginate oligosaccharide prepared using genetic recombinant alginate lyase*. Journal of Food Science, 70(1): p. C58-C62.
 58. Darewicz, M., Dziuba, J. y Mioduszevska, H. (1998). *Some physico-chemical properties and structural changes of bovine β -casein upon glycation*. Food / Nahrung, 42(3-4): p. 213-214.

59. Diftis, N. y Kiosseoglou, V. (2004). *Competitive adsorption between a dry-heated soy protein–dextran mixture and surface-active materials in oil-in-water emulsions*. Food Hydrocolloids, 18(4): p. 639-646.
60. Groubet, R., Chobert, J. M., Haertle, T. y Nicolas, M. G. (1999). *Functional properties of milk proteins glycosylated in mild conditions*. Sciences des aliments, 19: p. 423-438.
61. Nagasawa, K., Takahashi, K. y Hattori, M. (1996). *Improved emulsifying properties of β -lactoglobulin by conjugating with carboxymethyl dextran*. Food Hydrocolloids, 10(1): p. 63-67.
62. Achouri, A., Boye, J. I., Yaylayan, V. A. y Yeboah, F. K. (2005). *Functional properties of glycosylated soy 11S glycinin*. Journal of Food Science, 70(4): p. 269-274.
63. Campbell, L., Raikos, V. y Euston, S. R. (2003). *Modification of functional properties of egg-white proteins*. Food / Nahrung, 47(6): p. 369-376.
64. Chobert, J.-M., Gaudin, J.-C., Dalgalarondo, M. y Haertlé, T. (2006). *Impact of Maillard type glycation on properties of beta-lactoglobulin*. Biotechnology Advances, 24(6): p. 629-632.
65. Dickinson, E. y Izgi, E. (1996). *Foam stabilization by protein-polysaccharide complexes*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 113(1–2): p. 191-201.
66. Pedrosa, C., Trisciuzzi, C. y Ferreira, S. T. (1997). *Effects of glycosylation on functional properties of vicilin, the 7S storage globulin from pea (*Pisum sativum*)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45(6): p. 2025-2030.
67. Lertittikul, W., Benjakul, S. y Tanaka, M. (2007). *Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein–glucose model system as influenced by pH*. Food Chemistry, 100(2): p. 669-677.
68. Nakamura, S., Ogawa, M., Nakai, S., Kato, A. y Kitts, D. D. (1998). *Antioxidant activity of a maillard-type phosphovitin–galactomannan conjugate with emulsifying properties and heat stability*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(10): p. 3958-3963.
69. Sun, Y., Hayakawa, S., Ogawa, M. y Izumori, K. (2005). *Evaluation of the site specific protein glycation and antioxidant capacity of rare sugar–protein/peptide conjugates*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(26): p. 10205-10212.

70. Song, Y., Babiker, E. E., Usui, M., Saito, A. y Kato, A. (2002). *Emulsifying properties and bactericidal action of chitosan–lysozyme conjugates*. Food Research International, 35(5): p. 459-466.
71. Takahashi, K., Lou, X.-F., Ishii, Y. y Hattori, M. (2000). *Lysozyme–glucose stearic acid monoester conjugate formed through the Maillard reaction as an antibacterial emulsifier*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(6): p. 2044-2049.
72. Tanaka, M., Kunisaki, N. y Ishizaki, S. (1999). *Improvement of emulsifying and antibacterial properties of salmine by the Maillard reaction with dextran*. Fisheries science, 65(4): p. 623-628.
73. Ashie, I. N. A. y Lanier, T. C. (1999). *High pressure effects on gelation of surimi and turkey breast muscle enhanced by microbial transglutaminase*. Journal of Food Science, 64(4): p. 704-708.
74. Easa, A. M., Hill, S. E., Mitchell, J. R. y Taylor, A. J. (1996). *Bovine serum albumin gelation as a result of the Maillard reaction*. Food Hydrocolloids, 10(2): p. 199-202.
75. Gerrard, J. A., Brown, P. K. y Fayle, S. E. (2003). *Maillard crosslinking of food proteins III: the effects of glutaraldehyde, formaldehyde and glyceraldehyde upon bread and croissants*. Food Chemistry, 80(1): p. 45-50.
76. Oste, R. E., Brandon, D. L., Bates, A. H. y Friedman, M. (1990). *Effect of Maillard browning reactions of the Kunitz soybean trypsin inhibitor on its interaction with monoclonal antibodies*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38(1): p. 258-261.
77. Liu, Q., Kong, B., Han, J., Sun, C. y Li, P. (2014). *Structure and antioxidant activity of whey protein isolate conjugated with glucose via the Maillard reaction under dry-heating conditions*. Food Structure, 1(2): p. 145-154.
78. Sanmartín, E., Arboleya, J. C., Villamiel, M. y Moreno, F. J. (2009). *Recent advances in the recovery and improvement of functional proteins from fish processing by-products: use of protein glycation as an alternative method*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 8(4): p. 332-344.
79. Hodge, J. E. (1953). *Dehydrated foods, chemistry of browning reactions in model systems*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1(15): p. 928-943.
80. Ames, J. M. *The Maillard reaction*, en *Biochemistry of food proteins*. Editor B.J.F. Hudson, Elsevier Applied Science, 1992, Londres: p. 99-153.

81. Heyns, K. y Meinecke, K. (1953). *The formation and preparation of D-glucosamine from fructose and ammonia*. *Chemische Berichte*, 86: p. 1453-1562.
82. Friedman, M. (1996). *Food browning and its prevention: An overview*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3): p. 631-653.
83. Van Boekel, M. A. J. S. (1998). *Effect of heating on Maillard reactions in milk*. *Food Chemistry*, 62(4): p. 403-414.
84. Martins, S. I. F. S., Jongen, W. M. F. y van Boekel, M. A. J. S. (2000). *A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling*. *Trends in Food Science & Technology*, 11(9-10): p. 364-373.
85. Ledl, F. y Schleicher, E. (1990). *New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body*. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 29(6): p. 565-594.
86. Zhang, Y. y Zhang, Y. (2007). *Formation and reduction of acrylamide in Maillard reaction: A review based on the current state of knowledge*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(5): p. 521-542.
87. Aoki, S.-i., Hasegawa, G., Shigeta, H., Obayashi, H., Fujii, M., Kimura, F., Moriwaki, A., Nakamura, N., Ienaga, K., Nakamura, K. y Kondo, M. (2000). *Crossline levels in serum and erythrocyte membrane proteins from patients with diabetic nephropathy*. *Diabetes research and clinical practice*, 48(2): p. 119-125.
88. Dyer, D. G., Blackledge, J. A., Thorpe, S. R. y Baynes, J. W. (1991). *Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose. Identification of glucose and other carbohydrates as possible precursors of pentosidine in vivo*. *Journal of Biological Chemistry*, 266(18): p. 11654-11660.
89. Grandhee, S. K. y Monnier, V. M. (1991). *Mechanism of formation of the Maillard protein cross-link pentosidine. Glucose, fructose, and ascorbate as pentosidine precursors*. *Journal of Biological Chemistry*, 266(18): p. 11649-11653.
90. Machado, A. P., Pinto, R. S., Moysés, Z. P., Nakandakare, E. R., Quintão, E. C. R. y Passarelli, M. (2006). *Aminoguanidine and metformin prevent the reduced rate of HDL-mediated cell cholesterol efflux induced by formation of advanced glycation end products*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(3): p. 392-403.
91. Méndez, J. D. y Leal, L. I. (2004). *Inhibition of in vitro pyrroline formation by l-arginine and polyamines*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58(10): p. 598-604.

92. Miyata, S. y Monnier, V. (1992). *Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end products in diabetic tissues using monoclonal antibody to pyrraline*. The Journal of Clinical Investigation, 89(4): p. 1102-1112.
93. Nagaraj, R. H. y Monnier, V. M. (1992). *Isolation and characterization of a blue fluorophore from human eye lens crystallins: In vitro formation from Maillard reaction with ascorbate and ribose*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1116(1): p. 34-42.
94. Nagaraj, R. H., Portero-Otin, M. y Monnier, V. M. (1996). *Pyrraline ether crosslinks as a basis for protein crosslinking by the advanced Maillard reaction in aging and diabetes*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 325(2): p. 152-158.
95. Obayashi, H., Nakano, K., Shigeta, H., Yamaguchi, M., Yoshimori, K., Fukui, M., Fujii, M., Kitagawa, Y., Nakamura, N., Nakamura, K., Nakazawa, Y., Ienaga, K., Ohta, M., Nishimura, M., Fukui, I. y Kondo, M. (1996). *Formation of crossline as a fluorescent advanced glycation end product in vitro and in vivo*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 226(1): p. 37-41.
96. Tessier, F., Obrenovich, M. y Monnier, V. M. (1999). *Structure and mechanism of formation of human lens fluorophore LM-1: Relationship to vesperlysine a and the advanced Maillard reaction in aging, diabetes, and cataractogenesis*. Journal of Biological Chemistry, 274(30): p. 20796-20804.
97. Rizzi, G. P. (1997). *Chemical structure of colored maillard reaction products*. Food Reviews International, 13(1): p. 1-28.
98. Spotti, M. J., Perduca, M. J., Piagentini, A., Santiago, L. G., Rubiolo, A. C. y Carrara, C. R. (2013). *Does dextran molecular weight affect the mechanical properties of whey protein/dextran conjugate gels?*. Food Hydrocolloids, 32(1): p. 204-210.
99. Liu, Y., Zhao, G., Zhao, M., Ren, J. y Yang, B. (2012). *Improvement of functional properties of peanut protein isolate by conjugation with dextran through Maillard reaction*. Food Chemistry, 131(3): p. 901-906.
100. Corzo-Martínez, M., Moreno, F. J., Villamiel, M. y Harte, F. M. (2010). *Characterization and improvement of rheological properties of sodium caseinate glycosylated with galactose, lactose and dextran*. Food Hydrocolloids, 24(1): p. 88-97.

101. Spark, A. A. (1969). *Role of amino acids in non-enzymic browning*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 20(5): p. 308-316.
102. Ryu, S.-Y., Roh, H.-J., Noh, B.-S., Kim, S.-Y., Oh, D.-K., Lee, W.-J., Yoon, J.-R. y Kim, S.-S. (2003). *Effects of temperature and pH on the non-enzymatic browning reaction of tagatose-glycine model system*. Food Science and Biotechnology, 12(6): p. 675-679.
103. Spotti, M. J., Perduca, M. J., Piagentini, A., Santiago, L. G., Rubiolo, A. C. y Carrara, C. R. (2013). *Gel mechanical properties of milk whey protein-dextran conjugates obtained by Maillard reaction*. Food Hydrocolloids, 31(1): p. 26-32.
104. Ajandouz, E. H. y Puigserver, A. (1999). *Nonenzymatic browning reaction of essential amino acids: Effect of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(5): p. 1786-1793.
105. Jiménez-Castaño, L., Villamiel, M., Martín-Álvarez, P. J., Olano, A. y López-Fandiño, R. (2005). *Effect of the dry-heating conditions on the glycosylation of β -lactoglobulin with dextran through the Maillard reaction*. Food Hydrocolloids, 19(5): p. 831-837.
106. Wolfrom, M. L., Kashimura, N. y Horton, D. (1974). *Factors affecting the Maillard browning reaction between sugars and amino acids. Nonenzymic browning of dehydrated orange juice*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 22(5): p. 796-800.
107. Wooster, T. J. y Augustin, M. A. (2007). *Rheology of whey protein-dextran conjugate films at the air/water interface*. Food Hydrocolloids, 21(7): p. 1072-1080.
108. Achouri, A., Boye, J. I., Belanger, D., Chiron, T., Yaylayan, V. A. y Yeboah, F. K. (2010). *Functional and molecular properties of calcium precipitated soy glycinin and the effect of glycation with κ -carrageenan*. Food Research International, 43(5): p. 1494-1504.
109. Zhang, J.-B., Wu, N.-N., Yang, X.-Q., He, X.-T. y Wang, L.-J. (2012). *Improvement of emulsifying properties of Maillard reaction products from β -conglycinin and dextran using controlled enzymatic hydrolysis*. Food Hydrocolloids, 28(2): p. 301-312.
110. Li, W., Zhao, H., He, Z., Zeng, M., Qin, F. y Chen, J. (2016). *Modification of soy protein hydrolysates by Maillard reaction: Effects of carbohydrate chain length*

- on structural and interfacial properties. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 138: p. 70-77.
111. Araba, M. y Dale, N. M. (1990). *Evaluation of protein solubility as an indicator of overprocessing soybean meal. Poultry Science*, 69(1): p. 76-83.
 112. Goodno, C. C., Swaisgood, H. E. y Catignani, G. L. (1981). *A fluorimetric assay for available lysine in proteins. Analytical Biochemistry*, 115(1): p. 203-211.
 113. Liu, K. y Markakis, P. (1989). *An improved colorimetric method for determining antitryptic activity in soybean products. Cereal Chemistry*, 66(5): p. 415-422.
 114. Ju, Z. Y., Otte, J., Zakora, M. y Qvist, K. B. (1997). *Enzyme-induced gelation of whey proteins: Effect of protein denaturation. International Dairy Journal*, 7(1): p. 71-78.
 115. Utsumi, S. y Kinsella, J. E. (1985). *Forces involved in soy protein gelation: effects of various reagents on the formation, hardness and solubility of heat-induced gels made from 7S, 11S and soy isolate. Journal of Food Science*, 50: p. 1278-1282.
 116. Alting, A. C., de Jongh, H. H. J., Visschers, R. W. y Simons, J.-W. F. A. (2002). *Physical and chemical interactions in cold gelation of food proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16): p. 4682-4689.
 117. Rabiey, L. y Britten, M. (2009). *Effect of whey protein enzymatic hydrolysis on the rheological properties of acid-induced gels. Food Hydrocolloids*, 23(8): p. 2302-2308.
 118. Campbell, L. J., Gu, X., Dewar, S. J. y Euston, S. R. (2009). *Effects of heat treatment and glucono-delta-lactone-induced acidification on characteristics of soy protein isolate. Food Hydrocolloids*, 23(2): p. 344-351.
 119. Gu, X., Campbell, L. J. y Euston, S. R. (2009). *Influence of sugars on the characteristics of glucono-delta-lactone-induced soy protein isolate gels. Food Hydrocolloids*, 23(2): p. 314-326.
 120. Braga, A. L. M., Menossi, M. y Cunha, R. L. (2006). *The effect of the glucono-delta-lactone/caseinate ratio on sodium caseinate gelation. International Dairy Journal*, 16(5): p. 389-398.
 121. Ferry, J. D. *Viscoelastic properties of polymers*. 3° ed, Wiley, 1980, Nueva York.
 122. Hermansson, A.-M. *The importance of biopolymers in structure engineering, en Food macromolecules and colloids*. E. Dickinson & D. Lorient Editores, Royal Society of Chemistry, 1995, Cambridge: p. 363-375.

123. Autya, M. A. E., O'Kennedy, B. T., Allan-Wojtas, P. y Mulvihill, D. M. (2005). *The application of microscopy and rheology to study the effect of milk salt concentration on the structure of acidified micellar casein systems*. Food Hydrocolloids, 19: p. 101-109.
124. van den Berg, L., Carolas, A. L., van Vliet, T., van der Linden, E., van Boekel, M. A. J. S. y van de Velde, F. (2008). *Energy storage controls crumbly perception in whey proteins/polysaccharide mixed gels*. Food Hydrocolloids, 22(7): p. 1404-1417.
125. de Kruif, C. G. (1997). *Skim milk acidification*. Journal of Colloid and Interface Science, 185(1): p. 19-25.
126. Liu, K. S. *Soybeans: Chemistry, Technology, and Utilization*. Chapman & Hall Editores, Ed. Springer, 1997.
127. Kumar, V., Rani, A., Tindwani, C. y Jain, M. (2003). *Lipoxygenase isozymes and trypsin inhibitor activities in soybean as influenced by growing location*. Food Chemistry, 83(1): p. 79-83.
128. Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M. J. y Mateos-Aparicio, I. (2008). *Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and Englyst methods*. Food Chemistry, 108(3): p. 1099-1105.
129. Rodríguez, R., Jiménez, A., Fernández-Bolaños, J., Guillén, R. y Heredia, A. (2006). *Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients*. Trends in Food Science & Technology, 17(1): p. 3-15.
130. Donato, L., Kolodziejczyk, E. y Rouvet, M. (2011). *Mixtures of whey protein microgels and soluble aggregates as building blocks to control rheology and structure of acid induced cold-set gels*. Food Hydrocolloids, 25(4): p. 734-742.
131. Guyomarc'h, F., Jemin, M., Le Tilly, V., Madec, M.-N. y Famelart, M.-H. (2009). *Role of the heat-induced whey protein/ κ -casein complexes in the formation of acid milk gels: A kinetic study using rheology and confocal microscopy*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(13): p. 5910-5917.
132. Langton, M. y Hermansson, A.-M. (1996). *Image analysis of particulate whey protein gels*. Food Hydrocolloids, 10(2): p. 179-191.
133. Zheng, C., Sun, D.-W. y Zheng, L. (2006). *Recent applications of image texture for evaluation of food qualities - a review*. Trends in Food Science and Technology, 17(3): p. 113-128.

134. Borah, S., Hines, E. L. y Bhuyan, M. (2007). *Wavelet transform based image texture analysis for size estimation applied to the sorting of tea granules*. Journal of Food Engineering, 79(2): p. 629-639.
135. Dickinson, E. *Introduction to food colloids*. 1992, Oxford: Oxford University Press.
136. McClements, D. J. *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC press, 2004.
137. Walstra, P. (1993). *Principles of emulsion formation*. Chemical Engineering Science, 48(2): p. 333-349.
138. David, P., Bill, S., Raju, P. B. y Larry, D. F. *Dressings and sauces*, en *Food Emulsions*. CRC Press, 2003.
139. Puppo, M. C., Beaumal, V., Chapleau, N., Speroni, F., de Lamballerie, M., Añón, M. C. y Anton, M. (2008). *Physicochemical and rheological properties of soybean protein emulsions processed with a combined temperature/high-pressure treatment*. Food Hydrocolloids, 22(6): p. 1079-1089.
140. Zheng, H.-G., Yang, X.-Q., Tang, C.-H., Li, L. y Ahmad, I. (2008). *Preparation of soluble soybean protein aggregates (SSPA) from insoluble soybean protein concentrates (SPC) and its functional properties*. Food Research International, 41(2): p. 154-164.
141. Palazolo, G. G., Mitidieri, F. E. y Wagner, J. R. (2003). *Relationship between interfacial behavior of native and denatured soybean isolates and microstructure and coalescence of o/w emulsions. Effect of salt and protein concentration*. Food Science and Technology International, 9(6): p. 409-419.
142. Hill, S. E., Ledward, D. A. y Mitchell, J. R. *Functional properties of food macromolecules*. Springer Science & Business Media, 1998.
143. Damodaran, S. (2005). *Protein stabilization of emulsions and foams*. Journal of Food Science, 70(3): p. R54-R66.
144. Dickinson, E. (2009). *Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers*. Food Hydrocolloids, 23(6): p. 1473-1482.
145. Benichou, A., Aserin, A. y Garti, N. (2002). *Protein-polysaccharide interactions for stabilization of food emulsions*. Journal of Dispersion Science and Technology, 23(1-3): p. 93-123.

146. Sobral, P. A. y Wagner, J. R. (2009). *Relación entre la composición y la actividad antitriptica de sueros de soja y el comportamiento térmico de sus proteínas aisladas*. Información Tecnológica, 20(5): p. 65-73.
147. Kakade, M. L., Simons, N. y Liener, I. E. (1969). *An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples*. Cereal Chemistry, 46: p. 518-526.
148. Liu, K. y Markakis, P. (1989). *An improved colorimetric method for determining antitryptic activity in soybean products*. Cereal Chemistry, 66: p. 415-422.
149. Holt, C., Parker, T. G. y Dalgleish, D. G. (1975). *Measurement of particle sizes by elastic and quasi-elastic light scattering*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure, 400(2): p. 283-292.
150. Yang, K. y Hogg, R. (1979). *Estimation of particle size distributions from turbidimetric measurements*. Analytical Chemistry, 51: p. 758-763.
151. Horne, D. S. (1987). *Determination of the fractal dimension using turbidimetric techniques. Application to aggregating protein systems*. Faraday Discussions of the Chemical Society, 83(0): p. 259-270.
152. Mandelbrot, B. *The fractal geometry of nature*, W.H. Freeman and Co., 1982, San Francisco.
153. Worning, P., Bauer, R., Øgdenal, L. y Lomholt, S. (1998). *A novel approach to turbidimetry of dense systems: An investigation of the enzymatic gelation of casein micelles*. Journal of Colloid and Interface Science, 203(2): p. 265-277.
154. Teixeira, J. *Fractal and non-fractal patterns in physics*, en *On growth and form*, Stanley and Ostrowsky Editores, Martinus Nijhoff Publisher, 1986, Dordrecht, Holanda: p. 145-162.
155. Camerini-Otero, R. D. y Day, L. A. (1978). *The wavelength dependence of the turbidity of solutions of macromolecules*. Biopolymers, 17(9): p. 2241-2249.
156. Lucey, J. A. (2002). *Formation and physical properties of milk protein gels*. Journal of Dairy Science, 85(2): p. 281-294.
157. Gonzalez, R. C. y Woods, R. E. *Digital image processing*. Prentice hall Upper Saddle River, 2002: p. 462-463.
158. Risso, P., Relling, V., Armesto, M., Pires, M. y Gatti, C. (2007). *Effect of size, proteic composition, and heat treatment on the colloidal stability of proteolyzed bovine casein micelles*. Colloid & Polymer Science, 285(7): p. 809-817.

159. Stanley, D. W., Goff, H. D. y Smith, A. K. (1996). *Texture-structure relationships in foamed dairy emulsions*. Food Research International, 29(1): p. 1-13.
160. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. Journal of Biological Chemistry, 193(1): p. 265-275.
161. Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H. y Catignani, G. L. (1983). *Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins*. Journal of Dairy Science, 66(6): p. 1219-1227.
162. Nkonge, C. y Ballance, G. M. (1982). *A sensitive colorimetric procedure for nitrogen determination in micro-Kjeldahl digests*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 30(3): p. 416-420.
163. Código Alimentario Argentino (CAA). *Capítulo XIX: Harinas, concentrados, aislados y derivados proteínicos*. Ley 18.284 - Decreto 2126/71. http://www.msal.gob.ar/argentina-saludable/pdf/CAPITULO_XIX.pdf
164. Laemmli, U. K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 227: p. 680-685.
165. Palazolo, G. G. y Wagner, J. R. *Effect of freezing on stability of soy protein and sodium caseinate oil-in-water emulsions*, en *Functional Properties of Food Components*. Editor C. E. Lupano, Research Signpost, 2007, Kerala, India: p. 33-56.
166. Hidalgo, M., Fontana, M., Armendariz, M., Riquelme, B., Wagner, J. y Risso, P. (2015). *Acid-induced aggregation and gelation of sodium caseinate-guar gum mixtures*. Food Biophysics, 10(2): p. 181-194.
167. Chandler, D. (2005). *Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly*. Nature, 437(7059): p. 640-647.
168. Hidalgo, M. E. *Formación y caracterización de geles formados por caseinato de sodio y polisacáridos: propiedades fisicoquímicas, reológicas y estructurales*, en *Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas*. Tesis doctoral. 2013, Universidad Nacional de Rosario.
169. Marrone, J. *Análisis del proceso de gelificación de proteínas del lactosuero bovino*. Tesina de Licenciatura en Biotecnología. 2010, Universidad Nacional de Rosario: Rosario.

170. Renkema, J. M. S., Lakemond, C. M. M., de Jongh, H. H. J., Gruppen, H. y van Vliet, T. (2000). *The effect of pH on gel forming properties of soy proteins*. Journal of Biotechnology, 79: p. 223-230.
171. Utsumi, S., Damodaran, S. y Kinsella, J. E. (1984). *Heat-induced interactions between soybean proteins: preferential association of 11S basic subunits and beta subunits of 7S*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 32(6): p. 1406-1412.
172. Sharon, N. y Lis, H. (2002). *How proteins bind carbohydrates: Lessons from legume lectins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(22): p. 6586-6591.
173. Shimada, K. y Cheftel, J. C. (1989). *Sulfhydryl group/disulfide bond interchange reactions during heat-induced gelation of whey protein isolate*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37(1): p. 161-168.
174. Haris, P. I. y Severcan, F. (1999). *FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 7(1-4): p. 207-221.
175. Sobral, P. A., Palazolo, G. G. y Wagner, J. R. (2012). *Evaluación de cambios estructurales en las proteínas de soja durante el proceso de obtención de harina desgrasada de soja*. Aceites y grasas, 2 (tomo XXII)(87): p. 82-90.
176. Su, J.-F., Huang, Z., Yuan, X.-Y., Wang, X.-Y. y Li, M. (2010). *Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions*. Carbohydrate Polymers, 79(1): p. 145-153.
177. Sobral, P. A., Palazolo, G. G. y Wagner, J. R. (2011). *Effect of water content on thermal behavior of freeze-dried soy whey and their isolated proteins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(8): p. 3950-3956.
178. Caskey, J. C. D. y Knapp, F. C. (1944). *Method for detecting inadequately heated soybean oil meal*. Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition, 16(10): p. 640-641.
179. Whittle, E. y Araba, M. (1992). *Sources of variability in the protein solubility assay for soybean meal*. The Journal of Applied Poultry Research, 1(2): p. 221-225.
180. Stading, M. y Hermansson, A.-M. (1990). *Viscoelastic behaviour of β -lactoglobulin gel structures*. Food Hydrocolloids, 4(2): p. 121-135.
181. Sun, W.-W., Yu, S.-J., Yang, X.-Q., Wang, J.-M., Zhang, J.-B., Zhang, Y. y Zheng, E.-L. (2011). *Study on the rheological properties of heat-induced whey*

- protein isolate–dextran conjugate gel*. Food Research International, 44(10): p. 3259-3263.
182. Spotti, M. J., Martinez, M. J., Pilosof, A. M. R., Candiotti, M., Rubiolo, A. C. y Carrara, C. R. (2014). *Influence of Maillard conjugation on structural characteristics and rheological properties of whey protein/dextran systems*. Food Hydrocolloids, 39(0): p. 223-230.
183. Merefati, A., Rayner, M., Timgren, A., Dejmek, P. y Sjöo, M. (2013). *Freezing and freeze-drying of Pickering emulsions stabilized by starch granules*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 436: p. 512-520.
184. Subramaniam, A. B., Abkarian, M. y Stone, H. A. (2005). *Controlled assembly of jammed colloidal shells on fluid droplets*. Nature Materials, 4(7): p. 553-556.
185. Frelichowska, J., Bolzinger, M.-A., Pelletier, J., Valour, J.-P. y Chevalier, Y. (2009). *Topical delivery of lipophilic drugs from o/w Pickering emulsions*. International Journal of Pharmaceutics, 371(1–2): p. 56-63.
186. Pickering, S. U. (1907). *CXCVI.-Emulsions*. Journal of the Chemical Society, Transactions, 91(0): p. 2001-2021.