

Tesis de Posgrado

Formación y estabilidad de espumas de proteínas de soja: efecto de la desnaturalización térmica y de la interacción con polisacáridos

Carp, Dina Judith

2001

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Carp, Dina Judith. (2001). Formación y estabilidad de espumas de proteínas de soja: efecto de la desnaturalización térmica y de la interacción con polisacáridos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3333_Carp.pdf

Cita tipo Chicago:

Carp, Dina Judith. "Formación y estabilidad de espumas de proteínas de soja: efecto de la desnaturalización térmica y de la interacción con polisacáridos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3333_Carp.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y
NATURALES
DEPARTAMENTO DE INDUSTRIAS

***Formación y estabilidad de espumas de
proteínas de soja: efecto de la
desnaturalización térmica y de la
interacción con polisacáridos***

Autor: Dina Judith Carp

Directora: Dra. Ana M. R. Pilosof

3333

2001



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE INDUSTRIAS**

**FORMATION AND STABILITY OF SOY PROTEINS FOAMS:
EFFECT OF THERMAL DENATURATION AND THE
INTERACTIONS WITH POLYSACCHARIDES.**

Autor: Dina Judith Carp

Director: Dra. Ana M. R. Pilosof

2001

A Alejandro y Natasha.

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana M. R. Pilosof por formarme y orientarme, dándome libertad para opinar y proponer; por todos los momentos gratos compartidos y sus aportes no sólo como investigadora, sino también como persona y como mujer.

Al Dr. Gualterio B. Bartholomai por su constante apoyo.

A la Universidad de Buenos Aires por las becas otorgadas que me permitieron un sustento económico durante mi formación.

Al Dr. Jorge Wagner por sus buenos criterios aportados al comienzo de mi trabajo.

A la Dra. Ursula Bordenave por el préstamo del indispensable "baño termostatzado".

A mis amigas Carolina y Viviana, con quienes compartimos todos estos años y crecimos juntas.

A Rosa, que me cambió la vida en el laboratorio y con quién compartí la última parte del trabajo.

A Mauricio, por todos sus consejos y aportes ingeniosos.

A Betty, Virginia, Nora, Oscar y Vanesa, con quienes compartimos los vaivenes diarios, y a Florencia, Leila, Rosita, Pilar, Martha y Patricia, con quienes compartiendo cumpleaños y los distintos momentos cotidianos hicieron más agradable el trabajo en el laboratorio.

A la Prof. Perla Relkin y a Mme. Belle Fontaine que me permitieron el uso del equipo de burbujeo y del tensiolaminómetro, respectivamente.

A Myrian, Pablo y Mónica M. por su siempre buena predisposición.

A todos los que quiero y que me quieren y que de alguna forma me acompañaron durante todos estos años.

A Alejandro por su eterna paciencia.

A mis padres que con mucho amor me ayudaron con Natasha y sin cuya inmensa colaboración no podría haber escrito la tesis.

Resumen

Se desarrolló un método de batido – reológico para la caracterización cinética de los mecanismos principales que conllevan a la desestabilización de espumas protéicas (drenaje de líquido, desproporción y colapso). El comportamiento de las espumas se correlacionó con propiedades de la interfase aire – agua, composición y agregación de las proteínas, y características viscosas de la fase continua.

El agregado de un polisacárido no gelificante, goma xántica, presentó un efecto espesante y adicionalmente, aumentó el grado de agregación de las fracciones proteicas en solución y en la interfase aire – agua, e incrementó la presencia del polipéptido B en el film interfacial de la proteína desnaturalizada térmicamente, debido a una limitada compatibilidad termodinámica entre la proteína y el polisacárido a pH neutro. La goma participaría además en la interfase, por interacción electrostática con la proteína adsorbida, dominando la reología de la misma y contribuyendo ulteriormente a la estabilización de las espumas. La desnaturalización presentó efectos contrapuestos en los diferentes mecanismos de desestabilización de espumas.

En presencia de un polisacárido gelificante, κ -carragenano ($KC \geq 0,3\%p/p$), las espumas gelificaron y la fase continua gelificada (KC conteniendo proteína de soja no adsorbida) fue determinante en la estabilidad de las espumas. La desnaturalización de la proteína de soja potenció efectos sinérgicos posibilitando una mayor velocidad de gelificación del KC , una mayor temperatura de fusión de los geles y un aumento de la histéresis entre la temperatura de gelificación y de fusión, aumentando la estabilidad de las espumas.

Palabras clave: *proteínas de soja, espumas, interacciones proteína – polisacárido, goma xántica, κ -carragenano.*

Abstract

A whipping – rheological method was developed for the study of the main kinetic mechanisms of protein foams destabilisation (drainage, disproportionation and collapse). Foam behaviour was correlated with the interfacial properties, protein composition and aggregation and the continuous phase properties.

Addition of a non-gelling gum, xanthan gum, showed a thickening effect. It also increased protein aggregation in solution and at the water – air interface and increased polypeptide B in the interfacial film of thermally denaturated protein, due to limited thermodynamic compatibility between the protein and the polysaccharide at neutral pH. Also, an electrostatic interaction of the gum with the adsorbed protein, may contribute to foam stability and dominated the interfacial rheology. Denaturation played opposite roles on the different mechanisms of foam destabilisation.

In the presence of a gelling gum, κ -carragenan ($KC \geq 0,3\%p/p$), foams gelled, and the continuous gelled phase (KC and non-adsorbed protein) determined foam stability. Soy protein denaturation increased synergetic effects, allowing greater gelling rates of KC, higher fusion temperatures of the gels and an increase in the histeresis between melting and gelling temperatures that increased foam stability.

Key words: soy proteins, foams, protein – polysaccharide interactions, xanthan gum, κ -carragenan.

Ding Cao

INDICE

INTRODUCCION

1.	Proteínas de soja	1
1.1.	La importancia de la soja en la alimentación	1
1.2.	Aspectos nutricionales	3
1.3.	Estructura y composición del grano de soja	5
1.4.	Caracterización de las proteínas de soja	6
1.5.	Características de la glicinina	8
1.6.	Características de la β -conglucina	10
2.	Desnaturalización de proteínas	11
2.1.	Desnaturalización térmica de proteínas de soja	12
3.	Propiedades de interfase de proteínas	17
3.1.	Conceptos generales de propiedades funcionales	17
3.2.	Aspectos funcionales de las proteínas de soja	19
3.3.	Conceptos generales sobre propiedades interfaciales de proteínas	21
3.4.	Termodinámica de la adsorción de proteínas	22
3.5.	Cinética de adsorción de las proteínas en la interfase	24
3.6.	Propiedades de los films proteicos	26
4.	Espumas estabilizadas por proteínas	30
4.1.	Estructura de espumas	30
4.2.	Formación de espumas	32
4.3.	Estabilidad de espumas	33
4.4.	Métodos para el estudio de la formación y estabilidad de espumas	37
4.5.	Factores que afectan a las propiedades de espumado	39
4.6.	Comportamiento interfacial y propiedades de espumado de las proteínas de soja.....	40
5.	Interacciones proteína - polisacárido	44

5.1. Interacciones físico - químicas y estabilidad de los sistemas	44
5.2. Formación de complejos electrostáticos	46
5.3. Interacciones covalentes proteína - polisacárido	48
5.4. Incompatibilidad termodinámica	48
5.5. Goma xántica	53
5.6. Carragenano κ	56
5.7. Interacciones de proteínas de soja con polisacáridos	60
 OBJETIVOS	 62
 MATERIALES Y METODOS	
 1. Materiales	 63
1.1. Aislados proteicos	63
1.2. Polisacáridos	63
2. Métodos	64
2.1. Preparación de las soluciones de proteína y proteína / polisacárido ...	64
2.2. Determinación de la viscosidad de las soluciones	64
2.3. Determinación de sólidos insolubles	65
2.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	65
2.4.1. Desnaturalización de proteínas	65
2.4.2. Fusión de geles	65
2.5. Hidrofobicidad superficial (aromática)	66
2.6. Determinación de la tensión superficial	67
2.6.1. Método del estalagmómetro de Traube	67
2.6.2. Mediciones dinámicas de la tensión superficial por el método de la placa de Whilhelmy	67
2.7. Viscosidad superficial	67
3. Propiedades de espumado por el método de burbujeo	68

3.1. Capacidad de espumado	70
3.2. Estabilidad de las espumas	71
4. Propiedades de espumado por el método de batido	72
4.1. Capacidad de espumado	72
4.2. Estabilidad de las espumas	72
4.2.1. Método de la pipeta para la determinación de velocidades de drenado	72
4.2.2. Método implementado para la determinación simultánea de velocidades de drenado, desproporción y colapso	73
4.2.3. Estudio de sistemas que gelifican	75
4.3. Determinación de la composición proteica en solución y en la interfase aire - agua por electroforesis en geles de poliacrilamida	75
5. Propiedades de gelificación de κ -carragenano en presencia de proteína de soja	77
5.1. Método para el estudio de la dinámica de gelificación	77
5.2. Análisis de textura de los geles	78
6. Análisis estadístico	78

RESULTADOS

PARTE 1

DESARROLLO DE METODOLOGIAS PARA LA CARACTERIZACION DE LA CINETICA DE DESESTABILIZACION DE ESPUMAS

1.1. Método desarrollado para la determinación simultánea de velocidades de drenado, desproporción y colapso de espumas	79
1.2. Mediciones reológicas	80
1.2.1. Modelo cinético para describir la viscosidad aparente de la espuma en función del tiempo	83

1.2.2. Reproducibilidad del método y de los parámetros del modelo	84
1.3. Modelo matemático para la descripción de las curvas de drenaje de líquido	84
1.4. Parámetros de evaluación del colapso de las espumas	91
1.5. Adaptabilidad de la metodología desarrollada a otras proteínas	95
Conclusiones	97

PARTE 2

PROPIEDADES DE ESPUMADO DE AISLADO DE SOJA NATIVO Y DESNATURALIZADO TÉRMICAMENTE EN UN AMPLIO RANGO DE CONCENTRACIONES

2.1. Caracterización de los aislados proteicos de soja nativo y desnaturalizado	98
2.2. Caracterización de las soluciones y de la interfase	99
2.2.1. Composición de proteínas de soja en solución y en la interfase aire - agua	99
2.2.2. Tensión y presión superficial	105
2.2.3. Viscosidad de las soluciones	110
2.2.4. Viscosidad superficial	112
2.3. Capacidad de espumado	114
2.4. Estabilidad de las espumas	120
2.4.1. Estabilidad al drenado	120
2.4.2. Estabilidad de las espumas según el método reológico	129
2.4.3. Estabilidad al colapso	136
Conclusiones	137

PARTE 3

INTERACCIONES PROTEÍNA DE SOJA - GOMA NO GELIFICANTE (XÁNTICA) EN LA FORMACIÓN Y ESTABILIDAD DE ESPUMAS

3.1. Características de las soluciones proteína - goma xántica y de la interfase	139
3.1.1. Composición de proteínas de soja en solución y en la interfase aire - agua	139
3.1.2. Tensión y presión superficial	144
3.1.3. Viscosidad de las soluciones	148
3.1.4. Viscosidad superficial	151
3.2. Capacidad de espumado	157
3.2.1. Método de batido	157
3.2.2. Método de burbujeo	158
3.2.3. Correlación entre ambos métodos	161
3.3. Estabilidad de las espumas	162
3.3.1. Estabilidad al drenaje gravitacional de líquido	162
3.3.2. Estabilidad de las espumas según el estudio de su comportamiento reológico	166
3.3.3. Estabilidad de las espumas según el método de burbujeo	170
3.3.4. Estabilidad al colapso	174
Conclusiones	179

PARTE 4

INTERACCIONES PROTEÍNA DE SOJA - GOMA GELIFICANTE (κ -CARRAGENANO) EN LA FORMACIÓN Y ESTABILIDAD DE ESPUMAS

4.1. Características de las soluciones proteína - κ -carragenano	180
4.1.1. Tensión superficial	182
4.1.2. Viscosidad de las soluciones	183
4.1.3. Viscosidad superficial	184
4.2. Capacidad de espumado	185
4.3. Estabilidad de las espumas	187
4.3.1. Condiciones no gelificantes	187
4.3.2. Condiciones gelificantes	188
4.4. Comparación del comportamiento de espumas previamente gelificadas y sin gelificar durante el almacenamiento a distintas temperaturas	199
Conclusiones	207
 CONCLUSIONES GENERALES	 209
 BIBLIOGRAFIA	 212

INTRODUCCION

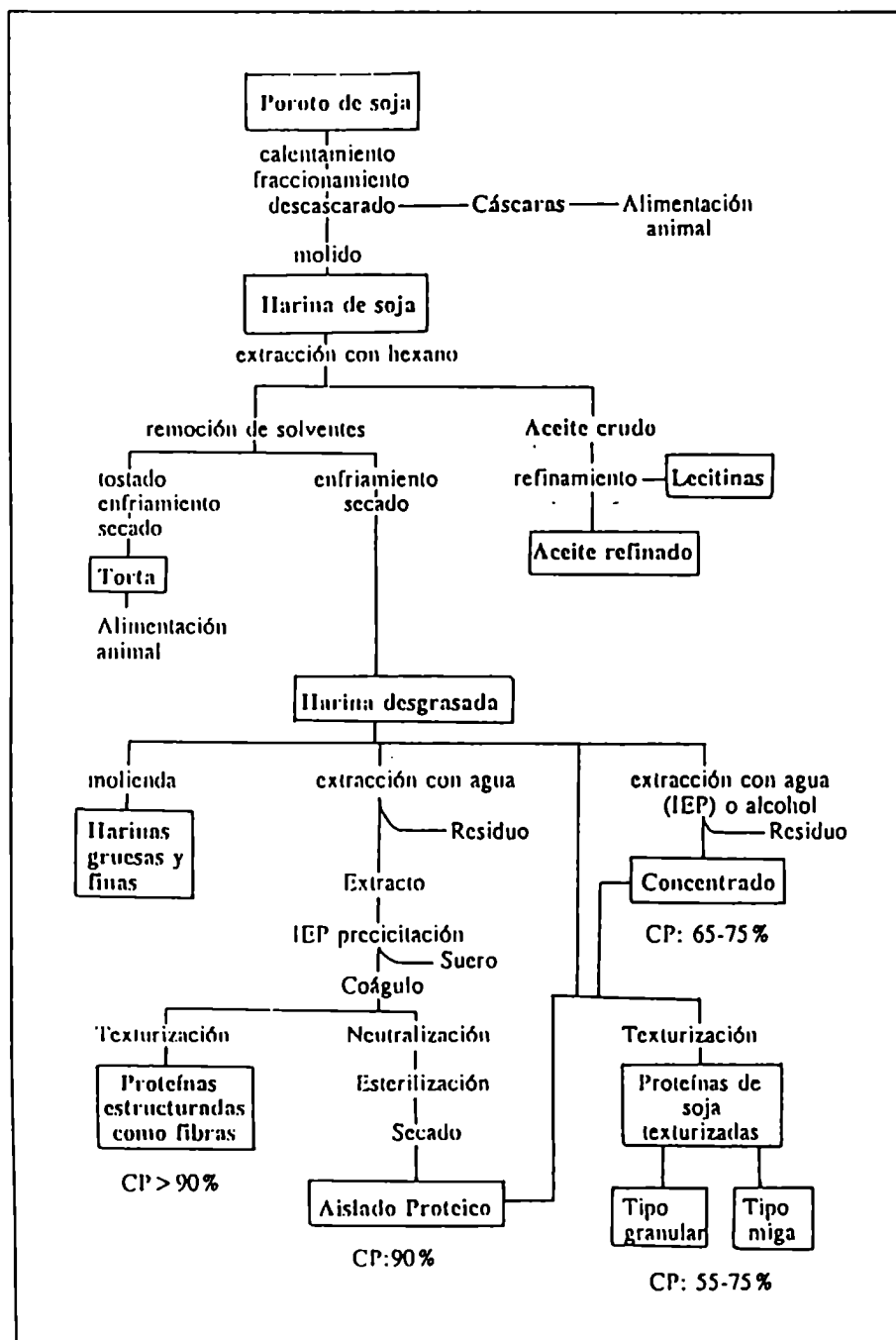
1. Proteínas de soja

1.1. *La importancia de la soja en la alimentación*

La soja (*Glycine max*) ha sido parte de la dieta humana por más de 5.000 años. Los primeros cultivos documentados de soja datan del año 2.800 A.C., cuando el emperador chino Shang-Nung empezó a promover la agricultura de la misma en su reino. Desde entonces, numerosos alimentos fueron desarrollados sobre la base de la soja: salsa de soja, "miso" (pasta fermentada de soja), "natto" (porotos de soja fermentados), "tempeh" (porotos de soja fermentados y fritos), "sufu" (coágulo de proteínas de soja fermentadas), "kinako" (harina de soja tostada), leche de soja, "tofu" (coágulo de proteínas de soja), "abura-age" (coágulo de proteínas de soja frito), "yuba" (película de proteínas de soja hecha a partir de leche de soja), etc. En los países orientales, estos productos han desempeñado un importante rol desde el punto de vista nutricional como fuente de proteínas en la dieta (Fukushima, 1991).

A principios de este siglo, la soja comenzó a cultivarse en occidente principalmente para la obtención de aceite y, las harinas desgrasadas obtenidas como sub-productos, fueron destinadas para el consumo animal. La escasez de comestibles durante la Segunda Guerra Mundial, el incremento en los precios de las proteínas de origen animal y la alta calidad nutricional y funcional de las proteínas de soja, estimularon el interés por el aprovechamiento de las mismas como una fuente proteica para consumo humano.

Distintos tipos de productos proteicos derivados de la soja están disponibles comercialmente. Los métodos de preparación y procesado de dichos productos afectan a la composición y las propiedades funcionales de los componentes proteicos. A partir de la soja molida y desgrasada se obtienen concentrados (~70% de proteína) y aislados protéicos (~90% de proteína) (ver Esquema 1). Estos productos pueden obtenerse con distinto tipo de textura: polvos, fibras, granulados, texturizados.



Esquema 1: Procesamiento del poroto de soja. IEP, punto isoeléctrico; CP, contenido proteico (Petrucelli, 1993).

En los últimos años el cultivo de la soja en la Argentina se incrementó en forma vertiginosa, siendo la producción alcanzada de aproximadamente

150.000.000 toneladas anuales, lo cual la convierte en el segundo cultivo del país, después del trigo. Su utilización principal es la elaboración de aceite (aceite refinado, hidrogenado, lecitinas y demás productos derivados, representando aproximadamente el 45% de los aceites vegetales elaborados), la producción de alimento balanceado para consumo animal (a partir de expeller tostado y de harinas enteras o desgrasadas) y la producción de leche de soja.

Las proteínas de soja también se aplican en productos no alimentarios como adhesivos (especialmente para maderas), papeles revestidos, plásticos y fibras textiles (Hettiarachchy y Kalapathy, 1997), espumas de poliuretano (Lin y col., 1996), biosensores de membrana para determinación de urea (García y col., 1997), entre otros. Pueden utilizarse también, para la producción de embalajes biodegradables y renovables y para la formación de recubrimientos comestibles (Cuq y col., 1998; Shih, 1998) dependiendo las características de estos últimos de las interacciones de la proteína con los plastificantes y los agentes de entrecruzamiento.

1.2. Aspectos nutricionales

El principal problema con el que se encuentran los países subdesarrollados o en desarrollo es la malnutrición proteínico - energética. En la Argentina, tradicionalmente la población posee como fuentes proteicas aquellas de origen animal (carne y derivados, leche y productos lácteos, huevos y pescado). Motivos económicos, cuestiones de salud o metabólicas, o razones culturales, provocan que se busquen fuentes nutritivas alternativas. Muchas proteínas de origen vegetal (cereales, leguminosas y oleaginosas) contienen proteínas de baja calidad, por la deficiencia de aminoácidos esenciales. Los aislados proteicos de soja proveen una fuente proteica completa y de alta calidad, digestibilidad y disponibilidad, que cumple o excede los requerimientos de aminoácidos esenciales para niños y adultos definidos por FAO/WHO/UNU (Food and Agricultural Organization /

World Health Organization and United Nations University) (report FAO / WHO,1990). La metionina y la cisteína son los aminoácidos limitantes, pero puede mejorarse su valor nutricional en alimentos formulados sobre la base de cereales dado que se suplementan las deficiencias de cada uno en aminoácidos esenciales. En los últimos años, se han desarrollado avances en ingeniería genética con estrategias para incrementar el contenido de metionina en leguminosas (Lumen, 1990).

La soja contiene un número importante de componentes cuya presencia puede reducir el valor nutricional de las proteínas; estas sustancias pueden dividirse en dos grupos:

a) antinutrientes termolábiles: inhibidor de tripsina (impide la digestión proteica a nivel intestinal), hemaglutininas o lectinas (provocan la aglutinación de glóbulos rojos en la sangre), goitrógenos (impiden la asimilación de yodo), antivitaminas D, E, B₁₂ y fitatos (complejan metales como calcio, hierro, magnesio, etc. disminuyendo la asimilación intestinal). Estos factores antinutricionales, debido a su labilidad al calor, son destruidos o inactivados con tratamientos térmicos controlados.

b) antinutrientes termoestables: saponinas, isoflavonas (estrógenos) (provocan astrigencia), oligosacáridos (producen flatulencia) y alérgenos. Para eliminarlos deben aplicarse adecuadas técnicas de refinación.

El procesamiento de los alimentos (por ejemplo tratamientos térmicos excesivos) puede ocasionar una disminución de la digestibilidad, destrucción de aminoácidos esenciales y formación de isopéptidos (que resultan tóxicos para el organismo).

Estudios con humanos han demostrado los beneficios del uso de proteínas de soja en las dietas para prevenir la elevación de los niveles de colesterol en sangre y el desarrollo de enfermedades cardíacas (Henley, 1993) y el efecto regulador que estas tienen sobre receptores lipoproteicos de baja densidad en el hígado (Lovati y col., 1998).

La mayor producción de proteína/hectárea a menores costos y la alta calidad proteica de las proteínas de soja permiten que su empleo sea una excelente alternativa alimentaria para la población humana. Los factores que limitan su uso pueden ser tecnológicos, culturales, reglamentaciones legales y económicos (Pomeranz, 1985).

1.3. Estructura y composición del grano de soja

El poroto de soja tiene tres partes estructurales principales: a) la cáscara o envoltura ($\cong 8\%$ del grano), que contiene aproximadamente un 86% de fibra dietaria compuesta por celulosa, lignina, hemicelulosa y pectinas; b) los cotiledones ($\cong 90\%$ del grano), formados por células alargadas llenas de cuerpos proteicos (son esféricos, de diámetro 2-10 μm , resisten la molienda moderada del grano, pueden aislarse por solubilización y contienen las proteínas de reserva del grano), estos se hallan rodeados por esferosomas (esféricos, diámetro 0,1-0,5 μm , contienen aceite compuesto mayoritariamente por triglicéridos y en menor proporción fosfolípidos) y c) el hipocotiledón ($\cong 2\%$ del grano) (Wolf, 1972; Nielsen, 1985a; Cheftel y col. 1989).

Aproximadamente el 60% de los ácidos grasos son insaturados, lo cual es importante nutricionalmente, pero se oxidan fácilmente, pudiendo provocar problemas de "off-flavor" durante el procesamiento. Los hidratos de carbono son principalmente polisacáridos y fibra no digerible (hemicelulosa y celulosas), no observándose la presencia de almidón. Los α -galactósidos no reductores como estaquiosa y rafinosa son responsables de la flatulencia. Otros componentes menores del grano de soja son: vitaminas, minerales (hierro, zinc, cobre, calcio) y componentes con diversa actividad biológica como el ácido fítico y compuestos fenólicos (taninos, ácido fenólico, isoflavonas y saponinas).

El contenido y la composición de proteínas, hidratos de carbono, lípidos y de minerales de las diferentes especies de soja, depende de factores genéticos,

ambientales y de condiciones de cultivo y crecimiento (temperatura, humedad, características del suelo como acidez y nivel de fósforo, etc.).

1.4. Caracterización de las proteínas de soja

La soja es una leguminosa de alto contenido proteico, generalmente entre un 30 - 45%, llegando algunas especies poco adaptadas a un 55% (Nielsen, 1985a). Las proteínas pueden dividirse basándose en su función biológica en:

a) proteínas de reserva: son las proteínas mayoritarias en el poroto maduro y actúan como fuente de carbono y nitrógeno en el desarrollo y el crecimiento de la planta posterior a la germinación; se caracterizan por ser escasas en número y por poseer alto peso molecular (mayor que 100 kDa). Se localizan en los cuerpos proteicos y se hidrolizan durante la germinación. Las más importantes son las globulinas: glicinina (11S), β - y γ - conglucina (7S) (Wagner, 1994).

b) proteínas metabólicas, son proteínas estructurales y de desarrollo, enzimas e inhibidores enzimáticos: citocromo C, β -amilasas, lipoxigenasas, lectinas, hemaglutininas, inhibidores de tripsina (son de dos tipos, Kunitz, PM 21.000 y Bowman - Birk, PM 8.000 y pueden ser removidos por calor o durante la germinación), β -glucosidasas, fosfatasas. Poseen bajo peso molecular y son elevadas en número. Algunas variedades de soja poseen abundantes proteasas que actúan sobre las proteínas de reserva.

La variación del pH tiene un efecto pronunciado sobre la solubilidad de las proteínas de soja. Las globulinas de reserva son insolubles en medio acuoso en la zona situada en torno al pI del conjunto proteico (pH 4,2 - 4,6), pudiéndose incrementar la solubilidad con agregado de NaCl. La separación de las globulinas de soja, puede realizarse por solubilización en agua y posterior precipitación a pH 4,5 - 4,8 donde las proteínas del suero (biológicamente activas) quedan contenidas en el sobrenadante (Fukushima, 1991).

El extracto acuoso a pH 7-8 de proteínas de soja, puede ser fraccionado por distintos métodos: cromatografía de exclusión molecular, precipitación fraccionada (isoelectrica, crioprecipitación, con sulfato de amonio, con solventes orgánicos), extracción fraccionada, ultracentrifugación y métodos inmunológicos, entre otros. En base a los coeficientes de sedimentación, se encuentran 4 fracciones mayoritarias 2S, 7S, 11S y 15S siendo cada fracción una mezcla compleja de proteínas (Wolf, 1972). Por inmunoelectroforesis (Catsimpoolas y col., 1969) se clasifican en glicinina, α -conglucina, β -conglucina y γ -conglucina (Tabla 1).

Tabla 1: Cantidades aproximadas y componentes de las fracciones obtenidas por ultracentrifugación de las proteínas de soja extraídas en agua (Wolf, 1970 y Fukushima, 1991)

Fracción	Proteína Total (%)	Componentes	Peso molecular (Da)
2S	~22	Inhibidores de tripsina Citocromo C Globulina: α -conglucina	8000; 21500 12000 18000 - 33000
7S	~37 (~ 90% globuli- nas)	Hemaglutininas, Lipoxigenasas, β -Amilasas Globulinas: 7S básica γ - conglucina β - conglucina	110000; 102000 61700 168000 105000 - 150000 180000 - 210000
11S	~31	Globulina: glicinina	300000 - 350000
15S	~11	Dímeros de glicinina	~600000

Con el fin de caracterizar y estudiar las globulinas mayoritarias, se han desarrollado numerosos métodos para separarlas y purificarlas: cromatografía de exclusión molecular con ConA-Sepharose 4B y Sepharose 6B (Yamagishi y col., 1980), precipitación con ácido clorhídrico y Tris (trihidroximetilaminometano) a

pH 6,4 – 6,6 (11S) y a pH 4,8 (7S) (Thanh y Shibasaki, 1976a), afinidad de proteínas para formar quelatos metálicos, cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC).

La globulina 7S (básica) es una glicoproteína rica en grupos sulfhidrilos (PM 168 kDa), está compuesta por 4 subunidades de polipéptidos de alto (26 kDa) y bajo (17,0–18 kDa) peso molecular y presenta un punto isoeléctrico alcalino (pH 9,05 – 9,26) (Utsumi y col., 1997). Es soluble en sales y co-purifica con la glicinina, siendo las interacciones entre ambas proteínas principalmente hidrofóbicas y de intercambio SH/SS (Sathe, 1991).

La α -Conglicinina (2S) es una proteína monomérica (PM 21 kDa, pI: 4,5) y representa aproximadamente el 13,8% de las globulinas de soja (García y col., 1997).

La γ -conglucina es una glicoproteína (contenido de carbohidratos de ~5%) trimérica (PM 170 kDa), compuesta por tres subunidades idénticas y presenta propiedades de serológicas y secuencia aminoacídica N-terminal diferentes a las demás globulinas. No presenta asociación – disociación por variaciones de la fuerza iónica del medio (Utsumi y col., 1997).

1.5. Características de la glicinina

La glicinina es una proteína globular oligomérica y compacta, presenta un peso molecular (PM) entre 300-380 kDa y un punto isoeléctrico (pI) 6,4 (Thanh y Shibasaki, 1976a). Existen dos modelos propuestos para representar la estructura cuaternaria de la glicinina basados en una molécula hexamérica dividida en dos trímeros: uno de dos hexágonos paralelos (Badley y col., 1975) y otro de antiprismas trigonales (Plietz y col., 1983). En el modelo de Badley y col., la molécula nativa tendría forma de cilindro oblato hueco, donde algunas subunidades no serían esféricas, resultando en un bloqueo parcial del agujero central; los hexágonos estarían unidos por uniones electrostáticas y enlaces de

hidrógeno, mientras que las uniones predominantes en la estructura trimérica serían hidrofóbicas.

Cada una de las 6 subunidades (no idénticas), está compuesta por un polipéptido ácido "A" (PM 34,8-45 kDa, pI 4,75-5,40) y un polipéptido básico "B" (PM 19,6-22 kDa, pI 8,05-8,5) (Hermansson, 1986), ambos son sintetizados por un mismo precursor que sufre una modificación post-translacional, quedando unidos por una unión disulfuro. Los polipéptidos presentan polimorfismos, siendo sintetizados por familias de genes homólogos (Moreira y col., 1979), asociándose en forma no azarosa. Se han purificado y caracterizado 5 subunidades principales, clasificándose en dos grupos según la homología de la secuencia de aminoácidos: Grupo I (PM ~ 58 kDa): A_{1a}B₂, A_{1b}B_{1b}, A₂B_{1a} y grupo II (PM ~ 62-69 kDa): A₃B₄, A₅A₄B₃ (Nielsen, 1985b). El contenido de residuos de cisteína (Cis) y metionina (Met) es mayor en el grupo I (Cis: 8 y Met: 5-7) que en el grupo II (Cis: 6 y Met: 2-4), formándose varios enlaces disulfuro, de los cuales uno sólo está involucrado en la unión de los polipéptidos A y B (a excepción del polipéptido A₄ que se encuentra en forma libre), y encontrándose también sulfhidrilos libres (Utsumi y col., 1997). El polimorfismo en la composición de las subunidades también se presenta en distintos cultivares, exhibiendo diferencias en las propiedades funcionales y nutricionales.

La estructura secundaria de la glicinina en solución acuosa está conformada por 3% de zonas de α -hélices, 48% de hojas plegadas β (β -sheet) y 49% de estructura desordenada o curvaturas β (β -turns) (Subirade y col., 1998).

La estructura cuaternaria presenta reacciones de asociación - disociación, dependiendo de las condiciones del medio (pH, fuerza iónica " μ ", temperatura, etc.) (Hermansson, 1986). La glicinina (11S) se disocia a bajas μ (< 0,01M) y pH neutro a formas 2S-3S (probablemente subunidades) y 7S (trímeros), mientras que a altas μ (> 0,1-0,2M) se asocia parcial y reversiblemente a forma 15S y 19S (posiblemente dímeros y trímeros, unidos vía -S-S-) (Brook y Morr, 1985; Wolf, 1993; Utsumi y col., 1997). También se han encontrado en el estado nativo

polipéptidos A y B no unidos por enlace disulfuro (Wolf, 1993; Wang y Damodaran, 1990).

1.6. Características de la β -conglycinina

La β -conglycinina es una glicoproteína globular trimérica (PM 150-200 kDa) que aparenta un disco plano. Está compuesta por la combinación de subunidades con secuencias aminoacídicas similares, tres mayoritarias: α (PM 57 - 72 kDa, pI 4,9), α' (PM 57 - 68 kDa, pI 5,2) y β (PM 42 - 52 kDa, pI 5,7-6,0) (Hermansson, 1986; Yamauchi y col., 1991) y una subunidad minoritaria y similar en tamaño a la subunidad β (Utsumi y col., 1997). La molécula de β -conglycinina presenta heterogeneidad, encontrándose siete tipos diferentes de oligómeros: B₁ ($\alpha'\beta_2$), B₂ ($\alpha\beta_2$), B₃ ($\alpha\alpha'\beta$), B₄ ($\alpha_2\beta$), B₅ ($\alpha_2\alpha'$), B₆ (α_3) (Thanh y Shibasaki, 1978) y B₀ (β_3) (Yamauchi y col., 1981). El contenido de triptófano (α' : 2, α : 1, β : 0 residuos) y aminoácidos sulfurados (Cis: α' : 1, α : 1, β : 0, Met: α' : 4, α : 1, β : 0) es muy bajo y no se forman uniones disulfuro entre las subunidades, siendo las interacciones principalmente hidrofóbicas y puente hidrógeno (Thanh y Shibasaki, 1976b).

El contenido de carbohidratos es de aproximadamente el 5% y consisten en una (en β) o dos (en α y α') cadenas de (glucosa - N-acetil-glucosamina)₂ - manosa_{7,8,9} unidas a residuos de asparagina (Utsumi y col., 1997). Las subunidades α y α' presentan mayor carácter hidrofílico debido a la mayor glicosilación y a la inserción de un dominio hidrofílico α -hélice que no está presente en la subunidad β y que les confiere un mayor peso molecular.

La β -conglycinina exhibe comportamiento de asociación - disociación dependiendo del pH y de la fuerza iónica del medio. La estructura trimérica (7S) es estable a pH neutro y alta fuerza iónica ($\mu > 0,5M$) o a pH ácido (pH < 4,8) y dimeriza (excepto los oligómeros B₀ y B₆) a baja fuerza iónica ($7S \mu = 0,5M \leftrightarrow 9S \mu = 0,1M$). (Brook y Morr, 1985). A fuerzas iónicas aún menores ($\mu < 0,01M$) o en medio

ácido o alcalino y a $\mu=0,5M$, las subunidades α y α' se disocian del protómero (Thanh y Shibasaki, 1979; Iwabuchi y col., 1991).

La estructura secundaria de la β -conglucina contiene 14,5% de α -hélices, 24,5% de hojas plegadas β , 27,5% de curvaturas β y 33,5% de estructura desordenada (Nagano y col., 1995).

La glicina y la β -conglucina presentan considerable homología en las secuencias genéticas, compartiendo características estructurales y relacionándose probablemente con un mismo gen ancestral. La principal diferencia entre ellas es la inserción de una región hipervariable en la glicina, de naturaleza ácida (con alto contenido de aspartato y glutamato). Las moléculas están compuestas por tres dominios primarios. El COOH- terminal incluye la mitad de cada molécula, es la región más conservada, contiene hojas plegadas y curvaturas β y es altamente hidrofóbica, localizándose en el interior de la molécula y tiene una función importante en el mantenimiento de la estructura. El dominio central contiene una mezcla de α hélices, curvaturas y hojas β (en este dominio estaría incluido el inserto de hélice de la 11S, aumentando su tamaño) y el dominio NH₂-terminal que varía mucho entre ambas globulinas, contiene α hélices y curvaturas β y estaría localizado en el exterior de la molécula (Nielsen, 1985b).

2. Desnaturalización de proteínas

El cambio de la conformación nativa a otro estado conformacional requiere la aplicación de energía, que puede ser provista de diferentes formas, por ejemplo calor, luz, sonido, presión, tratamientos mecánicos, etc. En este sentido, la desnaturalización puede considerarse un proceso físico, aún cuando agentes químicos como urea, ácidos, metales, álcalis, solventes orgánicos u otros reactivos, pueden producir cambios físicos en las moléculas y afectar las interacciones entre moléculas. La desnaturalización puede definirse como un cambio en la estructura secundaria, terciaria y/o cuaternaria, sin involucrar rupturas en las uniones de las

cadenas polipeptídicas que conforman la estructura primaria (Kilara y Sharkasi, 1986). Durante este proceso, las proteínas pueden perder su actividad biológica y grupos funcionales que estaban en el interior de la molécula son expuestos, permitiendo nuevas interacciones inter e intra moleculares.

La estructura nativa de una proteína es una estructura tridimensional resultante del balance entre fuerzas atractivas y repulsivas. La estabilidad conformacional que le permite mantener su estructura, está caracterizada por la diferencia de energía libre (ΔG) con respecto al estado desnaturalizado, a la cual contribuyen todas las interacciones del sistema: $\Delta G = \Delta G_{\phi} + \Delta G_q + \Delta G_{VH} + \Delta G_H$ (interacciones hidrofóbicas ΔG_{ϕ} , electrostáticas ΔG_q , Van der Waals ΔG_{VH} e ΔG_H hidrógeno), internas o entre la proteína y el solvente. Durante la transición conformacional, el cambio de energía libre está relacionado con una variación entrópica (ΔS) y entálpica (ΔH) del sistema: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, donde T es la temperatura absoluta del sistema. Para muchas proteínas globulares, el cambio de ΔG entre la estructura plegada y la desplegada se ha estimado en 20-60 kJ/mol, indicando que la estructura nativa es levemente más estable que la desnaturalizada (Relkin, 1996).

El estado nativo de una proteína globular no está claramente definido, pudiendo la misma existir en diversas formas de baja entropía, pero energéticamente equivalentes, estados cuasi - nativos, que no involucran cambios apreciables en la estructura. El tratamiento térmico en agua u solventes incrementa la movilidad, ocasionando la ruptura de uniones intra e inter moleculares que estabilizan la estructura nativa (Boye y col., 1997).

2.1 Desnaturalización térmica de proteínas de soja

Siendo el aislado proteico de soja una mezcla de proteínas de estructura compleja, conteniendo diversas subunidades y con alta heterogeneidad, la desnaturalización de las proteínas del mismo es un proceso complejo.

Se han aplicado distintos métodos para el estudio de la desnaturalización de las proteínas de soja: i) calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Hermansson, 1978) ii) solubilidad, iii) espectroscopía ultravioleta, visible, de fluorescencia para determinaciones de cambios conformacionales vinculados con la exposición de distintos grupos aminoacídicos (Yamagishi y col., 1981a y 1982), determinaciones de turbidez por formación de agregados (Hashizume y col., 1979); iv) polarización; v) métodos electroforéticos y de inmunoensayos (Yamagishi y col., 1980 y 1981b; lwabuchi y col., 1981a y 1981b; vi) uso de compuestos colorantes aumentando la interacción entre las proteínas y el colorante al incrementarse progresivamente la exposición de grupos hidrófobos (Lin y Lakin, 1990), vii) espectroscopía infrarroja (FTIR: fourier transform infrared) y propiedades ópticas de rotación y dispersión por dicroísmo circular (CD) donde se observan cambios conformacionales en la estructura secundaria (Nagano y col., 1995; Subirade y col., 1998).

En los termogramas y análisis cinéticos realizados por DSC se observan principalmente dos transiciones endotérmicas correspondientes a la desnaturalización, que se comporta como una reacción de primer orden: una correspondiente a la β -conglucina (T = 76,0°C en agua destilada; Ea=52,4 kcal/mol) y otra a la glicina (T = 91,0°C en agua destilada; Ea=106,6 kcal/mol.) siendo dichas temperaturas afectadas por la concentración de sales, que estabilizan la estructura cuaternaria, y el pH (al acercarse al pI la interacción con el solvente disminuye aumentando la temperatura de desnaturalización) (Hermansson, 1978; Wagner, 1994). La gran diferencia entre la temperatura de desnaturalización de ambas proteínas, se ha aprovechado para aislar la globulina 11S exitosamente (Bikbov y col., 1986).

Durante el calentamiento pueden ocurrir procesos de disociación y ruptura de la estructura cuaternaria y también asociación / agregación, dependiendo de la concentración proteica. La disociación en subunidades o polipéptidos, y el desdoblamiento molecular, pueden resultar en la exposición de grupos capaces de formar uniones hidrofóbicas. Durante el calentamiento ocurren intercambios

sulfhidrilo-disulfuro, uniones hidrógeno, uniones hidrofóbicas e interacciones iónicas, resultando en la aparición de nuevas interacciones inter e intramoleculares (Catsimpoolas y Meyer, 1970; German y col., 1982).

El calentamiento de una solución diluida de β -conglucina a pH neutro y baja fuerza iónica, produce la disociación de las subunidades sin agregación. Las subunidades presentan varias conformaciones desnaturalizadas, dependiendo de la temperatura, y se repliegan parcialmente al enfriarse la solución (Iwabuchi y col., 1991a; Nagano y col., 1995), siendo la disociación irreversible y el desplegamiento parcialmente reversible (Iwabuchi y col., 1991b). La proteína mantiene reactividad antigénica parcial, pues los determinantes antigénicos están presentes en cada subunidad y dependen de la conformación (Iwabuchi y col., 1981a). A altas fuerzas iónicas o menores pH, la reducción en la carga neta de la superficie de las subunidades disociadas, promueve la agregación irreversible, por uniones hidrofóbicas (Iwabuchi y col., 1991b). A altas concentraciones proteicas (12% en agua destilada) el tratamiento térmico produce la gelificación (Hermansson, 1986).

La globulina 11S se disocia en subunidades a temperaturas cercanas a 80°C, desdoblándose y rompiéndose luego la unión disulfuro entre los polipéptidos A y B a temperaturas mayores (Hashizume y col., 1979). La reactividad antigénica se pierde al romperse las subunidades (Iwabuchi y col., 1981b).

La glicina nativa presenta una conformación globular rígida, estabilizada por uniones -SS- intracatenarios (Wolf, 1993). A pH neutro, el pH es cercano al pI del polipéptido B, disminuyendo la distancia entre los polipéptidos y sobrepasando las interacciones hidrofóbicas a las repulsiones electrostáticas. Los polipéptidos B se enlazan por intercambio de S-S/SH, formándose un oligómero (agregado) a partir de un mismo hexágono y permaneciendo soluble debido a la presencia de los polipéptidos ácidos (A) cargados negativamente. Los polipéptidos A se liberan por cambio de uniones disulfuro, quedando en solución (por repulsiones electrostáticas) y los oligómeros de los polipéptidos B precipitan

(debido a las interacciones hidrofóbicas) (Utsumi y col., 1984a). Si previa a la liberación de los polipéptidos ácidos, se forman polímeros (entre distintos hexágonos) de masa molar elevada, los mismos pueden luego agregarse y precipitar, o formar una red proteica tridimensional gelificada (a altas concentraciones proteicas), dependiendo de las condiciones experimentales (Mori y col., 1982). La detección de polímeros y oligómeros evidencia el mecanismo de desnaturalización por intercambio de disulfuros entre las subunidades (Yamagishi y col., 1980, 1981 a y 1981 b). La presencia de cantidades moderadas de un agente reductor, facilita los intercambios de uniones disulfuro, favoreciendo las reacciones de disociación y agregación. Una fuerza iónica elevada favorece la agregación de los polipéptidos B, pero estabiliza la estructura de la glicinina, protegiéndola de la disociación de sus subunidades que debe preceder (Hashizume y Watanabe, 1979). Un replegamiento parcial durante el enfriamiento también fue observado en la globulina 11S (Damodaran, 1988).

Durante la desnaturalización de glicinina en presencia de β -conglucina existen reacciones de intercambio por uniones disulfuro entre las subunidades de ambas globulinas. La subunidad β de la β -conglucina y el polipéptido básico B de la glicinina forman macrocomplejos (cuya solubilidad depende de la concentración de ambas proteínas), vía interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (Damodaran y Kinsella, 1982; Utsumi y col., 1984a). La Figura 1 representa esquemáticamente la interacción entre ambas globulinas. Cuando la fuerza iónica es elevada se anulan las interacciones electrostáticas del complejo y los polipéptidos B se agregan y precipitan, permaneciendo parte de las subunidades β solubles (Yamagishi y col., 1983).

Estudios calorimétricos (German y col., 1982) mostraron que la 7S no estabiliza la estructura cuaternaria de la 11S, sino que los polipéptidos B no se agregan por interacción y formación del complejo soluble.

Se observó por FTIR la formación de una banda a 1620 cm^{-1} que estaría correlacionada con la agregación proteica y la formación de hojas plegadas β

unidas por puentes hidrógeno intermoleculares, mostrando que las interacciones producidas por la desnaturalización serían más complejas que uniones simples. La observación de una segunda banda de menor intensidad a 1680 cm^{-1} junto con la banda de 1620 cm^{-1} indicarían también la formación de hojas plegadas β antiparalelas (Nagano y col., 1995; Subirade y col., 1998).

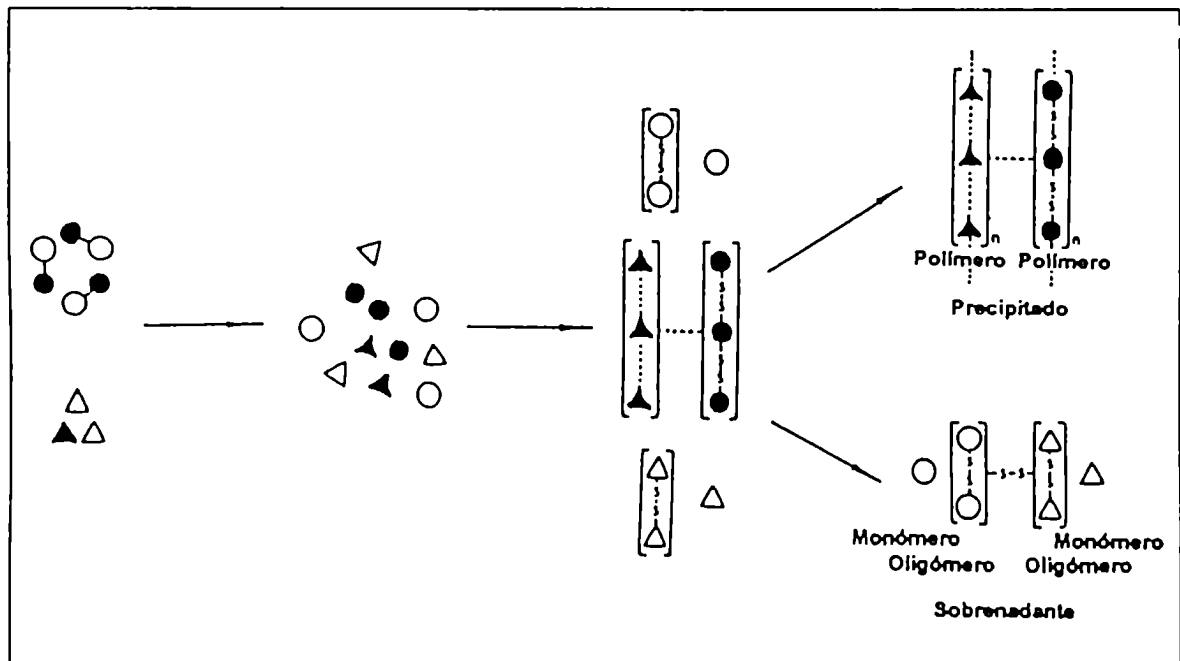


Figura 1: Esquema de las interacciones entre la glicinina y la β -conglicinina durante el tratamiento térmico a bajas concentraciones proteicas. Interacciones no covalentes (----), uniones disulfuro: -S-S-; polipéptido A: O, polipéptido B: ●; subunidad α y α' : Δ ; subunidad β : $\blacktriangle$ (Yamauchi y col., 1991).

A altas concentraciones proteicas, las globulinas se desnaturalizan y se agregan formando redes tridimensionales (geles). Las interacciones moleculares principales en la estabilización de los mismos son uniones hidrógeno, uniones hidrofóbicas y uniones disulfuro. Las tres subunidades de la 7S participan uniformemente en la matriz del gel, mientras que las formas polimórficas del polipéptido A presentan comportamientos distintos. Asimismo, se encontró una interacción preferencial entre la subunidad β de la 7S y el polipéptido B de la 11S (Utsumi y Kinsella, 1984a, 1984b y 1985).

3. Propiedades de interfase de proteínas

3.1. Conceptos generales de propiedades funcionales

Se definen como propiedades funcionales a las propiedades fisico-químicas que afectan al comportamiento de las proteínas en los sistemas alimenticios durante la preparación, el procesado, el almacenamiento y el consumo de los mismos. Estas propiedades no sólo son importantes en la calidad del producto final, sino también durante el procesamiento del mismo (Kinsella, 1979). Las proteínas representan una clase importante de ingredientes funcionales porque poseen un amplio rango de propiedades funcionales (Tabla 2). Adicionalmente, interactúan con otros componentes y mejoran los atributos de calidad de los alimentos. Las propiedades funcionales están vinculadas a las interacciones de las proteínas con el agua, lípidos, hidratos de carbono, hidrocoloides, entre moléculas de la misma proteína entre sí y entre distintas proteínas (Phillips y col., 1994a).

Tabla 2: Propiedades funcionales de proteínas (Phillips y col. 1994a).

Propiedad general	Criterio funcional
Organoléptica	Color, flavor, aroma
Kinestésica	Textura, suavidad, arenosidad, turbidez, palatabilidad
Hidratación	Solubilidad, absorción de agua, viscosidad, retención de agua, humectabilidad, gelificación, sinéresis
Superficial	Emulsificación, espumado, formación de películas
Fijación	Fijación de lípidos, fijación de aromas
Reológica/ Estructural	Elasticidad, cohesividad, dureza, masticabilidad, adhesividad, formación de redes, agregación, formación de masa, texturizabilidad, extrudabilidad

La diversidad de factores que afectan a las propiedades funcionales de una proteína pueden apreciarse en la Tabla 3.

Tabla 3: Algunos factores que influyen en las propiedades funcionales de las proteínas (Kinsella, 1979)

Factores intrínsecos	Factores ambientales - componentes del sistema alimenticio	Procesamiento
Composición y conformación proteica, distribución de cargas	pH, agentes redox, sales, iones, agua, carbohidratos, lípidos, tensioactivos, flavors, temperatura	calentamiento, pH, fuerza iónica, agentes reductores, secado, solventes, condiciones de almacenamiento, modificaciones físicas, enzimáticas y químicas.

Un alimento está constituido por una gran diversidad de componentes. La funcionalidad asociada con cierta proteína no necesariamente reflejará las propiedades del sistema alimenticio. Para el desarrollo de un nuevo producto donde se implementará el uso de proteínas con determinada funcionalidad, no es suficiente el estudio de las proteínas aisladamente. Se han observado experimentalmente desviaciones significativas entre las propiedades de mezclas y las calculadas asumiendo adición lineal de las propiedades individuales de los ingredientes (Arteaga y col., 1993a y 1993b). Se pueden definir entonces tres niveles distintos de evaluación de la funcionalidad de una proteína: i) en sistemas modelo, donde se utilizan pequeñas cantidades de muestra, se puede realizar una evaluación rápida comparativa y permite comparar proteínas de distinto origen o distintas tecnologías de obtención. ii) en sistemas reales donde se formula el alimento: se requieren mayores cantidades, permite evaluar la contribución funcional real de la proteína o "performance", a través de las cualidades

organolépticas y de textura del producto final. Es indispensable en etapas de optimización y definición de la tecnología industrial de producción. iii) análisis a nivel molecular: se estudia la estructura molecular, tipos de enlace, características eléctricas, características térmicas, etc. Permite conocer las causas moleculares de la funcionalidad lo cual permite el avance en el diseño de proteínas de características específicas.

Las características funcionales pueden modificarse por métodos físicos, químicos, enzimáticos y por ingeniería genética. El diseño por ingeniería genética, de proteínas vegetales con atributos funcionales específicos sin efectos adversos en el desarrollo biológico normal de las semillas, requiere de conocimientos de las bases moleculares de las propiedades funcionales y de las características críticas de las estructuras proteicas. El modelado por computadora de las relaciones de estructura y función en proteínas, es cada vez más usado para el diseño racional de proteínas con funciones específicas (Lumen, 1990).

Aspectos funcionales de las proteínas de soja

Las proteínas de soja en sus diversas formas tienen variadas propiedades funcionales que las hacen adecuadas para ser utilizadas en diversos alimentos. Algunas de las numerosas aplicaciones pueden apreciarse en la Tabla 4.

Las propiedades funcionales de las proteínas de soja pueden alterarse por las condiciones de cosecha (diferencias entre granos sanos, dañados mecánicamente y dañados por acción fúngica fueron encontradas por Genovese y Lajolo, 1993) y por las condiciones de procesamiento en la preparación de los aislados proteicos (molido, secado, tratamientos térmicos, pH, concentración de sólidos) (González y col., 1995). Asimismo, fueron encontradas diferencias significativas en las características funcionales (solubilidad, emulsificación y gelificación) de aislados proteicos obtenidos en distintos estados de maduración del grano de soja (Yao y col., 1990) debido a las variaciones en los porcentajes de las fracciones en el tiempo: 7S (aumentó) y 11S (disminuyó).

Tabla 4: Propiedades funcionales de productos proteicos de soja en alimentos (basado en Kinsella, 1979).

Propiedad funcional	Modo de acción	Sistema alimentario	Forma de uso ^a
Solubilidad	Solvatación de proteínas, depende del pH	Bebidas	F,C,A,H
Absorción y retención de agua	Unión puente hidrógeno, retención de agua	Productos cárnicos, salsas, panes y tortas	F,C
Viscosidad	Absorción de agua y solubilización	Sopas, salsas de carne	F,C,A
Gelación	Formación de una matriz proteica	Carnes, yogurth, quesos	C,A
Adhesión-Cohesión	la proteína actúa como material adhesivo	Productos cárnicos, de panadería, salsas, pastas	F,C,A
Elasticidad	Uniones disulfuro en geles deformables	Productos cárnicos y de panadería	A
Emulsificación	Formación y estabilización de interfases aire / agua y	Salsas, sopas, tortas	F,C,A
Espumado	aire / aceite.	Coberturas y refrescos batidos, tortas	A,H,S
Absorción de grasa	Unión de grasa libre	Carnes, salsas, buñuelos	F,C,A
Flavor	Adsorción, retención y liberación de aromas	Simulación de carnes, panadería	C,A,H
Control de color	Blanqueado por lipoxigenasa	Panes	F

^a denominaciones: F (harina), C (concentrado), A (aislado), H (hidrolizado), S (suero) de soja.

3.3. Conceptos generales sobre propiedades interfaciales de proteínas

Una aplicación importante del comportamiento interfacial de las proteínas es su uso como surfactantes en sistemas alimenticios emulsionados o espumados. Esto es posible porque las proteínas pueden ubicarse en la interfase orientando las zonas no-polares hacia la fase no-polar y las polares hacia la fase polar. El comportamiento de las moléculas de proteína en la interfase es diferente al de moléculas simples y pequeñas de otros surfactantes (Phillips y col., 1994b). Las moléculas de proteínas son anfipáticas, poseen flexibilidad molecular y capacidad de alterar su conformación para reorientarse y presentar asociaciones intermoleculares en la interfase formando películas que la estabilizan ulteriormente. Las propiedades superficiales de las proteínas, generalmente reflejan la facilidad relativa con la cual las proteínas pueden difundir, adsorberse, desplegarse y acomodarse en una superficie o en una interfase (MacRitchie, 1978), siendo numerosos los factores que influyen sobre las mismas (Tabla 5).

Tabla 5: Factores que afectan a las propiedades superficiales e interfaciales de las proteínas (Phillips y col., 1994b).

Intrínsecos de la molécula proteica	Extrínsecos
Composición en aminoácidos (aa)	pH
Relación (aa nopolares)/(aa polares)	Fuerza iónica
Distribución de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos	Concentración proteica
Estructura secundaria, terciaria y cuaternaria	Tiempo
Uniones disulfuro y grupos tioles libres	Temperatura
Tamaño y forma molecular	Aplicación de energía mecánica
Flexibilidad molecular	

3.4. *Termodinámica de la adsorción de proteínas*

En el seno de una solución, las moléculas están rodeadas de otras de su misma especie, y las fuerzas de interacción entre ellas son iguales en todas las orientaciones. Sin embargo, las moléculas en la superficie del líquido (o en una interfase entre dos líquidos inmiscibles) están sujetas a una fuerza neta, porque las fuerzas de atracción ejercidas por las moléculas en el seno de la solución son diferentes a las ejercidas por las de la fase vapor (o la otra fase líquida). El desbalance de fuerzas se traduce en una energía libre de superficie (o interfacial) o energía libre de Gibbs. Como la energía libre de las moléculas en la interfase es mayor que en el seno de la solución, el líquido tiende a contraerse para minimizar la superficie expuesta. Una expansión de dicha superficie (ΔA) de contacto requiere de un trabajo proporcional a dicha expansión (W) según: $W = \gamma \cdot \Delta A$, donde γ es la tensión superficial si la interfase es aire - líquido o la tensión interfacial para interfases líquido/líquido y tiene unidades de [fuerza]/[longitud] (ej.: N/m). Cuanto menor es γ , menor es el trabajo necesario para aumentar la superficie. Debido a su naturaleza anfifílica, las proteínas pueden concentrarse en la superficie formando películas (films) mono o multimoleculares disminuyendo la tensión superficial y generando una presión superficial " π ", que se define como $\pi = \gamma_{\text{solv}} - \gamma_1$ donde γ_{solv} y γ_1 son la tensión superficial del solvente y la solución respectivamente.

La adsorción espontánea de las moléculas anfipáticas en las interfases aire-líquido o líquido - líquido es un fenómeno directamente relacionado con las tensiones interfaciales existentes y dependerá del gradiente del potencial químico $d\mu/d\xi$, donde μ es el potencial químico y ξ es la distancia de la proteína a la interfase. El flujo a la interfase " J ", en ausencia de una fuerza externa, dependerá del gradiente de concentración y del coeficiente fenomenológico " L " (dependiente a su vez de la concentración, del coeficiente de difusión y de la temperatura).

Deben considerarse las distintas contribuciones por las interacciones moleculares (Xu y Damodaran, 1993) según:

$$J_i = L_d \left(\frac{\partial \mu_{id}}{\partial \xi} \right)_T + L_{ele} \left(\frac{\partial \mu_{ele}}{\partial \xi} \right)_T + L_{H\phi} \left(\frac{\partial \mu_{H\phi}}{\partial \xi} \right)_T + L_{hid} \left(\frac{\partial \mu_{hid}}{\partial \xi} \right)_T + L_{conf} \left(\frac{\partial \mu_{conf}}{\partial \xi} \right)_T$$

donde los términos corresponden al potencial ideal (id), electrostático (ele), hidrofóbico (H ϕ), de hidratación (hid) y conformacional (conf) de la proteína, respectivamente. Si la suma de los gradientes de los potenciales químicos es negativa a una dada distancia de la interfase, la proteína fluirá a la misma.

La retención de las proteínas en la interfase está afectada por tres eventos energéticos: i) aumentos entrópicos: a) por remoción de agua ocluida en regiones hidrofóbicas de baja entropía de la superficie de la proteína hacia estados de mayor entropía, resultando en la transferencia de regiones hidrofóbicas hacia la fase no polar, y b) reorganización de la estructura proteica de un estado nativo (menor entropía) a uno desplegado (mayor entropía) ii) las interacciones dipolo- dipolo inducido entre las moléculas de agua de alta energía de la superficie y la porción no-polar (hidrofóbica) del soluto en la interfase aire - agua (que resulta en una disminución parcial de la energía libre de las moléculas de agua superficiales); iii) la energía de interacción entre los grupos polares (hidrofílicos) y las moléculas de agua. Mientras los eventos i) y ii) facilitan positivamente la adsorción del soluto anfifílico, el evento iii) presenta un efecto negativo. Si el cambio neto de energía libre (ΔG) de estos tres factores es negativo y mucho mayor que la energía térmica, kT , entonces la molécula de soluto se adsorberá en la interfase. La adsorción de la proteína en la interfase puede ser un fenómeno reversible, y en el equilibrio, la concentración de la proteína en la interfase está siempre en exceso con respecto a la fase acuosa (Phillips y col. 1994b; Damodaran, 1997).

3.5. Cinética de adsorción de las proteínas en la interfase

Difusión, adsorción y reordenamiento

La adsorción de proteínas globulares generalmente procede por fijación de cantidades variables de segmentos polipeptídicos a la interfase, y en muchos casos, largas porciones de molécula proteica permanecen en la fase acuosa. Las conformaciones que adoptan las proteínas en la interfase, pueden asimilarse al comportamiento de polímeros (Figura 2). Los "trenes" son los segmentos adsorbidos en la interfase; los "bucles", son segmentos de las cadenas que se extienden en la fase líquida, y las "colas", los dos segmentos de los extremos de la cadena polimérica que, por tener menor energía libre de adsorción que otros segmentos, tienden a extenderse en la fase líquida. La distribución de estas partes dependerá de la energía libre de adsorción de los segmentos de la molécula polimérica y de la flexibilidad de las cadenas (Kim, 1985).

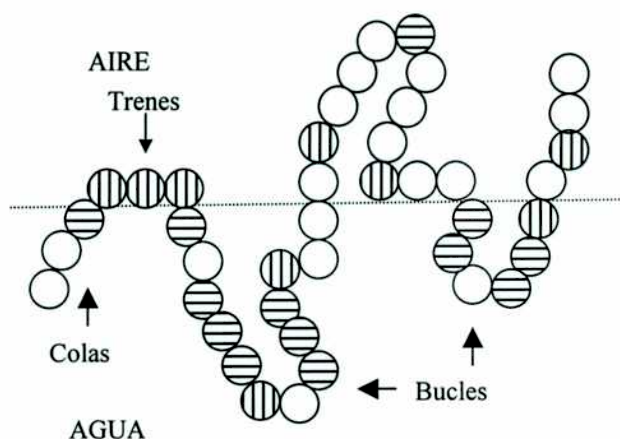


Figura 2: Representación esquemática de una cadena proteica cuando se adsorbe en la interfase. $\circ$: residuos polares, $\circ$: residuos apolares y $\circ$: residuos neutros.

En un sistema acuoso no agitado, inicialmente, la molécula de proteína hidratada difunde rápidamente a la interfase y el proceso de adsorción está controlado por difusión, dependiendo la velocidad de difusión del tamaño y la forma molecular, y de la posibilidad de que la misma se adsorba al colisionar con la interfase (dependiente de la hidrofobicidad y del impedimento electrostático) (Tornberg, 1978). La superficie del film se encuentra en continua formación, y para cubrir el máximo área, las moléculas que arriban a la interfase se despliegan y se desnaturalizan parcialmente, dependiendo la capacidad de adsorción de la flexibilidad de la molécula. La fase siguiente a la adsorción involucra un ensamblaje de las moléculas proteicas en la interfase que esta acompañada por un incremento en la presión superficial (esto es, una disminución en la tensión superficial). Cuando la concentración de la proteína adsorbida (Γ) se incrementa, se genera una barrera electrostática sobre el lado acuoso de la superficie debido a la orientación preferencial de los grupos proteicos cargados hacia la fase acuosa polar. Las moléculas proteicas requieren entonces una energía cinética adecuada para superar la barrera electrostática (que involucra fuerzas repulsivas, impedimentos estéricos y osmóticos) y comprimir las moléculas ya adsorbidas en la interfase, para permitir la adsorción de proteína adicional. La habilidad de dichas moléculas para adsorberse, penetrar y crear espacio en el film preexistente y reordenarse en la interfase, es ahora la determinante de la velocidad. Una vez adsorbidas en la interfase, las moléculas proteicas interactúan en la misma, para lograr un estado de menor energía libre (Phillips y col., 1994b). Con el incremento de la cantidad de proteína adsorbida el reordenamiento de las moléculas en forma extendida disminuye y el film cambia de expandido a comprimido (Kinsella y Phillips, 1989). El proceso de desnaturalización puede comenzar segundos u horas luego de la adsorción, dependiendo de la flexibilidad y de la estructura de la proteína, y puede continuar en un grado más bajo durante días, reteniéndose la estructura terciaria de la proteína en algunos films (Wilde y Clark, 1996).

Se han aplicado diversos métodos para determinar conformaciones y cambios conformacionales de las proteínas en la interfase: métodos espectrofotométricos de fluorescencia (Walton y Maenpa, 1979), dicroísmo circular y espectroscopía infrarroja (FTIR: fourier transform infrared spectroscopy) (Nagano y col., 1995, Subirade y col., 1998), espectroscopía UV -visible, resonancia magnética nuclear (McClements, 1999). Independientemente del origen y la conformación proteica, en la formación de films, las uniones por puente hidrógeno intermoleculares con formación de estructuras de hojas plegadas β son esenciales (Subirade y col., 1998).

Para estudiar la cinética de adsorción proteica en la interfase se mide la variación de la concentración superficial y de la presión superficial en función del tiempo. Se alcanza un valor de equilibrio, presentando la adsorción cierto grado de reversibilidad (Gonzalez y Mac Ritchie, 1970). Los procesos de desorción pueden ser muy lentos, siendo las barreras energéticas mayores a menor concentración proteica (Narsimhan y Uraizee, 1992).

3.6. Propiedades de los films proteicos

La interfase no es un sistema autónomo y sólo existe como límite entre dos fases, pudiendo variar su composición durante el transcurso del tiempo.

Para la formación de un film cohesivo, se necesitan extensas interacciones proteína - proteína que formen una red continua tridimensional y que impartan rigidez estructural; sin embargo, si el número de interacciones intermoleculares resulta excesivo, puede ocurrir una coagulación y posterior desestabilización del film (Halling, 1981). El desarrollo de films apropiados, con óptimas propiedades viscoelásticas, no sería posible en el caso de films constituidos por polipéptidos simples de bajo peso molecular, donde las interacciones intermoleculares son débiles; las interacciones en la interfase deben maximizar las propiedades de cohesión y resistencia mecánica.

Las propiedades viscoelásticas de los films determinan su capacidad para resistir y acomodarse frente a deformaciones sin romperse. La reología interfacial (o de dos dimensiones) define las relaciones entre tensión, deformación y velocidad de deformación en términos de coeficientes de elasticidad y viscosidad, y está relacionada con el grado de hidratación y las interacciones moleculares (Damodaran, 1989). Se presentan principalmente dos clases de deformaciones: a) tensión de corte, que produce cambios de forma y b) compresión/dilatación que produce cambios en el área. Debe especificarse que clase de tensión fue aplicada en las mediciones de viscosidad superficial (Lucassen-Reynders, 1993).

Viscosidad superficial de corte: es la fuerza requerida para desplazar y mover las moléculas de un punto a otro y refleja la atracción neta entre las proteínas del film interfacial y entre este último y las capas de líquido adyacentes. Esta viscosidad superficial o resistencia a los esfuerzos de corte de la superficie del film suele ser muy alta, refleja la resistencia mecánica del mismo y es un parámetro importante relacionado con la estabilidad de films y espumas. Las monocapas proteicas en las interfases contienen entre 1 a 8 mg proteína/m² y exhiben una viscosidad y elasticidad considerable no obstante su extrema delgadez (1 a 10 nm). Luego de cierta compresión del film, las proteínas dentro del mismo colapsan y coagulan, reflejando una extensiva interacción entre ellas. La viscosidad superficial se incrementa con el espesor del film y varía con el tipo de proteína, el tiempo y el pH (Phillips y col., 1994b).

Elasticidad y viscosidad de dilatación: ambas propiedades pueden ser combinadas en un único parámetro, el módulo viscoelástico superficial del film " ϵ " que vincula la variación de la tensión superficial con los cambios del área superficial " A " ($\epsilon = -d\pi/d(\ln A)$) (Kim, 1985). Durante la expansión del film ocurren diversos fenómenos: i) difusión del surfactante desde subcapas en la solución a la interfase y ii) reordenamientos de las moléculas adsorbidas dentro de la superficie (los cuales pueden ser retardados por varios eventos: presencia de una barrera de adsorción, lentos reordenamientos moleculares, formación de

complejos, transiciones de fase en la superficie y formación o destrucción de una estructura tridimensional) (Lucassen - Reynders, 1993).

Las interacciones proteína - proteína, el espesor del film, la presión superficial desarrollada y las propiedades viscoelásticas están altamente influenciadas por la carga neta de la proteína. Los films formados a valores de pH cercanos al punto isoeléctrico son más condensados, más fuertes y se forman más rápido. Los films compuestos por mezclas de proteínas solubles con diferente carga neta y distintas relaciones entre residuos hidrofílicos/hidrofóbicos, son usualmente más estables. La formación de uniones disulfuro durante la formación del film también aumenta la estabilidad. La fuerza de los films proteicos tiende a incrementarse con el tiempo, reflejando reordenamientos y el incremento de las interacciones entre las moléculas componentes del film (Kinsella y Phillips, 1989).

Numerosas metodologías han sido desarrolladas para el estudio de las propiedades interfaciales de proteínas.

Tensión superficial: puede ser medida por el método del volumen de las gotas (estalagmómetro de Traube), por caracterización de la forma y del tamaño de la gota (método de Sessile) y por distintos métodos dinámicos como el anillo de Du Noüy, método de la gota pendiente (Tornberg, 1978), tensiolaminómetro de la placa de Wilhelmy (Graham y Phillips, 1979a; German y col., 1985). En los últimos años se han desarrollado metodologías más modernas: balanzas para films tipo Langmuir donde se pueden estudiar procesos de relajación y dilatación por aplicación de ciclos compresión / expansión, por mediciones dinámicas de presión superficial y área interfacial (Rodríguez Niño y col., 1998), método de máxima presión sobre la burbuja, método del jet oscilatorio, método sometiendo gotas en el interior de un capilar a oscilaciones con determinada frecuencia, medición de la amplitud y frecuencia de ondas generadas en un capilar lleno de líquido (McClements, 1999).

Características de flujo de films superficiales (umbral de fluencia, viscosidades, comportamiento no-newtoniano): viscosímetro de tracción viscosa de un canal

(Mannheimer y Schechter, 1970), viscosímetros de anillo (Blank y col., 1969; Blank y Britten, 1970; Dickinson y col., 1985) o péndulo rotatorio (Miller y col., 1998), cilindros de sobreflujo (Prins, 1999).

Mediciones de dilatación interfacial y elasticidad: ensayos de compresión / extensión por tensiolaminometría, cambios en el área interfacial por aumento o disminución del volumen de una gota (Miller y col., 1998), técnicas con ondas sometiendo al film a amplitudes periódicas y pequeñas (Lucassen - Reynders, 1993).

Concentración superficial (Γ): técnicas con marcadores radioactivos (Hunter y col., 1991), incluyendo elipsometría (Graham y Phillips, 1979b); FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) donde se determinan por difusión con marcadores isothermas de adsorción (γ vs Γ), características de drenado y de angostamiento del film (Clark y col., 1994), interferometría laser donde también se determina el espesor del film (Wilde y Clark, 1996).

Espesor del film: técnicas de barrido con luz (light - scattering), aplicación de rayos X en pequeños ángulos (small-angle-X-ray-scattering), reflexión de neutrones (neutron scattering), elipsometría (McClements, 1999).

Estudios morfológicos: microscopía del ángulo de Brewster (Rodríguez Niño y col., 1998), microscopía electrónica con digitalización de imágenes de la formación de finos films líquidos suspendidos en aire (Clark y col., 1994; Miller y col., 1998); microscopía de fuerza atómica (AFM) por medio de la cual se observan las redes interfaciales (Gunning y col., 1996).

Estudios de estructura proteica: dicroísmo circular con radiación UV lejana (Clark y col., 1989); técnicas bioquímicas de hidrólisis enzimática e inmunoensayos se aplican para el estudio de la orientación y conformación de las proteínas en la interfase (McClements, 1999).

Estabilidad del film: drenado del film usando platos porosos, celda de Sheludko.

Estudios de interacciones moleculares: las interacciones coloidales que involucran biopolímeros adsorbidos en la interfase ocurren en general a distancias de

nanómetros y son una combinación de fuerzas de Van der Waals, electrostáticas y de interacciones entrópicas y estéricas. La técnica de medición de fuerzas superficiales permite la determinación de las magnitudes de las fuerzas moleculares entre dos films superficiales, resultando una técnica útil para determinar bases fundamentales de la funcionalidad y el comportamiento de proteínas (Leckband y Israelachvili, 1993; Toprakcioglu, 1994).

4. Espumas estabilizadas por proteínas

Muchos alimentos deben su textura característica a la existencia de una estructura espumada (panes, tortas esponjosas, merengues, helados, mousses, bebidas batidas, cerveza, champagne, etc.) (Phillips y col., 1994c). En las espumas alimentarias más típicas, la estructura está estabilizada por la presencia de proteínas adsorbidas en la interfase aire/solución; éstas imparten a los alimentos atributos de textura deseables en virtud de la capacidad de atrapar, encapsular y retener el gas que generalmente es aire o dióxido de carbono (Dickinson, 1989). Las proteínas que poseen buenas propiedades espumantes son típicamente de origen animal (huevo o leche), pero debido a motivos nutricionales, a su alto costo y en ciertas circunstancias falta de disponibilidad, las proteínas vegetales, en particular las de soja, se utilizan comercialmente en reemplazo total o parcial de las mismas. Sin embargo, las proteínas de soja deben ser modificadas para mejorar sus propiedades de espumado y eventualmente reemplazar a las proteínas de origen animal.

4.1. Estructura de espumas

Las espumas son sistemas coloidales termodinámicamente inestables, en los cuales una fase dispersa gaseosa es mantenida en una matriz continua, líquida o semisólida, que contiene un agente con actividad superficial. En la dispersión, las burbujas de gas se encuentran separadas por una fase continua de capas delgadas

de líquido (lamelas), que pueden tener espesores del orden de nanómetros. Como consecuencia del gran área interfacial líquido - gas existente entre las interfases no miscibles, se requiere energía para producir las espumas y éstas son altamente inestables (Halling, 1981).

Las burbujas de gas pueden diferir sustancialmente en volumen, con diámetros que oscilan entre $1\mu\text{m}$ a varios centímetros (generalmente de 0,1 a 3 mm), lo cual implica 10^3 burbujas por ml, siendo en general tres órdenes más grandes que las gotas de una emulsión (diámetro 0,1 - 100 μm , 10^{11} burbujas por ml). Presentan una compresibilidad cinco órdenes de magnitud mayor que las gotas de las emulsiones, pues el gas es mucho más soluble en agua que el aceite o la grasa. También se observan grandes diferencias con relación a la tensión superficial; en una burbuja de gas se encuentran valores de alrededor de $30\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, la cual es mucho mayor que la tensión interfacial de una gota de emulsión, que puede ser menor a $0,1\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Difieren además en la densidad entre la fase continua y la dispersa ($10^3\text{ kg}/\text{m}^3$ para una espuma comparado con $10^2\text{ kg}/\text{m}^3$ como máximo para una emulsión) (Prins, 1988; Walstra, 1989). La formación de emulsiones es más rápida, en general son más estables que las espumas y presentan una menor desnaturalización de la proteína en la interfase (Damodaran, 1997). Por lo tanto, aunque muchos conceptos son aplicables a ambos fenómenos, existen importantes diferencias en el comportamiento de ambas dispersiones (Halling, 1981).

La fracción de volumen de gas en la espuma " ϕ " varía generalmente entre 0,5 y 0,97. Con relación a la estructura de las espumas, pueden presentarse dos situaciones. En la primera, la espuma ("húmeda"), consiste en burbujas esféricas separadas por un film espeso de líquido y, en la segunda situación, que puede derivarse luego de un excesivo drenado o formarse directamente a valores de ϕ bajos, la espuma se transforma en una "espuma seca", de burbujas polihédricas. La deformación de las burbujas también se observa cuando ϕ es muy alta (a $\phi > 0,75$), pues no es posible un empaquetamiento del gas en esferas, presentándose una

compresión de las burbujas y adquiriendo formas poliédricas con caras parcialmente planas. La capa fina de líquido que separa dos caras de poliedros adyacentes se denomina "lamela" y los canales de encuentro de estas lamelas se conocen como "plateau border" (Figura 3) (Kim, 1985; Damodaran, 1997).

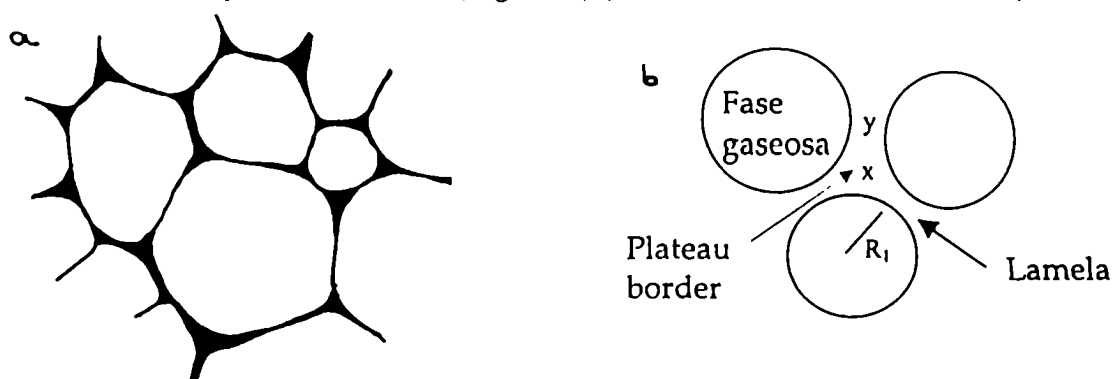


Figura 3: a) Esquema de la estructura de burbujas de una espuma y b) Formación del plateau border en la intersección de tres burbujas de gas. La curvatura negativa en X provoca que la presión sea menor que en Y, fluyendo líquido hacia X.

4.2. Formación de espumas

Durante la formación de la espuma, el transporte de masa de proteínas a las nuevas interfases que se forman, tiene lugar principalmente por convección controlada en régimen turbulento, estando luego involucrados varios eventos. Inicialmente, la proteína difunde a la interfase aire/agua, se adsorbe, concentra y reduce la tensión superficial; en la interfase las cadenas polipeptídicas se desenrollan y existe una reorientación de las partes polares hacia el agua y las no polares hacia el aire. Finalmente, los polipéptidos interaccionan para formar un film cohesivo continuo. El proceso de formación de una espuma difiere del de una emulsión e incluye etapas que corresponden al período de desestabilización (Halling, 1981).

Pueden distinguirse tres procesos de preparación de espumas p: (I) agitación de una determinada cantidad de líquido en una cantidad ilimitada de aire; (II) agitación de una mezcla de gas y líquido donde ambos volúmenes están definidos, y (III) generación del gas en forma de burbujas (Prins, 1988).

En los métodos de batido y de agitación (tipo I), el aire es incorporado a la espuma por disminución de la presión hidrostática debido a las paletas o la varilla agitadora. Las burbujas son inicialmente grandes y se pueden romper por efecto de la fuerza de corte (burbujas grandes → elongación → ruptura → burbujas pequeñas). Se requieren volúmenes grandes de solución y altas concentraciones proteicas (1-40%) (Wagner, 2000).

En los métodos de burbujeo y de inyección (tipo II) se hace burbujear el gas a través de un dispersor poroso (como una placa de vidrio sinterizado) en una disolución de proteína diluida (0,01 - 2%p/v). Las burbujas son inicialmente pequeñas, dependiendo su radio medio de la tensión superficial, de la densidad del líquido, de la aceleración de la gravedad y del radio del orificio del inyector o placa porosa (Wagner, 2000).

Existen dos formas de generar burbujas de gas (tipo III): i) el gas es generado in situ, y para formarse las burbujas el sistema debe estar saturado de gas (por ejemplo en la liberación de dióxido de carbono en la producción de pan) o ii) el sistema se sobresatura de gas y las burbujas se forman por nucleación heterogénea (por ejemplo en la producción de cerveza y en la producción de productos expandidos por extrusión) (Prins, 1988).

4.3. Estabilidad de espumas

Si bien la capacidad de formar una espuma es muy importante, la posibilidad de mantener esa estructura en el tiempo es una condición crítica para la aplicación de una proteína en una formulación (Kinsella, 1981a). La desestabilización de espumas ocurre por diversos mecanismos simultánea y sinérgicamente. En las espumas recién formadas y diluidas, predominan los mecanismos de drenaje y flotación, en tanto que en las espumas polihédricas predominan la desproporción y el colapso (Wagner, 2000).

Cremado (o sedimentación)

Por diferencia de densidad las burbujas de aire ascienden a través de la matriz y la fase acuosa fluye alrededor de las burbujas. En este mecanismo el movimiento de las burbujas es más importante que el del líquido y la velocidad del mismo depende de la ley de Stokes $v = \frac{2g\delta R^2}{9\eta}$, donde g es la aceleración de la gravedad, δ y η son la densidad y la viscosidad de la fase continua respectivamente y R es el radio de la burbuja (Walstra, 1989).

Drenaje de líquido

A altas ϕ las burbujas pasan de esféricas a poliédricas, y el líquido drena por gravedad. Dicho drenado ocurre por: a) efecto de la gravedad, b) pasaje de líquido desde la región laminar entre 2 burbujas hacia el plateau border (PB) situado en la intersección de 3 burbujas (Figura 3), debido a la succión capilar del PB provocada por una diferencia presión ΔP dada por la ecuación de Laplace $\Delta P \propto \gamma \left[\frac{1}{R_a} - \frac{1}{R_b} \right]$ donde R_a y R_b son los radios de curvatura del plateau border y de la lamela, respectivamente, ($R_a > R_b$ con lo cual hay menor presión en PB, según: $P = P_{atm} + 2\gamma/R$, donde γ es la tensión superficial) y c) pasaje del líquido a través del plateau border a la fase continua por influencia de la gravedad (Wagner, 2000). El drenaje debido a la gravedad se puede asemejar al flujo viscoso de un líquido entre dos placas paralelas, donde la velocidad promedio (v_{av}) está dada por la ecuación de Gibbs: $v_{av} = \frac{d^2 \cdot g \cdot \delta}{8\eta}$ donde d es la distancia entre los platos (Kim, 1985).

Desproporción o maduración de Ostwald:

La presión dentro de una burbuja, dada por la ecuación de Laplace, es mayor a menor radio de las burbujas. De acuerdo a la ley de Henry, la solubilidad de un gas es proporcional a su presión, siendo esta mayor en la vecindad de una

burbuja chica, causando el transporte de gas por difusión, desde las burbujas chicas hacia las grandes, aumentando el tamaño promedio de las burbujas. Este proceso se acelera a sí mismo, pues las burbujas pequeñas disminuyen su tamaño. Este proceso es dependiente de la solubilidad y de la difusión del gas en el líquido y de la permeabilidad y tensión superficial del film (Prins, 1988). La solubilidad de los gases en agua es mayor que la de los aceites, siendo este mecanismo mucho más importante en espumas que en emulsiones.

Colapso

Consiste en la ruptura del film entre dos burbujas en la interfase espuma - aire, produciendo la disminución del volumen de espuma. En general se ha observado que este proceso se acelera con el tiempo y que es independiente de la altura inicial de la columna de espuma. El drenaje y la ruptura de la espuma son interdependientes, en cuanto que la ruptura aumenta el drenaje y el drenaje reduce el grosor y la resistencia de las laminillas. Distintos mecanismos han sido propuestos para explicar la ruptura de los films: presencia de partículas hidrofóbicas rígidas mayores que el espesor del film y que contactan dos burbujas o de partículas dispersas que desplazan al surfactante o que generan un movimiento de angostamiento del film dando lugar a su ruptura (Prins, 1988); en films muy delgados (en el orden de los 10 nm), ocurre una ruptura espontánea, por formación de un agujero (para lo cual primero debe incrementarse el área superficial) y es dependiente de la tensión superficial y de las propiedades viscoelásticas del film (Walstra, 1988). Los cambios de tamaño de burbuja resultantes de la desproporción, provocan un estrés considerable en las espumas polihédricas y esto podría iniciar la ruptura de la lamela (Halling, 1981).

Cuando las superficies de dos burbujas se aproximan, las fuerzas atractivas (tipo Van der Waals o electrostáticas) y repulsivas (electrostáticas o estéricas) comienzan a ser determinantes en el espesor de la lamela, presentándose efectos estéricos por efectos del volumen de restricción (perdiéndose la configuración

entrópica) y efectos de presión osmótica por interpenetración de las capas adsorbidas (Kim, 1985). Los efectos de las fuerzas coloidales en las interacciones energéticas de dos superficies que se aproximan, fueron analizadas en la teoría DLVO (Deryagin y Landau, Verwey y Overbeek) donde se postula que las repulsiones pueden llevar a una barrera energética importante a distancias de pocos nm y a una separación mayor (del orden de 10 nm), un mínimo de energía secundario podría dar una floculación reversible (Halling, 1981).

Otros mecanismos:

Configuraciones inestables: en espumas polihédricas, cuando una burbuja desaparece por desproporción o ruptura del film, se genera una configuración inestable en el cual cuatro films se encuentran en el plateau border. Este arreglo inestable se transforma en una configuración estable por formación de un nuevo film (Prins, 1988).

Evaporación: este efecto puede ser importante cuando la presión de vapor de agua en la atmósfera externa es muy baja, reduciéndose el espesor del film hasta un valor menor al crítico para que colapse y cuando hay presentes agentes surfactantes volátiles (alcoholes o aceites esenciales) (Prins, 1988). Una baja presión de vapor es una condición básica para retener la fase gaseosa en el líquido entre burbujas y minimizar la tendencia a la ruptura del film (Glicksman, 1983).

Efecto Gibbs-Marangoni

El flujo de líquido provoca un flujo convectivo del surfactante en la subcapa, incrementándose su concentración superficial en la dirección del flujo. La formación de un gradiente de tensión superficial produce una fuerza que se opone al líquido que fluye, fenómeno que se conoce como efecto Gibbs-Marangoni. La movilidad de la interfase y su elasticidad son determinantes de la magnitud de este efecto.

Inicialmente, las características de la fase continua son un factor preponderante en la estabilización de las espumas. Cuando la lamela se angosta cerca de un espesor crítico (del orden de los 100 nm), las características del film son los factores más importantes: la viscosidad superficial protege al film de shocks térmicos y químicos, la elasticidad se requiere para responder al stress de expansión y compresión del área interfacial. Films rígidos con alta viscosidad pero baja elasticidad se rompen fácilmente; el efecto Marangoni, importante en films de surfactantes de bajo peso molecular, presenta un rol secundario en films proteicos (Kim, 1985).

4.4. Métodos para el estudio de la formación y estabilidad de espumas

Para estudiar las propiedades espumantes (formación y estabilidad) de las proteínas se han desarrollado numerosos métodos según las distintas formas de producción de espumas:

Espumas formadas por burbujeo o inyección:

Mediciones de volumen de líquido drenado en columna graduada (Clark y Ross, 1940; Mita y col., 1977) adicionando mediciones de fuerza de la espuma (Waniska y Kinsella, 1979) o utilizando simultáneamente técnicas fotográficas (Mita y col., 1978).

Mediciones conductimétricas: métodos semi-micro y microconductimétricos (Kato y col., 1983b; Wright y Hemmant, 1987; Torikata y col., 1991; Tömösközi y Pungor, 1993; Loisel y col., 1993;), métodos adicionando imágenes tomadas por video para el análisis simultáneo de textura (Guillerme y col., 1993), métodos conductimétricos múltiples (Phianmongkhol y Varley, 1999),

Mediciones de cambio de presión por decaimiento del área interfacial (Dickinson y col., 1993; Yu y Damodaran, 1991a).

Mediciones con un sensor de fibra óptica móvil para el análisis de distribución de burbujas y determinación de volumen de gas en espumas líquidas por diferencias en índices de refracción (Bisperinik y col., 1992).

Espumas formadas por batido:

Mediciones de volumen de líquido drenado y de espuma colapsada para altas concentraciones proteicas (Heil y col., 1990); determinaciones cinéticas de líquido drenado en pipetas (Elizalde y col., 1991); determinaciones por pesada del líquido drenado (Phillips y col., 1987; Huang y col., 1997), por disminución del volumen de espuma en el tiempo (Wang y Kinsella, 1976), por pesada de la espuma (Chen y Morr, 1985), velocidad de caída de cierto peso a través de la columna de espuma (Kim, 1985).

Técnicas que aplican imágenes de resonancia magnética nuclear (MRI) para la determinación de densidades de espumas, estructura, estabilidad y dinámica de la mismas (McCarthy y col., 1989 y 1990).

Caracterización de espumas de alta concentración proteica por mediciones de textura con ensayos de compresión usando un texturómetro Instron (Ferreira y col., 1995).

Determinaciones de contenido de aire y de tamaño de burbuja por ultrasonido (Dickinson and McClements, 1995b).

Se realizan también estudios morfológicos de espumas por microscopía óptica y macrofotografía, microscopía electrónica, crio-fijación y criomicroscopía, microscopía a bajas temperaturas que permite el estudio de estabilidad, cambio de forma (esférica a polihédrica), cambios configuracionales en la lamela y el plateau border, observación de desproporción, ruptura y floculación (Wilson, 1989). Se están desarrollando nuevos métodos que podrían ser aplicados al estudio de espumas estabilizadas por proteínas como el reómetro óptico (reómetro,

microscopio y analizador de imágenes) y las tomografías ópticas tridimensionales (Monnereau y Adler, 1998).

4.5. Factores que afectan a las propiedades de espumado

Los factores que afectan la formación y estabilidad de espumas proteicas se mencionan en la Tabla 6.

Tabla 6: Factores que afectan a la formación y estabilidad de espumas proteicas (basado en Kinsella, 1981a y b).

FORMACION	ESTABILIDAD
• Solubilidad • Velocidad de difusión y adsorción en la interfase, rápida reducción de la tensión superficial • Velocidad de desplegamiento (hidrofobicidad) • Disociación de proteínas oligoméricas • Capacidad de adsorción a un film preexistente cuando se forman multicapas	• Formación de un film cohesivo, impermeable, viscoelástico • Tendencia a la agregación sin excesiva coagulación (interacciones hidrofóbicas y -S-S-) • Capacidad de absorción de agua • Mínima carga superficial • Retención parcial de la estructura secundaria y terciaria
Tamaño, estructura y forma molecular - Flexibilidad, rápidos cambios conformacionales y de reorientación de los polipéptidos - Interacciones proteína / proteína - Compactabilidad - Balance intrapéptidos de atracción / repulsión - Balance lipofílico adecuado dado por la relación hidrofobicidad superficial/ carga superficial	
pH, temperatura, concentración proteica, presencia de otros componentes (lípidos, surfactantes, hidratos de carbono, sales) o de agentes desnaturalizantes	

Los factores que gobiernan la creación del film interfacial y que son deseables para la formación de una espuma, no son exactamente los mismos que determinan su estabilidad. Una proteína ideal para la formación de espuma debe ser relativamente pequeña y flexible (facilitando el desdoblamiento y la incorporación en la interfase), soluble (para difundir rápidamente), tener una importante hidrofobicidad superficial y ser capaz de disminuir rápidamente la tensión superficial (German y col., 1985). La estabilidad de la espuma refleja las propiedades reológicas, eléctricas y de hidratación del film proteico. La formación de un film estable requiere de moléculas largas (para permitir mayores interacciones en la interfase fortaleciendo los films), anfipáticas (para proveer una distribución desbalanceada de residuos cargados y apolares que mejoran las interacciones interfaciales) y capaces de retener parte de la estructura (mejora la superposición e interacción de segmentos en el film). Deben poseer regiones interactivas (la disposición de diferentes segmentos funcionales facilita las interacciones secundarias en la fase acuosa, la fase gaseosa y la interfase), grupos cargados (afectan las interacciones proteína - proteína en el film y producen repulsiones electrostáticas entre burbujas adyacentes) y residuos polares (residuos cargados o hidratables que mantienen las burbujas apartadas, unen y retienen agua) (Kinsella y Phillips, 1989).

En las espumas formadas por batido, la susceptibilidad al trabajo mecánico y la distribución del tamaño de burbuja son importantes. La tensión de corte puede producir cierto desdoblamiento e influir en la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína. La naturaleza de la fase dispersa, puede ser un factor importante especialmente en burbujeo.

4.6. Comportamiento interfacial y propiedades de espumado de proteínas de soja.

Se ha sugerido que las proteínas de soja son agentes espumantes pobres, principalmente por la estructura compacta que resiste la adsorción y el

desplegamiento en la interfase, previniendo una adecuada formación del film (German y col., 1985).

La proteína de soja difunde a menor velocidad que otras proteínas, lo cual puede deberse al alto peso molecular de las partículas que migran, probablemente con la estructura cuaternaria intacta, que se desnaturalizaría al adsorberse en la interfase. La estructura cuaternaria de las globulinas de soja está estabilizada por uniones hidrofóbicas y es compacta, siendo la estructura plegada fácilmente destruible tras la disociación de las globulinas en subunidades (Tornberg, 1979). La velocidad de penetración en la interfase comienza a ser un paso determinante en el proceso de adsorción a bajas presiones superficiales, en comparación con otras proteínas, mostrando los agregados ya adsorbidos una alta habilidad para desplegarse (Tornberg, 1979). La etapa de penetración involucra mayor número de segmentos participantes en el proceso, en comparación con la etapa difusional, incrementándose la estructura del film con el aumento de la presión superficial, induciendo a más segmentos de la proteína a participar en el proceso de reacomodamiento. La presencia de sales disminuye la velocidad de reacomodamiento (Tornberg, 1978).

Las globulinas forman films en un amplio rango de pH siendo éstos más fuertes cerca del pl. A pH alcalinos, la formación del film es limitada, indicando que probablemente estén involucradas interacciones electrostáticas en su formación (Kinsella y col., 1985). La desnaturalización interfacial y subsecuente interacción entre las proteínas oligoméricas β -conglucina y glicina es probablemente un proceso extremadamente complejo en comparación con los de proteínas monoméricas. La literatura sobre comportamientos de asociación - disociación de las subunidades de proteína de soja en la interfase y sobre la contribución de las uniones químicas a la viscoelasticidad del film adsorbido, es escasa.

La β -conglucina presenta una mejor habilidad para disminuir la tensión interfacial, independientemente del pH, por su mayor hidrofobicidad (Hayakawa

y Nakai, 1985) y menor peso molecular. En el estado nativo, la glicinina presenta una conformación globular compacta, baja flexibilidad y gran tamaño molecular y no posee un alto grado de hidrofobicidad superficial, ni un número significativo de sitios para uniones hidrofóbicas (German y col., 1985; Kim y col., 1987a). Sin embargo, la glicinina presentó mayor capacidad de espumado y mayor estabilidad en las espumas que la β -conglucina (Yu y Damodaran, 1991b), aún cuando ésta última, por ser una glicoproteína, presentó mayor viscosidad y capacidad de absorción de agua en solución (Rao y col., 1986) indicando que otros factores son importantes para determinar distintos comportamientos del film y de la solución.

A pH 7 y concentración 1%, las espumas de β -conglucina resultaron más inestables, siendo menor la velocidad de desproporción que de drenado; contrariamente a lo observado para espumas de glicinina y mezclas equimolares de ambas proteínas. En estas condiciones, la 7S es más electronegativa e hidrofílica, siendo mayor la barrera energética para su adsorción en la interfase e impidiendo la formación de una red cohesiva proteica por una alta repulsión electrostática. La 11S, con menor carga, presentaría una barrera energética menor, y menores repulsiones, formándose una red proteica en multicapas que retardaría el drenado de las lamelas. La relación 7S / 11S debe ser óptima para obtener las mejores propiedades de espumado (Yu y Damodaran, 1991b), encontrándose los mejores resultados cuando la relación se acerca a la composición normal del aislado nativo (Petrucelli y col., 1994b).

Con el fin de mejorar las propiedades interfaciales, diversos procesos han sido aplicados para modificar las propiedades de espumado de las proteínas de soja.

Tratamientos físicos: térmicos (Kato y col., 1983a, Sorgentini y col., 1995) encontrándose una mayor capacidad de formación de espuma y aumento de la estabilidad debido a un incremento en la hidrofobicidad; alta presión (Heinzelmann y col., 1994), la cual produce disociación y reformación de

aglomerados proteicos e incrementa las regiones hidrofóbicas (Kajiyama y col., 1995); mecanólisis (Rawel y Muschiolik, 1994).

Tratamientos químicos: producen modificaciones a nivel de la estructura primaria y modifican nutricionalmente a la proteína. i) Acilación: a) acetilación, disminuyen las repulsiones electrostáticas por reemplazo de grupos amino por acetilos neutros. Franzen y Kinsella (1976) no encontraron cambios significativos; b) succinilación, desdoblamiento de cadenas polipeptídicas por reemplazo de fuerzas atractivas por repulsivas al aumentar la carga negativa. Franzen y Kinsella (1976) encontraron una mayor CE (capacidad de espumado) y una mayor ED (estabilidad al drenado) si $\text{pH} > \text{pI}$ y menores CE y ED si $\text{pH} < \text{pI}$, relacionándolo con la solubilidad (Kim y Kinsella, 1987b). ii) Deamidación: aumento de la carga de la proteína por hidrólisis de amidas y por hidrólisis parcial de uniones peptídicas. Shih (1991) encontró una mayor CE y una mayor ED (óptimo: 25%), por aumento de la solubilidad. iii) Tratamientos alcalinos junto con hidrólisis enzimática (Were y col., 1997); iv) Tratamientos ácidos (Wagner y col., 1996), junto con reducción y/o deamidación (Wagner y Guéguen, 1999a) siendo la 11S más sensible que la 7S; v) Tratamientos reductores: aumento de hidrofobicidad y viscosidad por cambios conformacionales (Kim y Kinsella, 1987a; Chen y Morr, 1985); adicionando tratamiento térmico (German y col., 1985); junto con sulfonación y tratamiento térmico (Petrucelli y Añon, 1994b), mejorando la capacidad de formación y de estabilidad de espumas.

Tratamientos enzimáticos: diversas enzimas se han utilizado para la modificación de las propiedades funcionales por proteólisis enzimática. Horiuchi y col. (1978) y Bernardi y col. (1991) utilizaron enzimas fúngicas y bacterianas, obteniendo una mayor capacidad de espumado (CE) pero menor estabilidad (ED); Pusky (1975) y Shih y col. (1993) utilizaron enzimas bacterianas (*Aspergillus Oryzae*) y obtuvieron mayor CE al aumentar el grado de hidrólisis; Kim y col. (1990) utilizando distintas proteasas bacterianas mejoraron también la solubilidad, la capacidad emulsionante y la agregación térmica. Las subunidades de la globulina

7S (α , α' y β) resultaron más susceptibles a la hidrólisis que las de la 11 S, lo cual se debería a una mayor superficie hidrofílica de la primera y a una estructura más compacta en la segunda; Hamada y col. (1989) obtuvieron mayor CE pero pocas variaciones en ED por deamidación de hidrolizados utilizando dos enzimas bacterianas.

Asimismo se han realizado estudios del efecto de distintos factores en las propiedades de espumado de proteínas de soja: temperatura, pH, fuerza iónica (Yu y Damodaran, 1991b); presencia de sacarosa; uso de emulsificantes, ésteres de ácido diacetil-tartárico y monoglicéridos de ácidos grasos saturados (Janicki y col., 1993); variación en los tratamientos de obtención de aislados proteicos (Petrucelli y Añón, 1994b). La disociación (que se favorece a baja fuerza iónica o pH ácido) mejora la capacidad de formación de espuma, pero altas fuerzas iónicas se requieren para obtener espumas densas y estables (Wagner y col., 1999a).

Sin embargo, existen pocos trabajos sobre las modificaciones de la funcionalidad de las proteínas de soja en la interfase por presencia de polisacáridos.

5. Interacciones proteína - polisacárido

5.1. Interacciones físico-químicas y estabilidad de los sistemas

Las interacciones proteína - polisacárido juegan un rol significativo en la estructura y estabilidad de muchos alimentos procesados. El control o la manipulación de estas interacciones macromoleculares, son un factor clave para el desarrollo de nuevos productos alimenticios, tanto en su procesamiento como en su formulación (Tolstoguzov, 1997).

La mezcla de proteínas y polisacáridos puede originar una fase estable o fases separadas, dando cuatro tipos de sistemas que difieren en sus estructuras y propiedades (Figura 4): 1) una sola fase conteniendo complejos solubles

(interacciones electrostáticas y uniones hidrógeno que los estabilizan); 2) una sola fase conteniendo los diferentes biopolímeros en dominios en los cuales ambos polímeros se excluyen mutuamente debido a una limitada incompatibilidad termodinámica; 3) formación de un complejo electrostático insoluble y una fase soluble (coacervación); 4) un sistema de dos fases en que ambos biopolímeros están principalmente en fases diferentes (emulsión agua - agua) debido a una incompatibilidad termodinámica (Ledward, 1994; Samant y col., 1993).

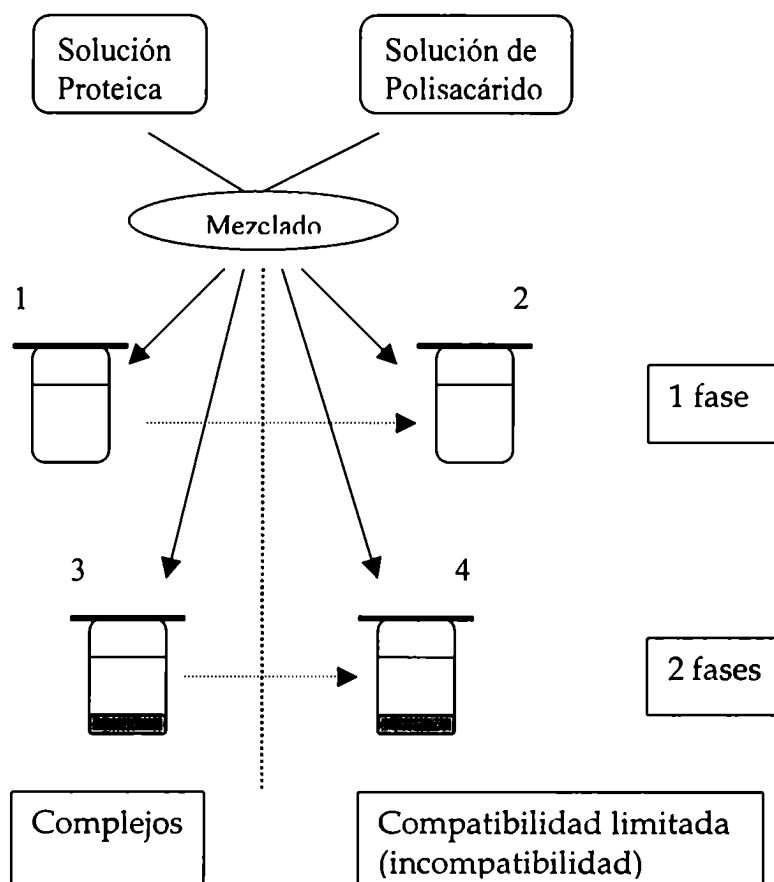


Figura 4: Representación esquemática de cuatro posibles sistemas obtenidos de la mezcla de soluciones de proteína y polisacárido (Tolstoguzov, 1997)

El término "compatibilidad entre biopolímeros" implica miscibilidad de diferentes biopolímeros a nivel molecular, y no es sinónimo de "miscibilidad" ni de "solubilidad". El proceso de mezcla de dos biopolímeros es espontáneo si el cambio

en la energía libre de Gibbs de la mezcla " ΔG_M " es negativo ($\Delta G_M = \Delta H_M - T\Delta S_M < 0$), donde ΔH_M y ΔS_M son la entalpía y la entropía de mezcla, respectivamente, y T es la temperatura absoluta. La incompatibilidad termodinámica se presenta cuando $\Delta G_M > 0$. ΔS_M depende del volumen molar, la forma, el tamaño, la flexibilidad y de la fracción de cada componente en la mezcla. El cambio entrópico es levemente positivo en mezclas de polisacáridos de largas cadenas y proteínas globulares compactas. El cambio entálpico, basado en fuerzas repulsivas (hidratación, estéricas) y atractivas (electrostáticas, hidrofóbicas, Van der Waals, London), será entonces determinante de la compatibilidad del sistema. El mismo está determinado por la magnitud de varias interacciones intermoleculares existentes en la mezcla acuosa de biopolímeros: polímero1 - solvente; polímero2 - solvente; polímero1 - polímero1; polímero2 - polímero2 y solvente - solvente (Schmitt y col., 1998; Tostoguzov, 1997).

5.2. Formación de complejos electrostáticos

Las interacciones macromoleculares involucradas en la formación de complejos pueden ser de tres tipos: a) entre macroiones, b) entre grupos con cargas opuestas (ácidos y básicos) y c) entre otros grupos disponibles de los macroiones. En el primer caso, la carga neta, forma, tamaño y flexibilidad de las macromoléculas son importantes, mientras que en los otros casos es importante la reactividad de los grupos de los residuos de aminoácidos disponibles en la superficie exterior de la molécula proteica y de las unidades de azúcares de las cadenas de los polisacáridos (Tolstoguzov, 1997).

La formación de complejos electrostáticos es usualmente un proceso reversible que depende del pH y la fuerza iónica del medio, entre otros factores (Tabla 7) y está favorecida cuando los componentes presentan cargas opuestas. Ambos biopolímeros presentan un comportamiento electrostático dependiente del pH del medio: carga - si $pH > pI$ (pH al cual el biopolímero tiene carga neutra);

carga + si $\text{pH} < \text{pI}$, siendo en general $\text{pI}_{\text{polisacárido}} < \text{pI}_{\text{proteína}}$. A pH neutro pueden ocurrir interacciones electrostáticas entre polisacáridos aniónicos y subunidades cargadas positivamente de proteínas oligoméricas (Tolstoguzov, 1997).

Tabla 7: Factores que influyen en la formación de complejos proteína - polisacárido

Parámetros físico - químicos e interacciones	Parámetros internos	Parámetros externos
Interacciones electrostáticas	Densidad de carga,	Fuerza iónica, pH,
Interacciones no - electrostáticas	peso molecular,	temperatura,
Uniones hidrógeno	tamaño, relación de	velocidades de
Interacciones hidrofóbicas	concentraciones	deformación, tiempos
Enlaces covalentes	biopolímero/	de deformación,
	biopolímero,	presión, forma de
	Conformación,	preparación de la
	topografía	mezcla, presencia de
		otros componentes*

*sales, lípidos, aditivos con actividad superficial, hidratos de carbono (sacarosa, etc.)

Durante la formación de los complejos electrostáticos, la carga neta disminuye, reduciéndose la hidrofiliidad y la solubilidad del complejo. Las partículas dispersas de complejo insoluble se agregan y precipitan, formando una fase dispersa de complejo de coacervación. Existen diversas técnicas para caracterizar la estructura de complejos proteína - polisacárido: CD (dicroísmo circular); SANS (dispersión de neutrones en ángulos pequeños); IR (espectroscopía infrarroja); NMR (resonancia magnética nuclear); DSC; light - scattering.

Algunas aplicaciones industriales de complejos proteína - polisacárido son la purificación de macromoléculas (ej. proteínas); microencapsulación en biotecnología, cosméticos, farmacia y medicina; ingredientes alimenticios:

sustitutos de grasas, aceites, crema, análogos de carne, biomateriales: formación de films comestibles, empaquetamiento, injertos y bioprótesis en medicina (Schmitt y col., 1998). En alimentos se aplican en la estabilización de productos lácteos procesados, inhibición de la precipitación de proteínas (en bebidas lácteas saborizadas), recuperación de proteínas (de plasma y lácteas), estabilización de calcio en proteínas vegetales sensibles al calcio, formación de geles, concentración y purificación de proteínas, texturización de proteínas, extrusión termoplástica, modificación enzimática: inhibiciones por interacciones enzima - polisacárido (Samant y col., 1993).

5.3. *Interacciones covalentes proteína - polisacárido*

El tratamiento de mezclas de proteína - polisacáridos a humedades relativas intermedias y temperaturas de calentamiento bajas (ej.: A_w 0,65 y $T = 60^\circ\text{C}$) forma híbridos por reacción de Maillard que presentan características propias, principalmente propiedades emulsificantes (Kobayashi y col., 1991; Kato y col., 1992). La formación de conjugados proteína - polisacárido por uniones covalentes involucra al grupo amino reactivo de la lisina o de glutamina (las proteínas de soja y gluten son ricas en residuos de ácido glutámico, que existen principalmente en la forma amidada y serían los grupos reactivos) y grupos éster de carbohidratos (Ledward, 1994). Es la interacción más permanente que se produce, siendo la estructura macromolecular menos susceptible a disrupciones por pH, calor, sales (Dickinson y McClements, 1995a). También pueden formarse por reacción química en solución acuosa, por ejemplo ovoalbúmina + dextrano activado con bromuro de cianógeno a pH alcalino (Kato y col., 1988).

5.4. *Incompatibilidad termodinámica*

Este fenómeno se observa en condiciones en las cuales la formación de complejos está inhibida y se promueve la asociación entre macromoléculas del

mismo tipo. La Figura 5 representa un diagrama de fases de la mezcla de soluciones de proteína y polisacárido. La región debajo de la curva binodal, corresponde a una única fase formada por una solución de ambos biopolímeros, mientras que la región superior representa un sistema de dos fases.

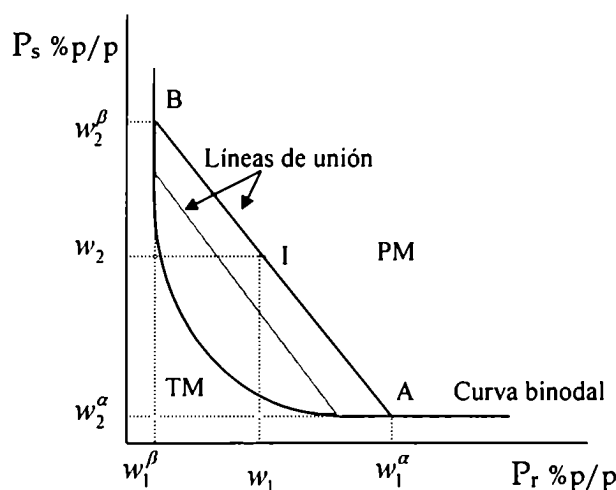


Figura 5: Composición de fases en un sistema termodinámicamente incompatible agua + proteína + polisacárido. La fase α , rica en proteína (P_r), contiene una fracción en peso w_1^α de proteína y w_2^α de polisacárido (P_s). La fase β , rica en polisacárido, contiene una fracción en peso w_1^β de proteína y w_2^β de polisacárido. El punto I corresponde a la composición global del sistema ($P_r = w_1$ y $P_s = w_2$). La longitud de las líneas AI y BI son proporcionales a las fracciones de los volúmenes de las fases α y β respectivamente. Las líneas de unión vinculan la composición de las fases coexistentes. TM y PM significan miscibilidad total y parcial respectivamente (Dickinson y McClements, 1995a).

A una concentración total de biopolímero alta (en general mayor a un 4%) las soluciones acuosas de diferentes biopolímeros se separan en dos fases, que coexisten en equilibrio, formándose una emulsión agua / agua, la cual presenta una tensión interfacial muy baja, debido a la significativa co-solubilidad y a tener ambas fases el mismo solvente (agua). Un fenómeno de limitada compatibilidad termodinámica se presenta a bajas concentraciones, por debajo de la curva binodal, observándose una co-solubilidad parcial. La incompatibilidad entre los biopolímeros incrementa la actividad termodinámica, es decir la concentración

efectiva y el potencial conformacional de ambos. El potencial conformacional puede definirse como la habilidad de una proteína para formar uniones intermoleculares que contribuyen a potenciar propiedades físico - químicas, reológicas y estructurales (por ej. la formación de geles, estabilización de espumas y emulsiones) (Tolstoguzov, 1993b).

Usualmente existe cierto grado de asimetría en los diagramas de fase, presentándose una diferencia de escala entre el eje de las concentraciones de proteína y de polisacárido, siendo la concentración de la proteína en la fase α mayor que la del polisacárido en la fase β ($w_1^\alpha \gg w_2^\beta$). La asimetría puede atribuirse al mayor volumen molecular ocupado por el polisacárido expandido con respecto al componente proteico más compacto e hidrofóbico (Tolstoguzov, 1986).

La interacción de los biopolímeros entre sí y con el solvente puede describirse cuantitativamente por los valores del segundo coeficiente del virial (A_{pr-w} , A_{pr-pr} , A_{ps-w} y A_{ps-ps}) y del valor de cruce del segundo coeficiente del virial (A_{pr-ps}), según: $\mu_{pr} = \mu_{pr}^0 + RT[\ln(m_{pr}/m_{pr}^0) + A_{pr-pr}m_{pr} + A_{pr-ps}m_{ps}]$, donde μ es el potencial químico y m_i son las concentraciones molales (una expresión análoga existe para el polisacárido). Si A_{pr-ps} es positivo, indica interacciones termodinámicas desfavorables. La exclusión de las moléculas de un biopolímero del volumen de solución ocupado por las moléculas del otro biopolímero (denotando incompatibilidad), reduce la entropía de mezcla. Si el valor de A_{pr-ps} es negativo, es indicativo de mutua atracción y miscibilidad, disminuyendo μ . (Semenova, 1996; Grinberg y col., 1997; Tolstoguzov, 1997).

La incompatibilidad de los biopolímeros depende de la intensidad de las interacciones entre ellos, entre las moléculas de cada uno consigo mismas y con el solvente (diferencias en la hidrofiliidad de los biopolímeros). A una concentración total de biopolímero moderada, la separación del sistema en dos fases depende de la carga del biopolímero, del pH y la fuerza iónica, siendo el factor entrópico determinante en la posibilidad de dicha separación (Alves y col., 1999). Otros factores también influyen sobre la incompatibilidad, la cual puede

aumentar por: i) el aumento del peso molecular y la rigidez estructural de los biopolímeros; ii) la desnaturalización de proteínas globulares debido al incremento de la hidrofobicidad y al tamaño de las cadenas polipeptídicas agregadas; iii) aumento de la concentración de sales y de la temperatura (Tolstoguzov, 1997). Los polisacáridos con estructura lineal presentan mayor incompatibilidad que los de estructura ramificada, y disminuye la incompatibilidad en el orden polisacáridos con grupos carboxilo > neutros > sulfato (Grinberg y col., 1997). La compatibilidad termodinámica también varía por la presencia de otros componentes como moléculas lipofílicas y de sacarosa, los cuales presentan en general un efecto negativo y positivo, respectivamente (Semenova, 1996).

Distintos métodos pueden aplicarse para determinar la incompatibilidad termodinámica en sistemas acuosos: determinación de los segundos coeficientes del virial por light scattering, variaciones en índices de refracción, modificaciones en termogramas obtenidos por DSC, calorimetría diferencial de mezcla (medición de la variación entálpica por mezcla de soluciones de ambos biopolímeros) (Semenova y col., 1999).

La incompatibilidad termodinámica presenta numerosas aplicaciones: concentración de soluciones proteicas por "ósmosis sin membrana", fraccionamiento de biopolímeros, cambios en las propiedades funcionales de las macromoléculas donde la actividad termodinámica de cada componente aumenta en la mezcla, comportándose como si estuvieran en soluciones de mayor concentración.

Propiedades superficiales

El incremento de la actividad termodinámica de la proteína debido a la adición de un polisacárido incompatible promueve su adsorción en la interfase, incrementando la estabilidad en el caso de las emulsiones. La función del polisacárido no solo puede atribuirse al incremento de la viscosidad de la fase

continua, sino también al efecto sobre la adsorción en la interfase aceite / agua. A altas concentraciones, el polisacárido puede inducir una separación de fases y promover la encapsulación de las gotas de aceite por la fase enriquecida en proteína (Tolstoguzov, 1997).

Los hidrocoloides pueden influir de diferentes formas en la estabilidad de emulsiones o espumas. La adsorción de los mismos a la interfase está influida por el carácter hidrofílico / lipofílico, ácido / básico y la presencia de grupos específicos (Bergenståhl y col., 1995). Si el polisacárido se adsorbe en la interfase puede aumentar la repulsión estérica entre gotas o burbujas, estabilizando las emulsiones o espumas. Si la adsorción es incompleta o reversible, pueden formarse uniones por puentes entre las interfases, desestabilizando el sistema. Si no se adsorbe puede producirse un efecto de deplección y de atracción entre las gotas de emulsiones. Adicionalmente, el polisacárido influye en las características del solvente (Bergenståhl y col., 1995).

Propiedades de gelificación de las mezclas

La concentración crítica para gelificar de los agentes gelificantes disminuye en las soluciones mezcla. Las interacciones proteína - polisacárido pueden originar dos tipos de geles, geles rellenos o geles mixtos (Figura 6, Tolstoguzov, 1995). Los geles rellenos se obtienen cuando uno de los componentes puede formar una red continua en todo el sistema y el otro componente polimérico sirve como relleno del gel. Estos geles pueden ser de una fase (el relleno está en un estado molecular disperso) o en dos fases (la fase dispersa consiste en partículas líquidas o gel). Geles mixtos se obtienen cuando las dos macromoléculas forman redes continuas separadamente y debe ser tratado como un caso específico de redes poliméricas homogéneas e interpenetradas (Samant, 1993; Tolstoguzov, 1997). Los geles de mezclas de biopolímeros presentan propiedades viscoelásticas diferentes a las de uno solo de los componentes. (Doublier y col., 1992).

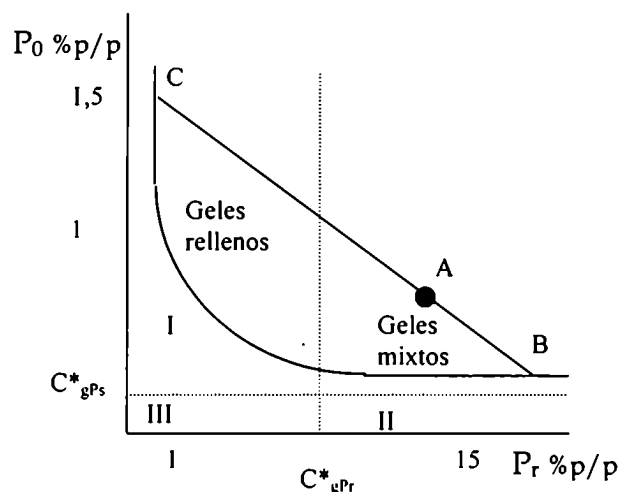


Figura 6: Diagrama de estado para mezclas de hidrocoloides (ambos capaces de formar geles), donde C^*_{gPr} y C^*_{gPs} son las concentraciones críticas para la gelificación de la proteína y el polisacárido. Bajo la curva binodal se forman sistemas homogéneos sin separación de fases: I: geles de polisacárido; II: geles proteicos y III: soluciones líquidas (Tolstoguzov, 1995).

5.5. Goma xántica

El xantano es un heteropolisacárido extracelular de alto PM: $\sim 2,5 \cdot 10^6$ Da producido como metabolito secundario durante la biosíntesis microbiana, cuya función es proteger al microorganismo manteniendo una mínima humedad y dar adherencia a un soporte. Su producción se realiza por fermentación en condiciones aeróbicas de diversas especies de *Xanthomonas*, siendo *X. Campestris* el microorganismo utilizado comercialmente para su síntesis (Urlacher y Dalbe, 1992). No presenta valor nutricional para los mamíferos (Staub y Ali, 1983).

La estructura del polisacárido está formada por una cadena de celulosa (1,4- β -D-glucosa) con cadenas laterales formadas por un trisacárido de α -D manosa, ácido β -D glucurónico y β -D manosa (Figura 7). El trisacárido está unido en posición 3 de la glucosa y ocurre en residuos de glucosa alternados, formándose una estructura repetitiva y regular del pentasacárido. La mitad de las manosas terminales contienen un residuo de ácido pirúvico unido en la posición 4 y 6 formando una unión quelato. La D-manosa unida a la cadena principal contiene un grupo acetilo en la posición 6. La distribución de grupos acetilo y pirúvico es

irregular, dependiendo de la cepa y las condiciones de fermentación. La conformación molecular, determinada por estudios de difracción de rayos-X de fibras de xantano, fue interpretada como una hélice estabilizada posiblemente por uniones de puente hidrógeno, y las macromoléculas en solución podrían ser consideradas como hélices rígidas que pueden sufrir una transición conformacional hacia un estado más flexible y desordenado a altas temperaturas. La temperatura de transición conformacional depende de la concentración de polímero y se puede determinar por distintas técnicas analíticas: rotación óptica, calorimetría, dicroísmo circular y viscosimetría (Urlacher y Dalbe, 1992); la presencia de sales provoca un aumento de dicha temperatura.

El xantano es muy soluble en agua caliente o fría, hidratándose el polímero fácilmente debido a las cadenas laterales, y dando lugar a soluciones altamente viscosas. Las soluciones viscosas son pseudoplásticas y no presentan carácter tixotrópico. La formación de una red débil y reversible entre las macromoléculas cuyas interacciones no llegan a formar un verdadero gel, debido a que las hélices no presentan tendencia a asociarse, explica la habilidad de las soluciones de xantano para estabilizar dispersiones como emulsiones, espumas o suspensiones y para actuar como espesante (Tanaka y Fukuda, 1976; Symers, 1980). Industrialmente se la utiliza en concentraciones de 0,05 – 1 %.

Las soluciones de goma xántica son estables en un amplio rango de pH: sólo pH extremos <2,5 ó >11, afectan las propiedades de las soluciones. El incremento de la temperatura de 10 a 90°C, en presencia de sales, afecta levemente la viscosidad de las soluciones. Las soluciones también son resistentes a la degradación enzimática, a ciclos de congelado - descongelado y a tiempos de mezclado prolongados, debido al carácter compacto de las dobles hélices que protegen el desdoblamiento de las cadenas (Urlacher y Dalbe, 1992). El xantano presenta estabilidad y compatibilidad a altas concentraciones de sales, pero es incompatible con cationes multivalentes presentando cierto carácter aniónico y

siendo compatible con surfactantes y preservativos no-iónicos o aniónicos e insoluble en muchos solventes orgánicos.

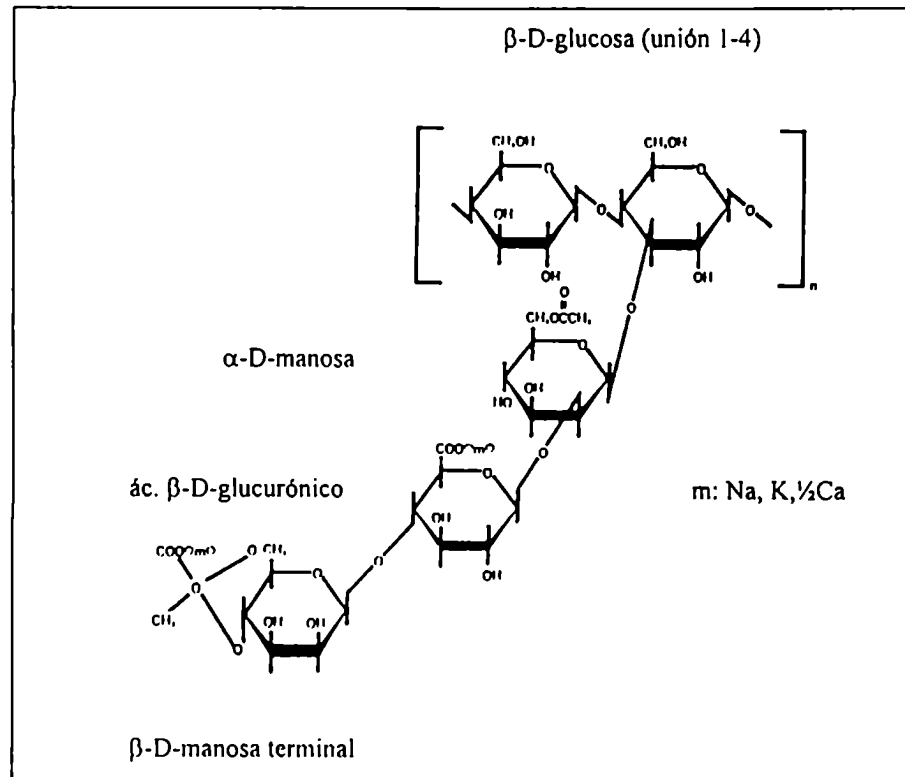


Figura 7: Estructura primaria de la goma xántica (Sand, 1983).

La interacción de goma xántica con otros hidrocoloides presenta propiedades interesantes, al combinarse propiedades reológicas y funcionales complementarias. Para ejemplificar estas interacciones pueden mencionarse entre otras: i) con goma guar: interacción sinérgica que incrementa el módulo elástico y la viscosidad de las soluciones; ii) con goma algarroba: interacción sinérgica formando un gel muy cohesivo y termorreversible (las gomas separadamente no forman geles); iii) con glucomananos: interacción sinérgica fuerte formando geles termorreversibles aún a bajas concentraciones de gomas; iv) con almidón: interactúa previniendo la retrogradación del almidón y haciendo a las soluciones de almidón más estables durante el almacenamiento a temperatura ambiente, a bajos pH y a ciclos de congelado-descongelado (Urlacher y Dalbe, 1992).

Las interacciones de goma xántica con distintas proteínas comenzaron a estudiarse en los últimos años, encontrándose tanto formación de complejos electrostáticos como condiciones de incompatibilidad termodinámica. Se han realizado trabajos con proteínas lácteas, prevaleciendo las interacciones hidrofóbicas; ovoalbúmina, caseína (Schmitt y col., 1998), proteínas de suero (Syrbe y col., 1995; Sanchez y col., 1997; Bryant y col., 2000), aislado de soja (Sánchez y col., 1995; Xie y col., 1997 y 1998), β -lactoglobulina (Zasytkin y col., 1996).

El xantano tiene numerosas aplicaciones: se utiliza en bebidas para mejorar su palatabilidad y la liberación de aromas, en los jugos de naranja para estabilizar la turbidez, como espesante y estabilizante en muchos alimentos enlatados (por su estabilidad térmica), en rellenos de frutas para tartas (por mejorar la estabilidad frente al congelado-descongelado y por disminuir la sinéresis), en salsas que contienen altas concentraciones de sales o ácidos (por su estabilidad en esos medios), entre otros (Whistler y Daniel, 1993).

5.6. *Carragenano κ*

La goma carragenano se extrae de algas rojas pertenecientes a la clase Rhodophyceae (principalmente de las especies *Chondrus crispus*, *Eucheuma* y *Gigartina*) que crecen principalmente en las costas de Irlanda, Gran Bretaña, Francia y España, y en Canadá (también se han encontrado en Argentina, Chile, Perú y Brasil). Estos polisacáridos se encuentran en la estructura celulósica de las plantas y se extraen por solubilización en agua caliente y precipitación con alcohol. Los carragenanos no tienen función nutricional (Staub y Ali, 1983) pero proveen a los alimentos propiedades funcionales que justifican su extensivo uso en la industria alimentaria para espesar, estabilizar y/o gelificar sistemas alimenticios (Thomas, 1992).

Los carragenanos son una compleja mezcla de al menos cinco polímeros diferentes, designados kappa (κ), lambda (λ), mu (μ), iota (ι) y nu (ν). Estos hidrocoloides son polisacáridos lineales de alto PM constituidos por unidades de galactosa y/o 3,6-anhidrogalactosa (3,6-AG), ambos sulfatados (lo cual les confiere carácter aniónico) o no sulfatados, unidos por uniones glicosídicas α -(1,3) y β -(1,4) (Figura 8). Las distintas fracciones difieren en el contenido de éster sulfato (κ : 25%; ι : 32% y λ : 35%) y de 3,6-anhidrogalactosa (κ : 34%; ι : 30% y λ : bajo o nulo%). El carragenano ι se diferencia del κ por la presencia de un grupo sulfato adicional en el C2 de la 3,6-anhidro α -D-galactosa. Las fracciones μ y ν están formadas por cadenas lineales de β -(1,4)-Dgalactosa-4-sulfato y β -(1,3)-Dgalactosa-6-sulfato, teniendo el carragenano ν un grupo sulfato adicional en el C2; por tratamiento en medio básico de las fracciones μ y ν se obtienen los carragenanos κ e ι respectivamente (se elimina el grupo 6 sulfato y se forma el grupo anhidro, de forma similar como ocurre en las algas por transformación enzimática, por lo cual las formas μ y ν se denominan precursores biológicos). El carragenano λ está formado por una cadena lineal de β -(1,4)-Dgalactosa-2-sulfato y 2,6-disulfato- α -(1,3)-D-galactosa (Sand, 1983).

Los carragenanos tienen propiedades diferentes según su composición. Todos los carragenanos son solubles a altas temperaturas, formando soluciones de baja viscosidad; a bajas temperaturas sólo son solubles el car. λ y las sales de Na^+ del car. κ y ι . No presenta carácter viscosante a altas temperaturas, presentando un importante aumento de la viscosidad en el punto de gelificación. Los polímeros son estables por encima de $\text{pH}=7,0$, se degradan ligeramente a $\text{pH } 5,0-7,0$ y rápidamente por debajo de $\text{pH } 5,0$. Por espectrometría infrarroja puede determinarse las características estructurales de los carragenanos, presentando zonas regulares de cadenas enrolladas.

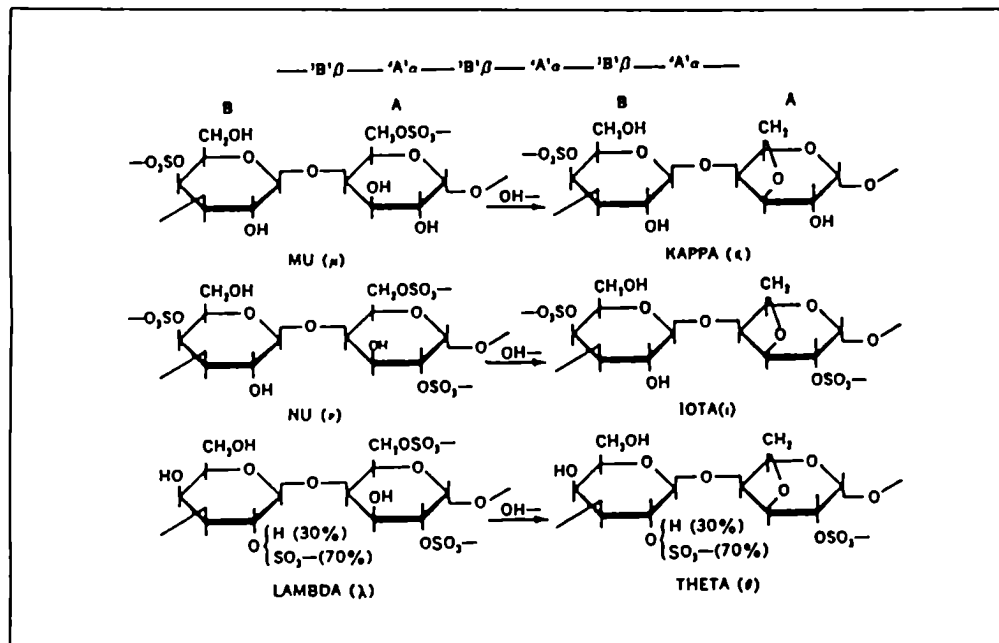


Figura 8: Estructura primaria de los carragenanos (Sand, 1983).

La gelificación del κ carragenano ocurre por enfriamiento y ha sido atribuida a dos etapas de reacción: la primera involucra una transición “enrollado – doble hélice”, donde las macromoléculas gelifican por unión de dos cadenas por medio de las zonas regulares formando dominios de doble hélices entrelazados y posteriormente se forma una red por asociación de estos dominios mediada por cationes específicos (selectividad por el tamaño y la facilidad de incorporarse en las zonas de unión, principalmente K^+). En presencia de iones no específicos puede ocurrir el ordenamiento conformacional necesario para que ocurra la gelificación, sin formación de gel pero ocurriendo la agregación. La estructura de los geles está estabilizada por uniones hidrógeno fácilmente rompibles por aumento de la temperatura y que le otorgan características termorreversibles a los geles (Figura 9) (Hermansson, 1995; Morris, 1998).

Los carragenanos interaccionan sinérgicamente con muchas otras gomas, en especial con la de algarrobo, en la que, dependiendo de la concentración, incrementan la viscosidad, la firmeza de los geles o bien la elasticidad de los mismos. También interaccionan con goma guar, goma ghatti, goma tragacanto, alginato y pectina. Son utilizados en productos alimenticios con base tanto acuosa como láctea para estabilizar suspensiones.

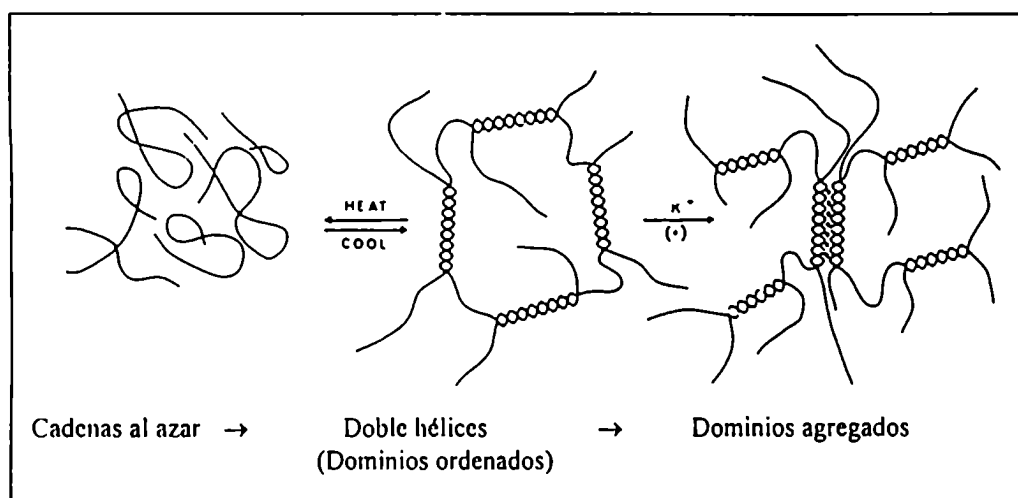


Figura 9: Formación de geles de κ -carragenano (Glicksman, 1983)

En helados, el carragenano protege a la caseína y previene la precipitación durante el procesado inducida por otros componentes como CMC (carboximetilcelulosa), galactomananos o goma xántica. En el producto final reduce la sinéresis y favorece la textura. Su poder estabilizante es usado también en postres a base de leche y flanes "sin huevo". En productos a base de queso actúa como estabilizante de la emulsión, y en postres helados inhibe la formación de grandes cristales de hielo (se lo usa generalmente con otras gomas). En productos de panadería actúa como acondicionante de las masas, contribuyendo al incremento del volumen final. Su uso en tartas mejora el aspecto y la textura de las masas, mientras que en alimentos sometidos a fritura reduce la absorción de aceite (Whistler y Daniel, 1993).

Los carragenanos presentan una alta capacidad para estabilizar la leche, la cual es dependiente del número y posición de los grupo sulfato en la molécula. El anión carragenano reacciona con las proteínas para formar un complejo por adsorción del carragenano en la superficie de las miscelas de caseína, involucrando la participación de iones calcio en la formación de redes proteína-carragenano que pueden existir como dispersiones coloidales estables (Stainsby, 1980; Schmidt y Padua, 1982; Hansen, 1982). Diversos estudios de interacción de κ - carragenano con proteínas lácteas en su conjunto, o con las proteínas separadamente (β -lactoglobulina, κ -caseína, proteínas del suero) han planteado modelos combinados de incompatibilidad termodinámica con complejos electrostáticos (Drohan y col., 1997; Mleko y col., 1997; Lundin y col., 1998; Tziboula y col., 1998a y 1998b; Capron y col., 1999; Ould Eleya y col., 2000). Existen también trabajos de interacciones con lisozima (Schmitt y col., 1998); proteína de soja (Mouécoucou y col., 1995) y con 11S de leguminosas (Burova y col., 1992).

5.7. Interacciones de proteínas de soja con polisacáridos.

Se ha estudiado el efecto de interacciones electrostáticas con polisacáridos en algunas propiedades funcionales: estabilización de emulsiones por incremento de la viscosidad de la fase acuosa y disminución del tamaño de gota por presencia de alginatos, carboximetil celulosas y goma xántica (Lippi y col., 1981; Kiosseoglou y Doxastakis, 1988; Xie y col., 1997); aumentos de viscosidad y absorción de agua por presencia de alginatos, goma guar, propilen glicol (Sánchez y col., 1995); formación de films y estabilización de espumas por interacción con alginatos (Shih, 1994); inhibición de la proteólisis por la unión de carragenano a la proteína de soja en un amplio rango de pH (Mouécoucou y col., 1995).

Existen diversos trabajos sobre la formación de complejos covalentes conjugados entre proteína de soja y polisacáridos: con galactomananos,

disminuyeron la alergenicidad de la proteína de soja enmascarando estructuras antigénicas y mejorando la estabilidad térmica y las propiedades emulsificantes (Babiker y col., 1998); con dextrano mejoraron las propiedades emulsificantes y exhibieron propiedades antibacterianas (Kobayashi y col., 1991; Kato y col., 1988); con alginatos mejoraron las propiedades emulsificantes y estabilizantes (Lippi y Taranto, 1981); con alginatos permitieron la mejora en las propiedades de films comestibles y de films biodegradables usables como material de empaque renovable (Shih, 1994; Rhim y col., 1999).

Existen pocos estudios vinculados a las propiedades de espumado de mezclas proteína de soja – polisacárido. Ahmed y Dickinson (1991) estudiaron las propiedades de espumado de mezclas de proteína de soja + PGA, encontrando que a pH menores que el pI, la formación de complejos reduce la capacidad espumante e inhibe a las especies activas superficialmente de migrar rápidamente a la interfase, tanto por insolubilización (complejos de coacervación) o porque los grupos hidrofóbicos están impedidos de adsorberse debido a la contracción molecular por formación de complejos. Xie y Hettiarachchy (1998) encontraron mayores estabilidades al drenado y capacidades de espumado por adición de goma xántica a bajas concentraciones proteicas, en un amplio rango de pH y de fuerza iónica. Sin embargo las relaciones polisacárido / proteína fueron muy altas, enmascarándose los resultados por el alto poder viscosante de la goma.

OBJETIVOS

Desarrollar nuevas metodologías para evaluar los diferentes mecanismos que intervienen en la desestabilización de espumas proteicas.

Los métodos que existen actualmente para el estudio de la estabilidad de espumas utilizan en su mayoría bajas concentraciones proteicas; aquellos métodos que son aplicables a altas concentraciones dan una información parcial sobre los procesos de desestabilización involucrados. El desarrollo de nuevos métodos permitirá el análisis de variables estructurales y del medio sobre las propiedades de espumado de proteínas en las concentraciones en las cuales se encuentran en los alimentos.

Estudiar el efecto de la concentración proteica y de los cambios producidos por la desnaturalización térmica, en las propiedades de espumado de proteínas de soja.

Si bien existen numerosos estudios sobre las propiedades de espumado de proteínas de soja, no existen estudios sistemáticos sobre el comportamiento de espumas a altas concentraciones de proteína en relación al estado nativo o desnaturalizado. Esto permitirá un aprovechamiento racional de las potencialidades de las proteínas de soja para distintas aplicaciones.

Estudiar el efecto de las interacciones entre polisacáridos (gelificantes y no gelificantes) y proteínas de soja en las propiedades de espumado.

Adicionalmente a los efectos espesantes y gelificantes de los polisacáridos, estos pueden presentar efectos sinérgicos con las proteínas debido a fenómenos de limitada compatibilidad termodinámica, que pueden tener importancia tecnológica. La bibliografía sobre el tema es escasa, siendo objeto del presente trabajo el profundizar los conocimientos básicos y definir posibles aplicaciones en alimentos espumados.

MATERIALES Y METODOS

1. Materiales

1.1. Aislados proteicos

Se obtuvieron en el laboratorio aislados proteicos de soja nativo (NSP) y desnaturalizado térmicamente (DSP) a partir de harina desgrasada de soja (proporcionada por Sanbra S.A., Brazil). Esta se extrajo durante 2 hs a 25°C en medio alcalino con agua destilada equilibrada a pH 8,0 con NaOH (0,25 mol/l) siendo la relación de agua: harina de 10: 1. Luego se centrifugó a 1200xg durante 30 minutos. El sobrenadante se llevó a pH 4,5 con HCl (3 mol/l) para la precipitación isoelectrica de la proteína; luego se centrifugó a 1200xg durante 30 minutos. El precipitado obtenido se lavó 2 veces con agua destilada, se neutralizó a pH 7,0 con NaOH y se congeló para su posterior liofilización.

Para realizar la desnaturalización térmica se calentó una solución de proteína nativa al 5%P/p en agua destilada, durante 30 min. a 100°C (condición no gelificante).

Ambos aislados se liofilizaron a temperatura ambiente en un liofilizador Stokes y se molieron finamente.

El contenido de nitrógeno se determinó por el método de micro Kjeldahl, usando un Kjeltex Auto Analyzer 1030 (Tecator, Sweden). El contenido proteico calculado como N x 6,25 fue de 90,5%.

1.2. Polisacáridos

Se utilizarón goma xántica y κ -carragenano (SANOFI; Bioindustrias, Argentina).

2. Métodos

2.1. *Preparación de las soluciones de proteína y proteína / polisacárido.*

Las soluciones se prepararon en buffer K_2HPO_4/NaH_2PO_4 0,005M de pH 7, Na_3N 0,02%. Cuando se prepararon las soluciones mixtas de proteína y polisacárido, las soluciones separadas de aislado proteico (NSP o DSP) y de goma (0,1 - 0,5%p/p) se prepararon a temperatura ambiente al doble de la concentración final deseada, y luego se mezclaron volúmenes iguales (según lo sugerido por Dickinson y col., 1993). Para homogeneizar los sistemas las soluciones se agitaron durante 2 minutos.

Las propiedades de las soluciones fueron evaluadas luego de 24 hs de almacenamiento a 5°C, para permitir la hidratación completa de las proteínas.

2.2. *Determinación de la viscosidad de las soluciones*

Se determinó con un viscosímetro Brookfield LVT o con un Brookfield DV-LVT con cono y plato a 25°C, en el rango de velocidad de deformación 2,25 seg⁻¹ a 450 seg⁻¹. Se consideró el esfuerzo de corte como el promedio de los valores de ascenso y descenso a cada velocidad de deformación (Costell y Duran, 1979). Las muestras no presentaron tixotropía. Se aplicó la ley de la potencia: $\tau = k_v \cdot D^n$, donde τ es el esfuerzo de corte, D es la velocidad de deformación, k_v es el coeficiente de consistencia y n es el índice de flujo.

2.3. *Determinación de sólidos insolubles*

Se centrifugaron 5 ml de solución de aislado proteico (NSP o DSP) de concentración entre 2% y 8% a 8000 rpm durante 10 min. El precipitado obtenido se liofilizó para obtener su peso y determinar el %sólidos insolubles/sólidos totales.

2.4. *Calorimetría diferencial de barrido (DSC)*

2.4.1. Desnaturalización de proteínas

Las muestras se analizaron en un calorímetro DSC Du Pont modelo 910 conectado a un registrador Hewlett Packard 7046 B. Se colocaron 15 - 20 mg de una dispersión de proteína 12%p/p en una cápsula de aluminio prepesada, que se cerró herméticamente y se pesó nuevamente. Una cápsula doble vacía se utilizó como referencia. Las cápsulas se calentaron de 30 a 130°C, a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. La cantidad de proteína se determinó por diferencia entre el peso de las cápsulas secadas en estufa a 105°C y el peso de las cápsulas vacías. La calibración de la temperatura y el coeficiente de la celda se determinaron usando indio como referencia. El área del termograma se midió con un analizador de imágenes Morphomat 30 Zeiss y se calcularon las entalpías de desnaturalización térmica (ΔH J/g.masa seca).

Para las muestras con polisacárido y proteína se utilizó un calorímetro DSC Perkin - Elmer con software TAS7 y se realizó el siguiente ciclo de calentamiento: 30°C → 120°C → 30°C → 120°C.

2.4.2. Fusión de geles

La determinación de temperaturas de fusión de geles puede realizarse por DSC en condiciones donde la estructura del gel es térmicamente reversible

(Biliaderis, 1990). Se utilizó un calorímetro diferencial de barrido Mettler TA 4000 con software Mettler TA72. Las muestras se calentaron desde 5°C hasta 70°C a 10°C/min. Para obtener la energía de activación del proceso de fusión se usaron distintas velocidades de calentamiento (2,5 a 20°C/min) y se aplicó el método de Ozawa (1970).

2.5. *Hidrofobicidad superficial (aromática)*

Se determinó usando ácido 1- anilino -naftalen sulfónico (ANS) como sonda de fluorescencia hidrofóbica. Las mediciones se hicieron de acuerdo al método de Kato y Nakai (1980) en dispersiones protéicas al 6%p/p en ausencia de SDS. La concentración proteica se determinó utilizando el método de Lowry (Lowry y col., 1951). Cada solución se diluyó en buffer fosfato 0,01 M de forma tal de obtener una serie de muestras de concentración protéica en el rango 0,1 - 0,001 mg/ml.

El método se estandarizó por ajuste de la intensidad de fluorescencia relativa (FI), leída en un espectrofluorómetro Perkin - Elmer 2000, a un 80% de la escala cuando 10µl ANS (8mM en buffer fosfato 0.1M pH 7) se adicionaron a 2 ml de metanol absoluto. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 364 nm y 484 nm, respectivamente.

Se prepararon dos series de tubos de 2 ml de cada dilución, donde una serie fue usada como blanco y a la otra se le adicionó 40 µl de ANS a cada tubo. La intensidad de fluorescencia (FI) neta a cada concentración de proteína se determinó restando a la FI correspondiente a la muestra con ANS, la FI de la muestra sin sonda. Como índice de la hidrofobicidad superficial se utilizó la pendiente inicial (S_0) de la curva de FI versus concentración de proteína %p/p (calculado por análisis de regresión lineal). La pendiente es función del número de sitios de unión y de la naturaleza y cantidad de los grupos formando estos sitios, pues ambos determinan la afinidad y la energía transferida a la sonda.

2.6. Determinación de la tensión superficial

2.6.1. Método del estalagmómetro de Traube para valores de equilibrio (Glasstone, 1979)

Las gotas se forman en la extremidad de un tubo vertical, y el peso de la gota, en el instante que se desprende del tubo, depende del radio externo de este y de la tensión superficial del líquido. La tensión superficial se obtiene por comparación con el comportamiento del agua, según:

$$\gamma_{sn} = \frac{\gamma_{H_2O} \cdot n^{\circ}gotas_{H_2O} \cdot \delta_{sn}}{n^{\circ}gotas_{sn} \cdot \delta_{H_2O}}$$

donde γ_{sn} y γ_{H_2O} ; δ_{sn} y δ_{H_2O} corresponden a la tensión superficial y la densidad, de la solución y del agua respectivamente.

2.6.2. Mediciones dinámicas de la tensión superficial por el método de la placa de Whilhelmy

Se realizaron con un tensiolaminómetro KRUESS K12 V3.44, con una placa de platino. Antes de cada medición, la placa fue brevemente flameada en la llama de un mechero Bunsen. Las mediciones se realizaron en recipientes plásticos descartables de 30 ml de capacidad, termostatizados a 25°C. Las mediciones se efectuaron durante 6 hs, y se calculó la presión superficial como $\pi = \gamma_0 - \gamma_{sn}$; donde γ_0 es la tensión superficial del agua y γ_{sn} corresponde a la tensión superficial de la solución.

2.7. Viscosidad superficial (mediciones de esfuerzo de corte)

La viscosidad superficial de las soluciones proteicas se estudió aplicando el método usado por Kim (1985) mediante un rotor de diseño especial consistente en un anillo de mínino espesor (Figura 1) unido a un viscosímetro Brookfield LVT

que se hace girar en la superficie del líquido. Las mediciones se realizaron en función del tiempo, y una vez alcanzado el equilibrio se midió a diferentes rpm entre 0,3 - 60 rpm. El torque leído fue considerado como una medición de la viscosidad superficial.

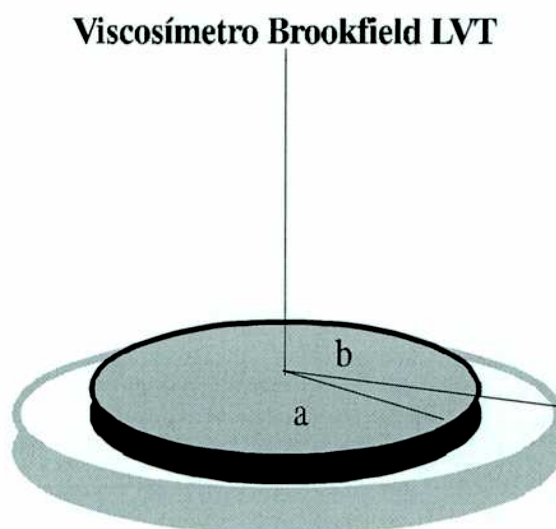


Figura 1: Dispositivo para medir viscosidad superficial donde a es el radio del disco: 2,5 cm y b es el radio de la placa de muestra: 2,9 cm.

3. Propiedades de espumado por el método de burbujeo

Se utilizó un aparato de burbujeo Grosseron PM 930 (Figura 2), basado en la medida conductimétrica de la solución (Loisel y col., 1993), acoplado con un sistema óptico de detección del volumen de espuma. Las determinaciones se realizaron en un tubo de acrílico transparente (3 cm de diámetro, 30 cm de altura) equipado con un par de electrodos verticales localizados en la base de la columna y un disco metálico poroso a través del cual se inyecta aire a un caudal de flujo constante (caudal de aire de 15 ml/min). El flujo de gas es regulado por una válvula que direcciona el pasaje del mismo a la columna o a un sistema compensador de presión que previene el escape de la solución en ausencia de burbujeo. Los análisis se hicieron sobre 12 ml de solución proteica. El equipo mide la conductividad de la solución presente entre los electrodos en función del

tiempo, y usando la conductividad a tiempo 0 como referencia, se calcula el volumen de líquido bajo la espuma. El aire burbujea hasta que la espuma alcanza un volumen fijo (35 ml). La evolución de la espuma se registró durante 35 minutos. El líquido incorporado a la espuma se calculó por diferencia entre el nivel inicial de solución proteica y el volumen de líquido bajo la espuma a tiempo t que es determinado por la conductimetría entre los electrodos. Los datos fueron recolectados por un microcomputador que también controló la secuencia de las operaciones. A partir de los datos registrados se determinaron distintos parámetros para caracterizar las propiedades de espumado de las muestras.

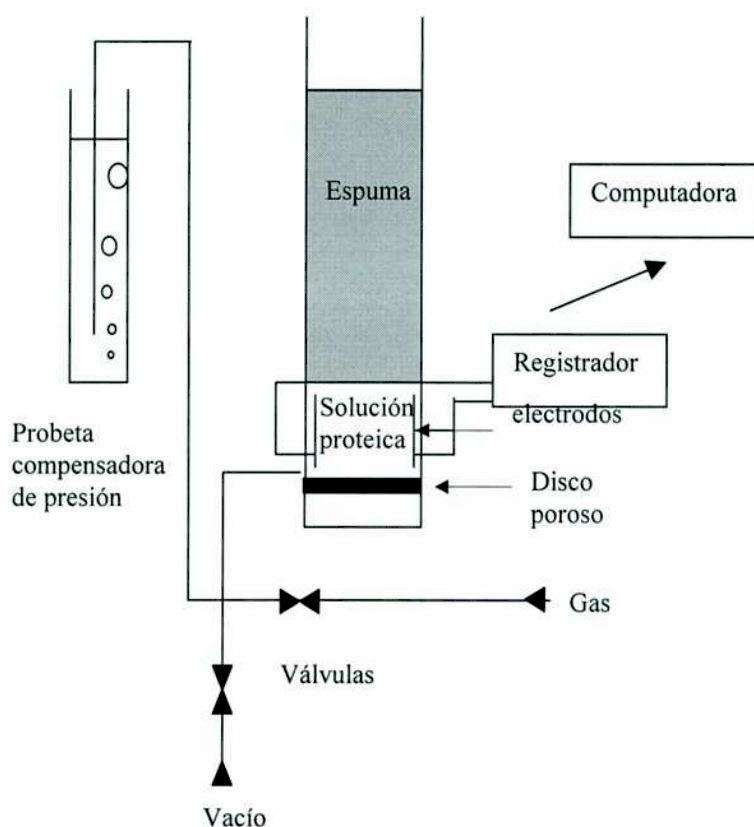


Figura 2: Esquema del equipo de burbujeo utilizado

3.1. Capacidad de espumado

Para caracterizar las espumas se determinaron el volumen de gas inyectado " V_{gi} ", el líquido máximo incorporado a la espuma " $L_{m\acute{a}x}$ " y el volumen de espuma máximo " V_{EM} " ($V_{EM} = 35\text{ml} - 12\text{ml} + L_{m\acute{a}x}$) (Figura 3).

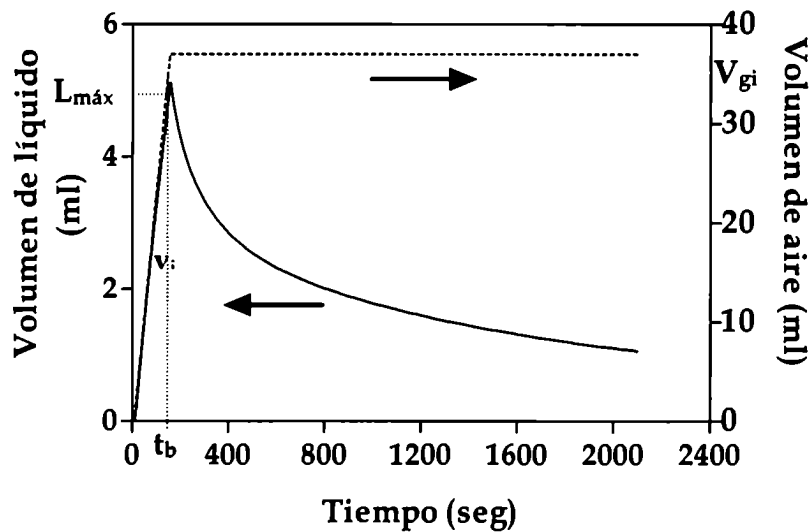


Figura 3: Volumen de líquido incorporado a la espuma y volumen de aire necesario para formarla, para NSP 2%.

La capacidad de espumado se evaluó con los parámetros capacidad espumante " CE " y densidad de la espuma " δ_E " definidos como:

$$CE = \frac{V_{EM}}{V_{gl}} \cdot 100 \quad \text{y} \quad \delta_E = \frac{L_{m\acute{a}x}}{V_{EM}} \cdot \delta_{sm}$$

El valor de CE es mayor cuanto menor es V_{gi} lo cual corresponde a un menor tiempo de burbujeo y por lo tanto a un mayor rendimiento del gas insuflado. Esto ocurre cuando se forman burbujas muy pequeñas rodeadas de películas bien hidratadas, lo que minimiza la difusión de gas. En el método de burbujeo, el mayor poder espumante de una proteína está dada por la habilidad

de incorporar más líquido durante el proceso de formación de espuma, se forman espumas densas (concepto inverso al de expansión en los métodos de batido).

Se determinó también la velocidad de incorporación de líquido en la espuma (v_i : ml/min.) como la pendiente inicial de la curva de la Figura 3 (Wagner y col., 1996).

3.2. *Estabilidad de las espumas*

Una vez cesado el pasaje de gas, la determinación de la conductividad en función del tiempo se puede transformar a la medición del decaimiento del volumen de líquido remanente en la espuma. Numerosos parámetros pueden caracterizar la estabilidad entre ellos el $t_{1/2}$ (s): tiempo para que drene la mitad del líquido incorporado a la espuma al finalizar el período de burbujeo; puede obtenerse también una constante específica de drenado como $K=(1/L_{\max} \cdot t_{1/2})$ [K]:(ml.min)⁻¹ (Wagner y col., 1996).

El cálculo de $t_{1/2}$ se realizó como $t_{1/2} = t (L_{\min} + (L_{\max} - L_{\min})/2) = t ((L_{\min} + L_{\max})/2)$ donde $L_{\min}$ es el líquido que queda en la espuma al concluir la medición. El siguiente modelo, de ajuste de dos exponenciales, fue aplicado a las curvas de decaimiento (Monsalve y Schechter, 1984):

$$V(t) = A_1 \cdot e^{(-t/\tau_1)} + A_2 \cdot e^{(-t/\tau_2)}$$

donde $V(t)$ es el volumen de líquido en la espuma al tiempo t (s) y A_1 , τ_1 , A_2 y τ_2 son constantes. La primer exponencial corresponde al proceso de drenaje gravitacional y la segunda al de difusión de gas interburbuja, siendo τ_1 y τ_2 los tiempos de relajación de ambos procesos respectivamente (Wright y Hemmant, 1987).

4. Propiedades de espumado por el método de batido

Se usó un agitador Griffin & George de una paleta con 4 divisiones con la velocidad regulada con un reóstato. La formación de la espuma se produjo por agitación de 30 ml (40 ó 50 ml) de solución proteica durante 3 minutos, tiempo suficiente para alcanzar el máximo de espuma (Kitabake y Doi, 1982), a 6000 rpm, en una probeta graduada de 3 cm de diámetro.

4.1. Capacidad de espumado

La expansión de la espuma (FE%) se calculó como:

$$\%FE = \frac{(V_E - V_{sn}) \cdot 100}{V_E}$$

donde: V_E es el volumen de espuma obtenido (tomado como el total del volumen de la dispersión) y V_{sn} el volumen de solución a partir del cual se produjo la espuma.

4.2. Estabilidad de las espumas

Una vez espumada la muestra se espera 1 minuto antes de tomar la espuma cuya estabilidad será evaluada. Durante este tiempo drena el líquido que no fue incorporado a la espuma.

4.2.1. Método de la pipeta para determinación de velocidades de drenado

Se toman 10 ml de espuma en una pipeta graduada (diámetro interno $8 \pm 0,5$ mm, longitud de la columna de espuma: 210 ± 5 mm) y se mide el volumen de líquido drenado en función del tiempo (Elizalde y col. 1991) a temperatura controlada, en un baño termostatzado (transparente).

4.2.2. Método implementado para la determinación simultánea de velocidades de drenado, desproporción y colapso

Se toman 50 ml con una pipeta de punta truncada y se transfieren a una probeta de vidrio especialmente diseñada y graduada, en la que se miden simultáneamente el líquido drenado, la viscosidad de la espuma y el volumen de espuma, en función del tiempo. Para las mediciones de la viscosidad aparente de la espuma se utilizó un viscosímetro Brookfield LVT con sensor en forma de T (spindle T-C) y accesorio helipath a una velocidad de 0,3 rpm y un trayecto de 4 mm. Posteriormente se utilizó un viscosímetro Brookfield DV-LVT acoplado a una computadora, que permitió automatizar la metodología. El uso de los programas de software DVLoader y Wingather permitió la programación y el registro de las mediciones. En la Figura 4 se muestra una foto del equipamiento utilizado.

Todas las mediciones se hicieron por lo menos por duplicado para cada solución proteica.

Se debió estandarizar la ubicación del sensor, pues la curva y los parámetros obtenidos resultaron altamente sensibles a la cantidad de espuma por encima del sensor.

Distintas probetas (todas de vidrio pirex) se utilizaron en la medición de estabilidad de espumas, pues la geometría de las mismos y la superficie de contacto influyen en los procesos de desestabilización.

Probeta A (utilizada en el estudio del efecto de distintas concentraciones proteicas): diámetro interno de la parte superior: 36 mm; diámetro interno de la parte inferior: 20 mm.

Probeta B (utilizada en el estudio de la interacción proteína - polisacárido): diámetro interno de la parte superior: 37 mm; diámetro interno de la parte inferior: 13 mm (Figura 5).

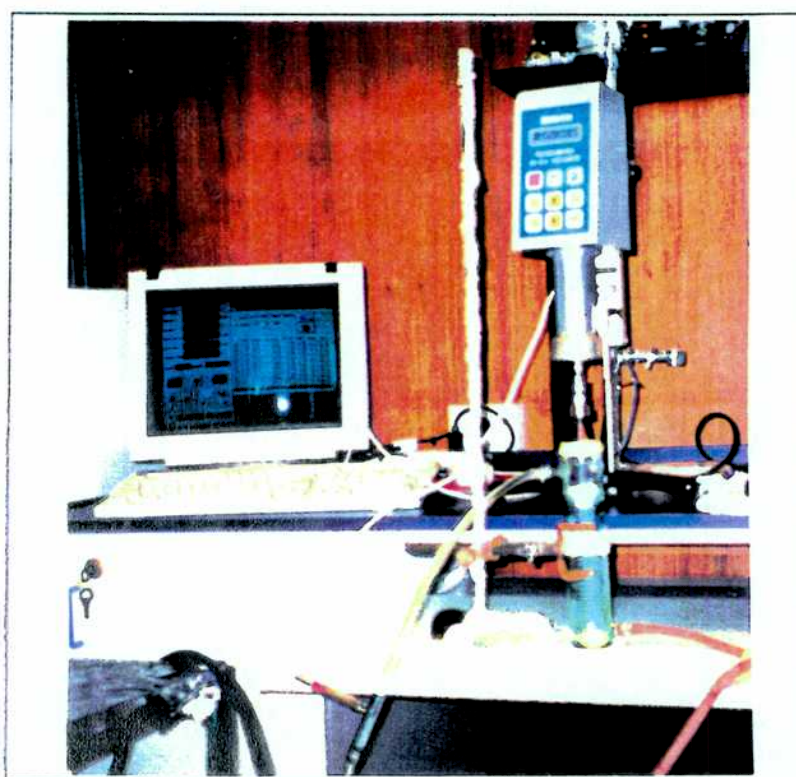


Figura 4: Dispositivo desarrollado para medir estabilidad de espumas.

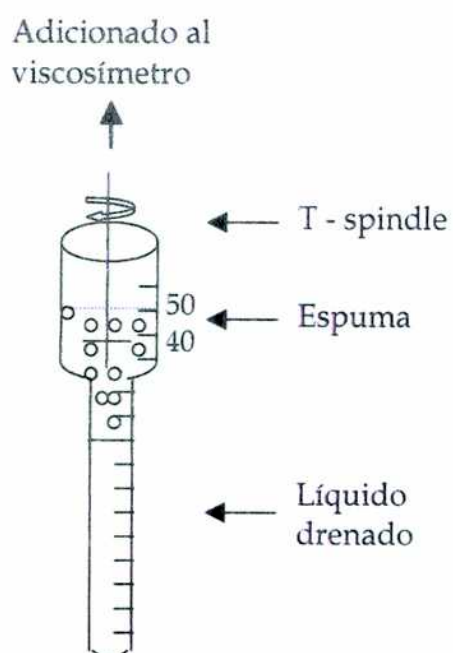


Figura 5: Detalle de la probeta diseñada para el estudio de estabilidad de espumas.

Otras especificaciones sobre la implementación del método y la obtención de los distintos parámetros de estabilidad serán detalladas en la primera parte de los resultados.

4.2.3. Estudio de sistemas que gelifican

Se colocaron 10 ml de espuma en tubos de ensayo de 10 ml graduados y se almacenaron a distintas temperaturas entre 5 - 45°C. También se estudió el comportamiento de espumas previamente gelificadas por almacenamiento durante 1 h a 5°C. El volumen de líquido drenado y la altura de espuma se registraron en función del tiempo.

4.3. *Determinación de la composición proteica en solución y en la interfase aire - agua por electroforesis en geles de poliacrilamida*

A fin de determinar la composición de las proteínas retenidas en la interfase, las espumas una vez formadas, se traspasaron al cuerpo de una jeringa donde el líquido drenó por gravedad. El líquido drenado se recogió en diferentes tubos y luego de haber drenado el 90% del líquido, se separó la espuma remanente.

La composición proteica de las soluciones usadas para formar las espumas y de las espumas remanentes luego del drenado del 90% del líquido, fueron analizadas usando geles de poliacrilamida.

Las electroforesis se realizaron en un aparato Bio-Rad Mini-Gel (geles de 6 cm x 9 cm, espesor 0,5 mm), en condiciones desnaturizantes usando sodio-dodecil-sulfato (SDS), de tal forma que la separación de proteínas se basara principalmente en su peso molecular.

Buffer para gel de separación: 0,4%p/v SDS; 1,50M Tris-HCl (pH=8,8)

Buffer para stacking gel: 0,4%p/v SDS; 0,5M Tris-HCl (pH=6,8)

Buffer de corrida: 0,1%p/v SDS; 0,025M Tris-HCl (pH=8,3); 0.192M Gly

Buffer de muestra: 2.0%p/v SDS; 0.06M Tris-HCl (pH=6,8); 25%v/v glicerol; 0,1%p/v azul de bromofenol; en algunos casos se adicionó 0,0144M β -mercaptoetanol.

Solución madre de acrilamida: 30%p/v acrilamida, 0,8%p/v bisacrilamida.

El gel de stacking se realizó a una concentración de 7%p/v acrilamida y el gel de separación a 12%p/v acrilamida (la polimerización se inició por agregado de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 10%p/v y TEMED 0.5%v/v). Se sembraron 20 μl de soluciones con 1-2 μg proteína/ μl por calle. Las corridas se realizaron a 200V, a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora. Los geles se fijaron y colorearon con Coomassie Blue R-250 (0,1%p/v) en agua:metanol:acético 4,5:4,5:1 durante 3 horas. Posteriormente se decoloraron con agua:metanol:acético 8:1:1. Los pesos moleculares de las fracciones proteicas se estimaron usando un kit de estándares MW - SDS de Bio Rad (PM: 200 kDa Miosina; 116 kDa β -galactosidasa; 97,4 kDa fosforilasa; 66,2 kDa seroalbúmina bovina; 45 kDa ovoalbúmina; 31 kDa anhidrasa carbónica; 21,5 kDa inhibidor de tripsina y 14,4 kDa lisozima).

Para el análisis de los geles se utilizó un densitómetro de imágenes BIO RAD Modelo GS-670. El análisis de la intensidad relativa de las bandas se realizó con el software Molecular Analyst, BIO RAD.

La correlación entre la concentración de la subunidad proteica y el área integrada del pico de las mediciones densitométricas del gel, se examinó según lo sugerido por Hunt y Dalglish (1994), encontrándose una relación lineal. Para el análisis de los perfiles no se tuvieron en cuenta ni el pico del frente ni el background. Las fracciones proteicas remanentes en el stacking gel fueron siempre menores del 2% del total de la proteína, lo cual permitió hacer un análisis válido. Cada muestra fue por lo menos corrida por duplicado en diferentes geles. Los valores de las desviaciones standard de las diferentes bandas fue de 1-5% de los valores promedio y en pocos casos cercanos al 10%.

A pesar de que pudieron ser identificados diferentes componentes presentes en el aislado de soja, para el análisis cuantitativo sólo se consideraron las siguientes fracciones: las subunidades α' , α y β de la β -conglucina, la subunidad AB y los polipéptidos A y B de la glicina y las bandas correspondientes a agregados de alto peso molecular (>200 kDa) y a agregados de bajo peso molecular (120 kDa), denominados HMW y LMW respectivamente.

5. Propiedades de gelificación de κ -carragenano en presencia de proteína de soja

5.1. Método para el estudio de la dinámica de gelificación

Las soluciones (inicialmente a 35°C) se enfriaron en un baño termostatzado a 20°C. La dinámica de gelificación se evaluó mediante el registro de la evolución de la viscosidad aparente y de la temperatura simultáneamente durante 1 h, con un viscosímetro Brookfield DV-LVT, provisto de un sensor en forma de T (spindle T-C) a una velocidad de 0,3 rpm, en una celda especialmente diseñada (Figura 6).

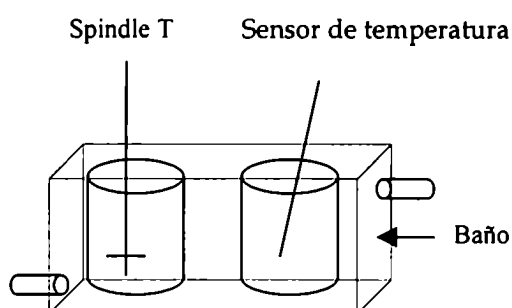


Figura 6: Dispositivo para medir velocidad y temperatura de gelificación.

Se utilizó conjuntamente un accesorio Helipath que mueve el eje de arriba hacia abajo (trayecto de 4 mm), de forma tal que la T recorre un camino helicoidal por el cual está en contacto con estructuras de gel que no han sido perturbadas y se evita la formación de canales dada la naturaleza sólida del material. La

temperatura a la cual comienza un rápido aumento de la viscosidad aparente se tomó como la temperatura de gelificación.

5.2. *Análisis de textura de los geles*

Los geles se formaron a 5°C y las propiedades de textura se evaluaron sobre muestras cilíndricas (19 mm de diámetro x 12 mm de alto). Se realizó un análisis del perfil de textura (TPA) en un analizador de textura (Stable Micro Systems TA.XTI2) usando un cilindro (1,27 mm de diámetro) para comprimir cada muestra a un 40% de su altura original a una velocidad de compresión de 1 mm/s.

6. *Análisis estadístico*

Para regresiones lineales y no lineales se usaron el software estadístico SYSTAT y el GraphPad Prism. Para el análisis no lineal se empleó un algoritmo Simplex y se estimaron los valores iniciales de iteración a partir de los resultados experimentales. Para la comparación de regresiones se realizó el análisis de covarianza (ANCOVA) de acuerdo con Sokal y col. (1969).

RESULTADOS

PARTE 1

***Desarrollo de metodologías para la
caracterización de la cinética de
desestabilización de espumas***

1.1. Método desarrollado para la determinación simultánea de velocidades de drenado, desproporción y colapso de espumas

Entre los diversos métodos desarrollados para determinar la estabilidad de espumas, la mayoría sólo pueden ser aplicados a bajas concentraciones proteicas. Aquellos métodos que son aplicables a altas concentraciones, generalmente empíricos, dan una información parcial sobre los procesos de desestabilización involucrados. Los datos más útiles sobre los procesos microscópicos de desestabilización de espumas se obtienen por el método en el cual se registra el decaimiento del área interfacial en función del tiempo por monitoreo de los cambios de presión que ocurren en una cámara cerrada que contiene la espuma. La velocidad de disminución del área interfacial resultó ser un buen indicador de la velocidad de colapso de la altura de la espuma (Dickinson y col., 1993). El decaimiento del área superficial de espumas de albúmina bovina presentó una cinética de primer orden monofásica o bifásica, dependiendo de las condiciones experimentales (Yu y Damodaran, 1991a). Las espumas de proteínas de soja siguieron una cinética de primer orden bifásica (Yu y Damodaran, 1991b). Esto indica que dos procesos microscópicos deben estar involucrados en el decaimiento de la espuma. En dicho trabajo, se atribuyó la primer fase cinética al drenaje gravitacional y la segunda a la desproporción de las burbujas de gas, vía difusión interburbuja. Ambos procesos ocurren durante el decaimiento de cualquier espuma, pero en aquellas que exhibieron cinética de primer orden monofásica, la medición de los dos procesos no fue posible por este método.

El interés de analizar variables estructurales y del medio sobre las propiedades de espumado de proteínas en las concentraciones en las cuales se encuentran en los alimentos, indujo al desarrollo de una nueva metodología. El método implementado permite la evaluación de los diferentes mecanismos que intervienen en la desestabilización de espumas proteicas: drenado, colapso y desproporción, en un rango amplio de concentraciones, mediante la

determinación simultánea de la evolución de la viscosidad aparente de la espuma, el líquido drenado y el volumen de espuma durante el transcurso del tiempo (Figura 1.1).

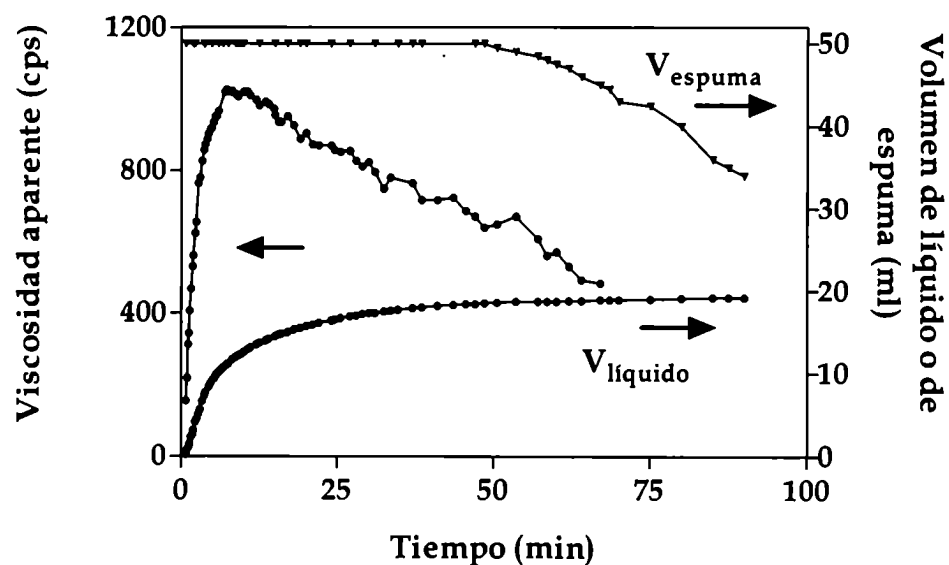


Figura 1.1: Viscosidad aparente, líquido drenado y espuma colapsada en función del tiempo de una espuma de proteína de soja nativa 2%.

1.2. Mediciones reológicas

Un supuesto del método desarrollado es que los cambios de viscosidad aparente de la espuma en el tiempo sean debidos a la desestabilización de la misma y no a fenómenos de tixotropía o reopexia. Para corroborar este supuesto se realizaron mediciones de viscosidad aparente de las espumas de proteína de soja a velocidades crecientes y decrecientes entre 0,3 - 60 rpm (Figura 1.2.), a distintos tiempos. La coincidencia entre las curvas de ascenso y de descenso verificó la ausencia de efectos tixotrópicos o reopécticos.

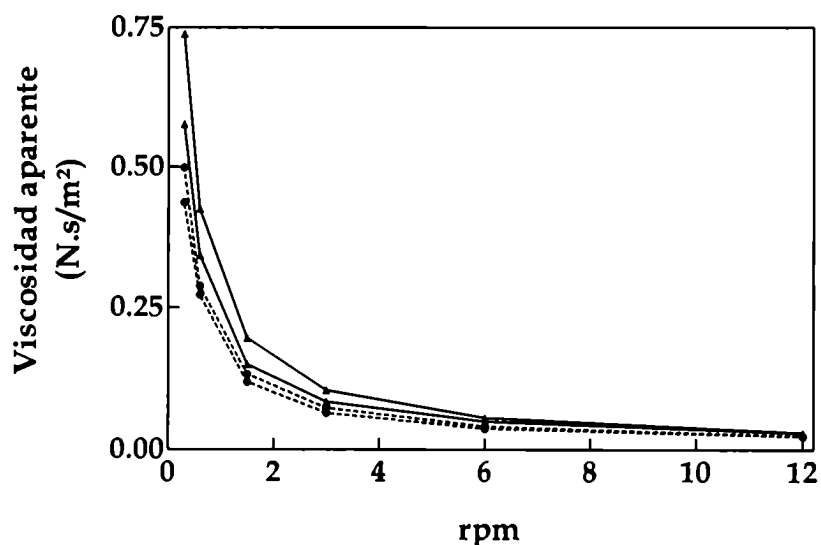


Figura 1.2: Viscosidad aparente a distintas velocidades de una espuma NSP 2%, a los 10 min. (▲) y a los 30 min (●).

El estudio de la variación de la viscosidad con el tiempo iniciando la medición a diferentes tiempos (Figura 1.3) sobre una misma muestra, permitió verificar que los valores obtenidos eran característicos de la espuma analizada e independientes del tiempo de inicio de la medición.

No se encontraron diferencias al comparar las velocidades de líquido drenado con el T-spindle con y sin movimiento, lo cual implica que el movimiento que presenta el sensor durante el transcurso de la medición de la viscosidad (helicoidal, constante y a muy baja velocidad, 0,3 rpm) no afecta a la estabilidad de la espuma.

La variación de la viscosidad aparente de las espumas con el tiempo, pudo entonces vincularse a los fenómenos de desestabilización de las mismas.

Las viscosidades aparentes de las espumas fueron mucho mayores que las correspondientes a las soluciones utilizadas en su formación. Esto está determinado por varios factores: la viscosidad superficial del film que rodea las burbujas, la cantidad de aire en la espuma (relación con el tamaño de las burbujas) y la cantidad de líquido en la lamela y su viscosidad (Wilde y Clark, 1996). Los

films proteicos tienen viscosidades superficiales muy altas, lo cual refleja que la energía requerida para mover las moléculas en el mismo, de un punto a otro, es muy alta (Kinsella y Phillips, 1989).

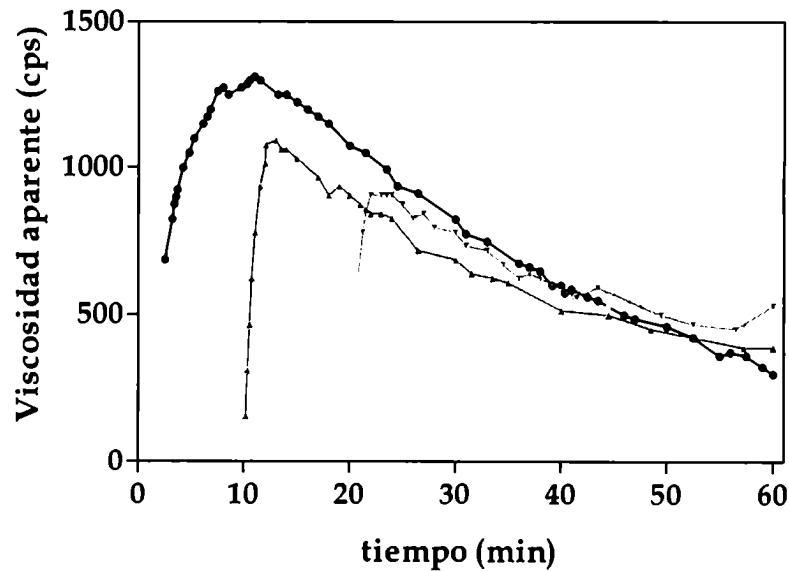


Figura 1.3: Curvas de viscosidad comenzando a 0 (●), 10 (▲), 20 (▼) y 40 (◆) minutos, para DSP 2%p/p.

En la Figura 1.1. se observa que la viscosidad aparente inicialmente aumenta hasta alcanzar un máximo y luego disminuye con el transcurso del tiempo. La fracción de volumen de líquido en la espuma ha sido relacionada inversamente con su viscosidad aparente (Lawhon y col., 1972; Nutt y Burley, 1989; Britten y Lavoie, 1992) dado que un aumento de líquido en la lamela incrementa la fluidez de la espuma. Este comportamiento indicaría que es razonable atribuir la primera etapa de las curvas, donde la viscosidad aparente aumenta con el tiempo, principalmente al drenaje de líquido. Además, la desproporción por difusión de gas entre burbujas es significativa sólo después de haberse alcanzado un espesor crítico del film (Yu y Damodaran, 1991a). Es lógico esperar que este proceso microscópico, que provoca una reducción del área interfacial y consecuentemente aumenta la relación gas/interfase, cause una disminución de la viscosidad aparente (μ_{ap}) de la espuma. Por lo tanto, la segunda

etapa de la curva (donde la μ_{ap} desciende) puede ser atribuida al proceso de desproporción.

La máxima viscosidad alcanzada y el tiempo durante el cual permanece en la misma conforma una balance entre los dos procesos microscópicos principales involucrados en la ruptura de la espuma, drenaje de líquido y desproporción, que tienen efectos contrapuestos sobre la viscosidad aparente de la espuma y que dependen de la estructura de la proteína, de la concentración y de las distintas condiciones del medio (pH, temperatura, etc.).

Es necesario señalar que las soluciones NSP y DSP forman espumas persistentes sin que exista pérdida de altura de la espuma durante el tiempo de la fase de drenaje. Una pérdida mínima en la altura de la columna de espuma (aproximadamente un 15%) ocurre al finalizar la medición de la fase de desproporción. Aún cuando la altura del volumen de espuma permanece aparentemente fijo, el espesor del film proteico, el tamaño de las burbujas de aire y la cantidad de líquido retenido, cambian gradualmente con el tiempo (Kato y col., 1983b). En consecuencia, la disminución en la viscosidad aparente de la espuma puede ser atribuida principalmente a la difusión de gas entre burbujas.

Las espumas más estables presentaron un tiempo “lag” durante el cual la viscosidad aparente no aumentó. Este comportamiento también se observó en las curvas de volumen de líquido drenado.

1.2.1. Modelo cinético para describir la viscosidad aparente de la espuma en función del tiempo

En base a que debe ocurrir cierto grado de drenaje para permitir que las burbujas se acerquen suficientemente como para que la desproporción tenga lugar, se propuso para describir las curvas obtenidas, el siguiente modelo cinético modificado que involucra dos pasos de reacciones consecutivas:

$$\mu_{ap}(t) = a.(e^{-K_2 t^{0,5}} - e^{-K_1 t}) \quad (1.1)$$

donde: μ_{ap} es la viscosidad aparente al tiempo t ($[\mu_{ap}] = \text{cps}$); a es un parámetro característico de la curva relacionado con la viscosidad máxima que se alcanza ($[a] = \text{cps}$); K_2 es la constante relacionada con la desproporción, correspondiente a la disminución de la viscosidad ($[K_2] = (\text{min})^{-1/2}$) y K_1 es la constante relacionada con el drenaje, correspondiente al aumento de la viscosidad ($[K_1] = (\text{min})^{-1}$).

1.2.2. *Reproducibilidad del método y de los parámetros del modelo*

Tomando una espuma inestable, correspondiente a la formada a partir de solución 2% de NSP, se analizaron 6 muestras en las mismas condiciones (con la probeta A, la cual poseía mayor error que la probeta B debido a su diseño) y se calculó la desviación standard de los distintos parámetros, obteniéndose: $a = 2165 \pm 82 \text{ cps}$; $K_2 = 0,188 \pm 1,7 \cdot 10^{-2} (\text{min})^{-1/2}$; $K_1 = 0,331 \pm 2,1 \cdot 10^{-2} (\text{min})^{-1}$. Asimismo, se obtuvieron: viscosidad máxima experimental: $1123 \pm 32 \text{ cps}$; tiempo para alcanzar dicha viscosidad máxima: $9,0 \pm 0,6 \text{ min.}$; %drenado al alcanzar el máximo: $72 \pm 2\%$.

1.3. *Modelo matemático para la descripción de las curvas de drenaje de líquido*

A pesar de que el drenaje de líquido es sólo uno de los factores responsables de la desestabilización de las espumas, es el que ha recibido mayor tratamiento teórico (Mita y col., 1977; Waniska y col., 1979; German y col., 1985; Walstra, 1989; Germick y col., 1994). Frecuentemente, como medida de estabilidad se han usado constantes de velocidad o tiempos medios de drenado. Para describir los perfiles experimentales de drenado se han propuesto numerosas ecuaciones empíricas,

incluyendo ecuaciones de primero y segundo orden (Ross, 1943; Mita y col, 1977; Kim y Kinsella, 1985; Huang y Kinsella, 1987). Elizalde y col. (1991) propusieron un modelo cinético de segundo orden con respecto a la cantidad de líquido remanente en la espuma para expresar el drenado de 14 espumas estabilizadas por proteínas. Sin embargo, en la mayoría de estos estudios, la concentración proteica fue fijada arbitrariamente en valores bajos. La concentración proteica afecta la cinética de drenaje al incrementarse la viscosidad de la solución, reducirse la tensión superficial y modificarse las propiedades físicas del film interfacial, como la viscosidad, la fuerza mecánica, la viscoelasticidad y la capacidad de absorber agua. Se consideró necesario entonces, estudiar el fenómeno de drenado en un extenso rango de concentraciones y desarrollar un modelo matemático para su descripción.

En la Figura 1.4.a y 1.4.b se observan las curvas de drenaje de líquido en función del tiempo para NSP y DSP, respectivamente, a distintas concentraciones. En algunas espumas se observó un retardo antes de que comenzara el drenado. Este período "lag" se observó para NSP y DSP a concentraciones proteicas superiores a 5%p/p, siendo mayores para las espumas de DSP. El rango de tiempo varió de 1 a 6 min. para NSP y de 1 a 13 min. para DSP. Halling (1981) atribuyó este período lag a un reordenamiento en la estructura de la espuma previamente al comienzo del drenado o a un artefacto del procedimiento de medición. Sin embargo, este período lag puede simplemente reflejar un retardo en la aparición del líquido que se separa de la espuma o estar influenciado por un umbral de fluencia estático que retardaría el flujo de líquido. En la columna de espuma se establece un perfil de líquido en forma longitudinal, debido a que el líquido en el tope drena por gravedad hacia la base del recipiente donde la espuma incrementa su densidad. Luego, el líquido aparece, subiendo la interfase espuma - líquido (Germick y col., 1994). A altas concentraciones proteicas, la velocidad de drenado puede resultar tan disminuida por el incremento de viscosidad, que la separación de líquido determinada por el drenaje macroscópico fuera de la columna de

espuma comience bastante tiempo después de haber concluido el batido. Por medio de la técnica de imágenes por resonancia magnética, McCarthy y Heil (1990) demostraron la existencia de un perfil interno de líquido en columnas de espuma de clara de huevo (12,5%p/p) sin que se observara separación de líquido.

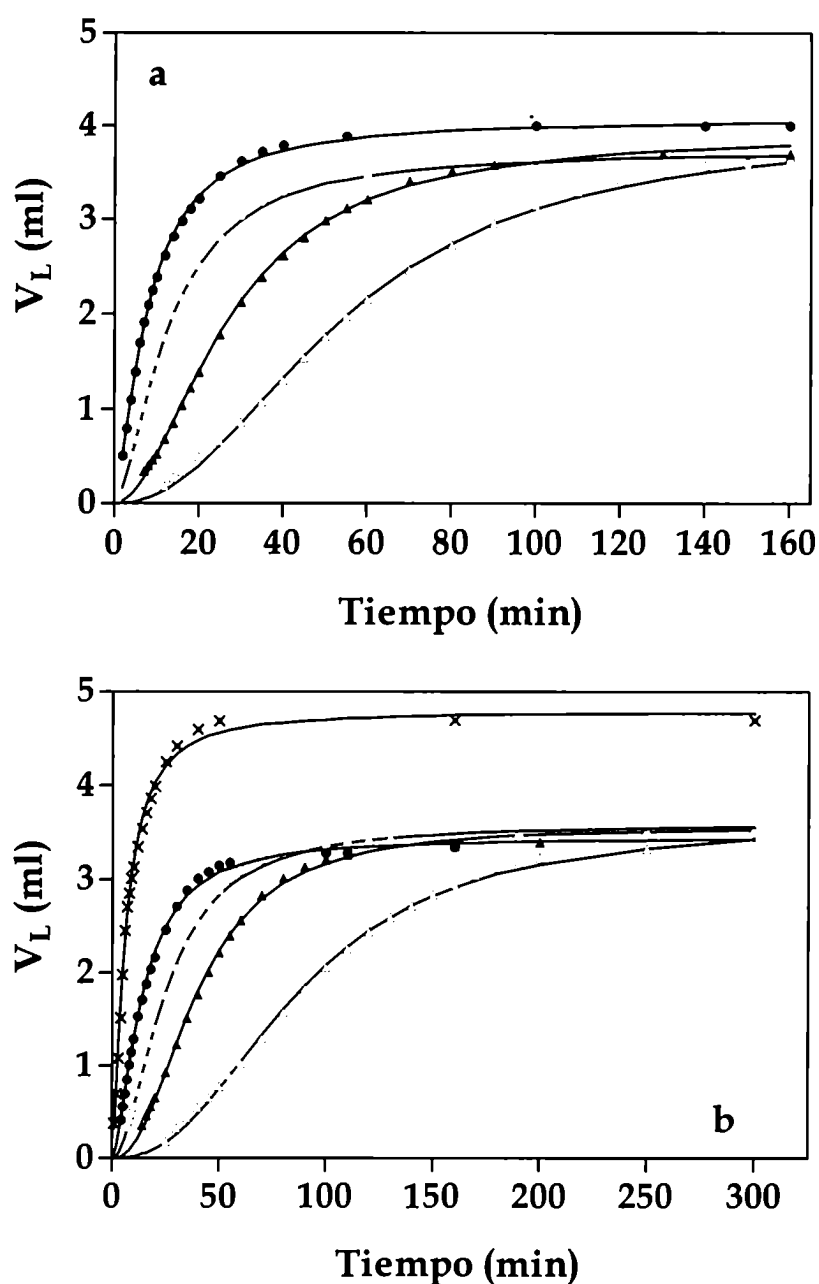


Figura 1.4: Curvas de drenaje de líquido para espumas de proteína de soja a) nativa (NSP): ● 2%; ○ 4%; ▲ 6% y △ 8% y b) desnaturalizada (DSP): X 0,5%; ● 2%; ○ 4%; ▲ 6% y △ 8%.

Las espumas primero drenan por un mecanismo gravitacional, que es esencialmente independiente de la distribución del tamaño de burbujas y está dominado por las características fluidodinámicas de la fase continua. Luego de un tiempo, las interfases de dos burbujas adyacentes se acercan reduciendo el espesor de la lamela, y un segundo mecanismo comienza a ser dominante, conocido como drenaje capilar. Los films se angostan por acción de las diferencias de presión entre el film y el plateau border, y posterior succión de este último, drenando luego por acción de la gravedad. Mientras el primer mecanismo es independiente del espesor del film, en el segundo se incrementa la velocidad con la disminución del mismo (Narsimhan, 1991) hasta un espesor crítico, determinado por el espesor de la capa adsorbida y las fuerzas repulsivas entre dos interfases, a partir del cual las propiedades reológicas superficiales del film son dominantes y la velocidad disminuye (Clark y col., 1994). El drenaje del líquido es retardado porque en la capa superficial (que es estanca) se genera un gradiente interfacial de moléculas adsorbidas (Prins, 1999), apareciendo un gradiente de tensión superficial y disminuyendo el flujo interfacial por el efecto Marangoni y por expansiones de la superficie viscoelástica para disipar las deformaciones locales en la interfase (Lucassen-Reynders, 1993; Tsekov, 1999). Estos mecanismos determinan las características de las curvas de drenado de líquido obtenidas, donde se alternan procesos de aceleración y desaceleración.

A concentraciones bajas (0,5%p/p para DSP o 2% para NSP) la velocidad de drenado fue inicialmente rápida, disminuyendo durante el transcurso del tiempo. Esto coincide con el comportamiento observado previamente (Elizalde y col., 1991) en espumas de concentración proteica del 3%p/p. Sin embargo, a medida que la concentración aumentó, la forma de las curvas de drenaje comenzó a modificarse presentando una forma sigmoidea. El punto en el cual la curva llega a un "plateau" representa la máxima cantidad de líquido que puede drenar, V_L . El tiempo para alcanzar dicho máximo aumentó con el incremento de la concentración.

Para describir las curvas de las figuras 1.4.a y 1.4.b, se propuso una ecuación de tres parámetros:

$$v_L(t) = \frac{V_L \cdot t^n}{(c + t^n)} \quad (1.2)$$

donde: $v_L(t)$ es el volumen de líquido drenado al tiempo t ; V_L es el volumen máximo de líquido drenado, n es un parámetro característico del comportamiento sigmoideo de la curva de cinética de drenado y c es un parámetro relacionado con el tiempo necesario para que drene $V_L / 2$ según:

$$c^{1/n} = t_{1/2} \quad (1.3)$$

Los parámetros V_L , c y n se estimaron mediante análisis de regresión no lineal. La ecuación propuesta ajustó muy bien a los valores experimentales (R^2 0,997 - 0,999, $P < 0,01$). La comparación entre los valores experimentales y las curvas predichas puede apreciarse en las figuras anteriores donde las curvas continuas corresponden al modelo propuesto. Las Figuras 1.5 y 1.6 muestran la correlación entre los valores experimentales y los predichos para el volumen máximo de líquido drenado (V_L) y para el tiempo necesario para que drene la mitad del máximo volumen de líquido que puede drenar ($V_L/2$). En este último caso, el valor predicho se calculó como $c^{1/n}$. Puede observarse una muy buena concordancia entre los valores predichos y los experimentales.

La velocidad de drenado de líquido se obtuvo por diferenciación de la ecuación 1.2 con respecto al tiempo:

$$\frac{dv_L}{dt} = \frac{n \cdot V_L \cdot c \cdot t^{n-1}}{(c + t^n)^2} \quad (1.4)$$

Como puede observarse en la Figura 1.7.a y 1.7.b, inicialmente la velocidad de drenado se incrementa rápidamente hasta un máximo correspondiente al punto de inflexión de la curva de drenaje; luego, la velocidad disminuye hasta que la curva de drenado llega al valor de equilibrio. Este comportamiento representa la mayor diferencia en comparación con el modelo de drenaje que había sido propuesto anteriormente para espumas de soluciones proteicas de baja

concentración (Elizalde y col. 1991), donde la velocidad era máxima al comienzo y luego disminuía.

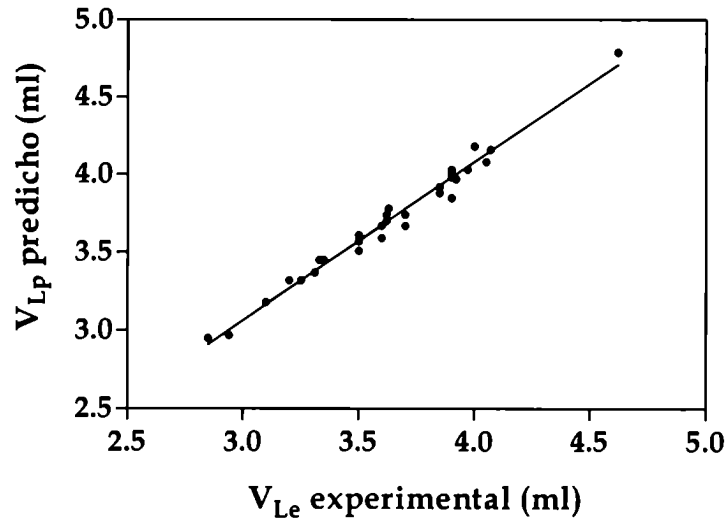


Figura 1.5: Correlación entre el volumen máximo de líquido drenado, experimental (V_{Le}) y predicho (V_{LP}). $V_{LP}=(1,016 \pm 0,026) V_{Le}$ $R^2=0,981$, $P<0,001$.

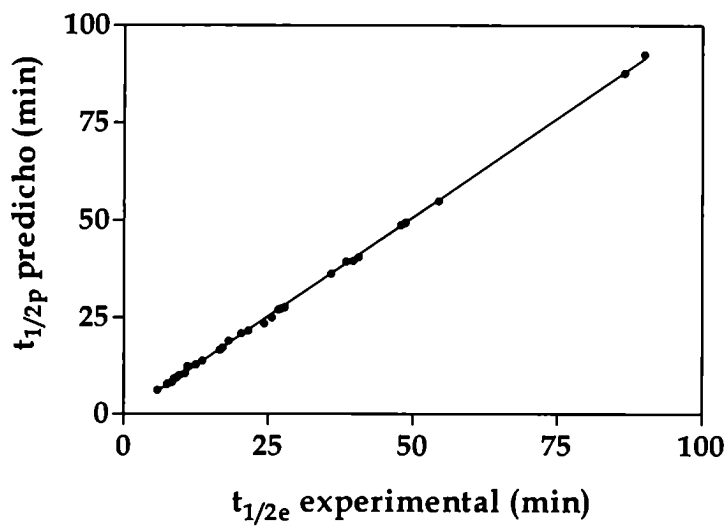


Figura 1.6: Correlación para el tiempo medio de drenado, experimental ($t_{1/2e}$) y predicho ($t_{1/2p}$) para espumas NSP y DSP. $t_{1/2p}=(1,016\pm0,004) t_{1/2e}$. $R^2=0,999$, $P<0,001$.

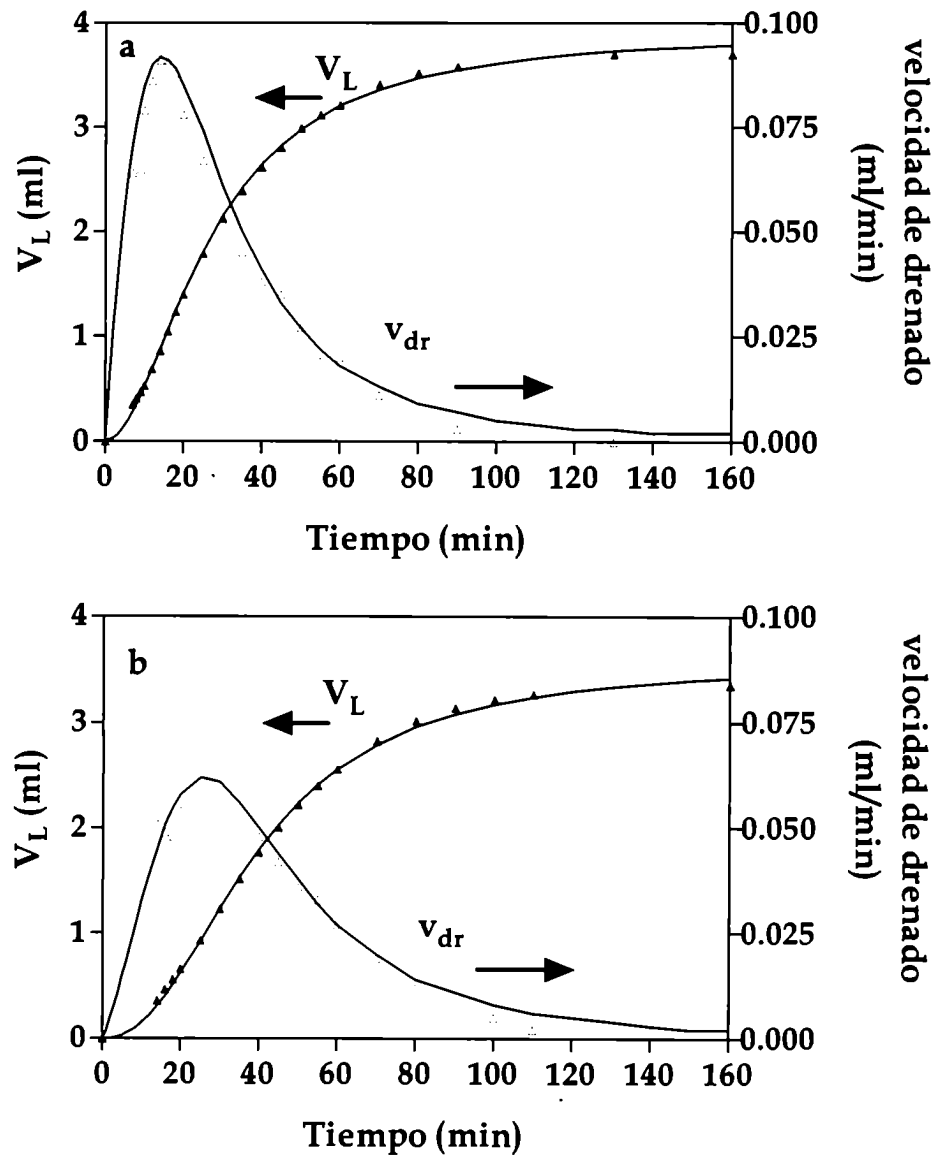


Figura 1.7: Velocidad de drenado de líquido en función del tiempo para: a) espuma NSP 6% y b) espuma DSP 6%.

Reemplazando el tiempo por el volumen en la ecuación 1.4, se puede obtener la siguiente ecuación cinética:

$$\frac{dv_L}{dt} = \left(\frac{n}{V_L \cdot c^{1/n}} \right) \cdot (V_L - v_L)^{(n+1/n)} \cdot v_L^{(n-1/n)} \quad (1.5)$$

donde la constante específica de drenaje está representada por:

$$k_{dr} = \frac{n}{V_t \cdot C^{1/n}} \quad [k_{dr}] = (\text{ml.min.})^{-1} \quad (1.6)$$

Si bien pueden utilizarse otros parámetros para caracterizar la velocidad del proceso de drenado por estudio del líquido que se separa por gravitación, los mismos no dan una descripción cinética del proceso (Patel y col.; 1988).

1.4. Parámetros de evaluación del colapso de las espumas

Antes de que las burbujas puedan coalescer, la lamela debe ser suficientemente fina como para romperse, alcanzando un espesor crítico, lo cual es seguido por la ruptura del film proteico (Mita y col., 1977). Distintos tipos de perfiles y de relaciones con el drenado fueron encontrados en investigaciones realizadas sobre el colapso durante el transcurso del tiempo, en espumas estabilizadas por proteínas (Sarker y col., 1998).

El uso de técnicas que estudian cambios morfológicos por análisis texturales, permite una mejor evaluación del fenómeno de colapso, observándose una relación entre la forma de las burbujas y la composición de la interfase adsorbida y variaciones de tamaño con la desproporción (Sarker y col., 1998).

El comportamiento de las espumas de proteína de soja fue similar al reportado por Halling (1981) para β -caseína, donde tras un mínimo colapso inicial, el mismo era acelerado rápidamente tras un período de drenado y completado luego en un tiempo relativamente corto.

Los siguientes parámetros fueron utilizados para la evaluación del colapso de las espumas:

Tiempo que tarda en colapsar determinada cantidad de espuma: 10 ó 20 ml según las condiciones experimentales.

Tiempo de inicio del colapso: tiempo al cual se observa el comienzo del colapso.

Densidad de la espuma al inicio del colapso: $\delta_{inc} = (\text{volumen de líquido en la espuma} / \text{volumen de espuma}) \delta_{sn}$.

Constante de velocidad evaluada a partir de las curvas de colapso: La variación del volumen de espuma con el tiempo se estudió en la probeta B, la cual presenta un cambio de sección (ver la figura correspondiente en materiales y métodos). En la Figura 1.8. se observa una curva del volumen de espuma colapsado en función del tiempo (la disminución de la velocidad de colapso y consiguiente forma sigmoidea de la curva, se debe a la disminución del área interfacial por un menor diámetro de la geometría del sistema, no a un mecanismo del proceso de desestabilización).

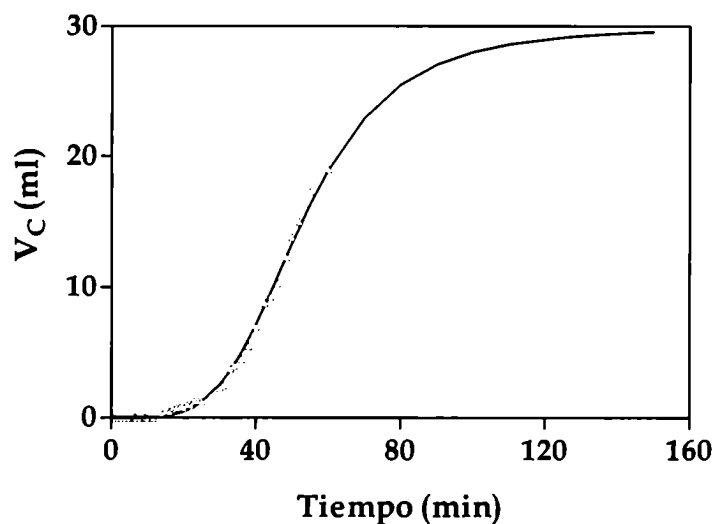


Figura 1.8: Volumen de espuma colapsada en función del tiempo y ajuste de la curva predicha a los valores experimentales (NSP 2% + KC 0,1%, $R^2=0,994$).

El modelo aplicado para el análisis de la curva de colapso fue:

$$v_c(t) = \frac{V_C \cdot t^n}{(c + t^n)} \quad (1.7)$$

donde: $v_c(t)$ es el volumen de espuma colapsada al tiempo t ; V_C es el volumen máximo de espuma colapsada, c es un parámetro relacionado con el tiempo medio

de colapso como $c^{\frac{1}{n}}$ y n es un parámetro característico del comportamiento sigmoideo de la curva cinética de colapso.

La velocidad de colapso se obtuvo por diferenciación de la ecuación 1.7 con respecto al tiempo:

$$\frac{dv_c}{dt} = \frac{n \cdot V_c \cdot c \cdot t^{n-1}}{(c + t^n)^2} \quad (1.8)$$

Reemplazando el tiempo por el volumen en la ecuación 1.8, se obtiene la siguiente ecuación cinética:

$$\frac{dv_c}{dt} = \left(\frac{n}{V_c \cdot c^{1/n}} \right) \cdot (V_c - v_c)^{(n+1/n)} \cdot v_c^{(n-1/n)} \quad (1.9)$$

donde $n / (V_c \cdot c^{1/n})$ representa la constante específica de colapso y que se calcula como:

$$k_{col} = \frac{n}{V_c \cdot c^{1/n}} \quad [k_{col}] = (\text{ml} \cdot \text{min.})^{-1} \quad (1.10)$$

Se encontró una buena correlación entre el máximo volumen de espuma que puede colapsar, $V_{c \text{ exp.}}$, y el valor V_c predicho por el modelo (Figura 1.9.) y también entre el tiempo que tarda en colapsar $V_{c \text{ exp.}}/2$, y el valor predicho por el modelo (Figura 1.10.).

Las desviaciones del modelo al finalizar el colapso de la espuma se deben al diseño específico de la probeta. De los resultados obtenidos se concluye que el modelo sugerido es apropiado para describir la cinética de colapso en este sistema geométrico.

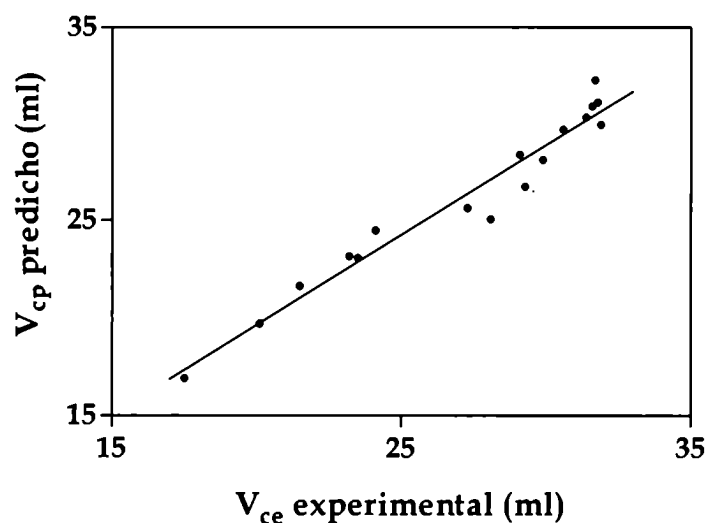


Figura 1.9: Correlación entre el volumen máximo de espuma colapsado experimental (V_{ce}) y predicho (V_{cp}). $V_{cp}=(0,92\pm0,05)V_{ce}$; $R^2= 0,954$, $P<0,001$.

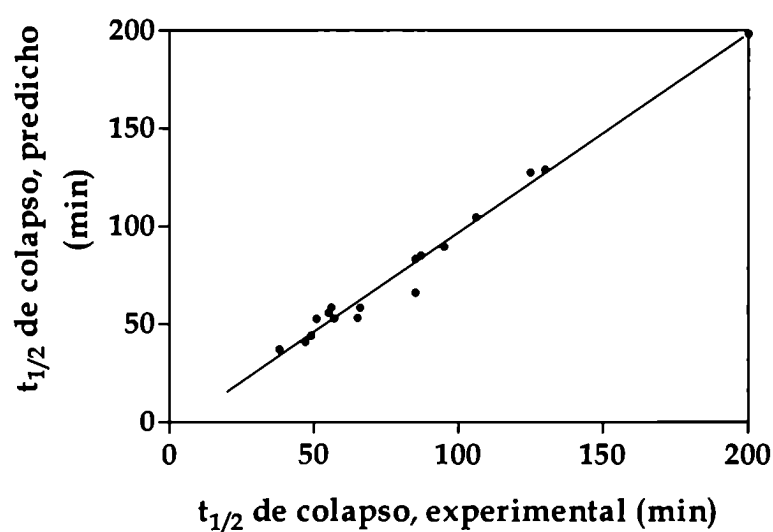


Figura 1.10: Correlación para el tiempo medio de colapso, experimental ($t_{1/2e}$) y predicho ($t_{1/2p}$) para espumas NSP y DSP. $t_{1/2p}=(1,02\pm0,03) t_{1/2e}$. $R^2=0,999$, $P<0,001$.

1.5. Adaptabilidad de la metodología desarrollada a otras proteínas

Se evaluó la versatilidad del método desarrollado para la determinación simultánea de velocidad de drenado, desproporción y colapso para poder ser aplicado a diferentes proteínas.

La distancia entre la superficie de la espuma y el sensor (Mat. y Mét., pág.75, Fig. 5) puede variarse de acuerdo a la velocidad de colapso de la espuma. Si éste es rápido puede tomarse mayor volumen de espuma, ubicándose el sensor más lejos de la superficie y permitiendo un mayor tiempo de medición del proceso de desestabilización, antes de que el sensor quede al aire. Si la espuma es muy densa (gran cantidad de líquido) debe evitarse que el sensor esté muy abajo y quede en la zona de líquido drenado.

Si se desea aplicar la metodología a otras proteínas debe evaluarse la capacidad de espumado y estimar el porcentaje de líquido incorporado a la espuma y la velocidad de colapso, para luego modificar la técnica de forma que resulte apropiada.

En las Figuras 1.11 y la Tabla 1.1. pueden observarse las curvas obtenidas al caracterizar las espumas de caseinato de sodio y β -lactoglobulina a pH 3, 6 y 7.

Ambas proteínas presentaron capacidades de espumado y densidades de las espumas similares. Las velocidades de colapso fueron significativamente diferentes, siendo el tiempo de medición del descenso de la viscosidad muy corto para el caseinato de sodio. Pudieron adaptarse condiciones experimentales que permitieran el estudio y comparación de ambas proteínas en un amplio rango de pH. Las diferencias observadas pueden relacionarse con distintas propiedades de las soluciones y vincularse con las características de los films formados.

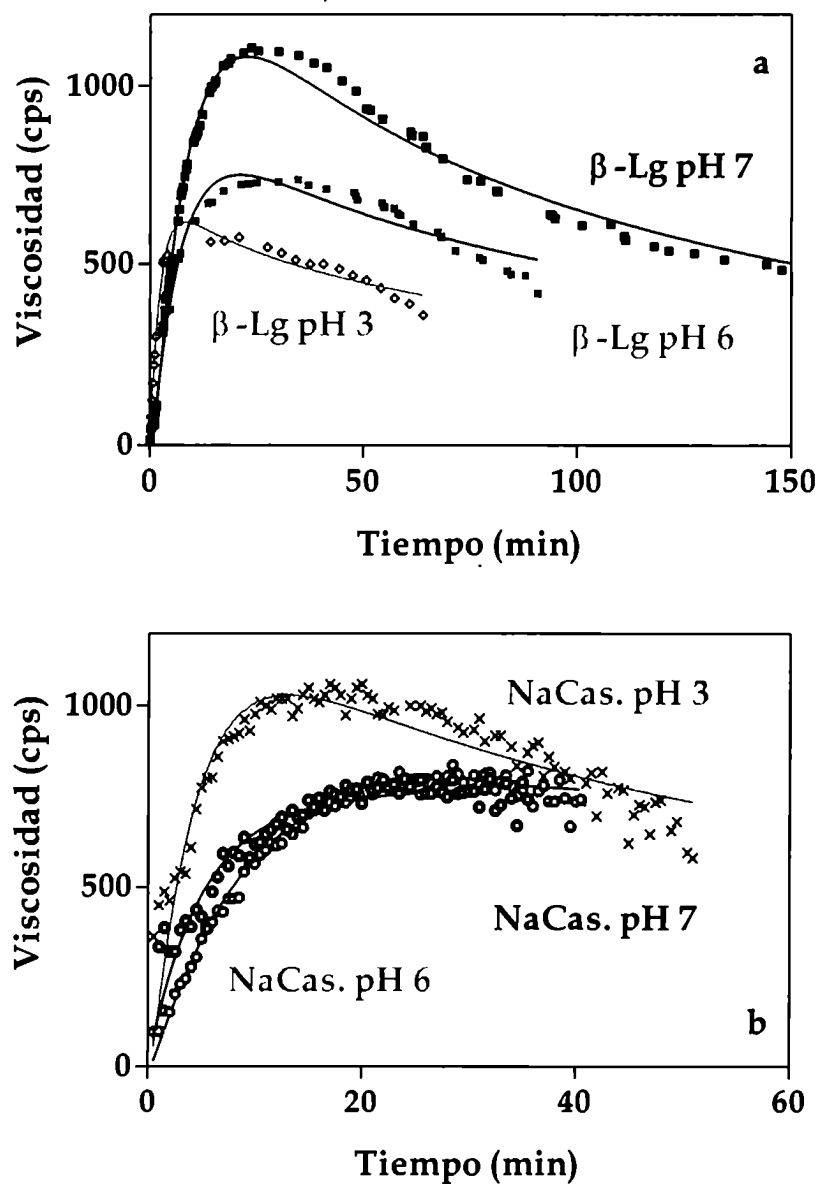


Figura 1.11: Curvas de viscosidad aparente de soluciones proteicas 3% a pH 3, 6 y 7 a) β -lactoglobulina (β -Lg) y b) caseinato de sodio (NaCas.).

Tabla 1.1: Parámetros de estabilidad correspondientes a las espumas de β -lactoglobulina y caseinato de sodio a pH 3, 6 y 7.

Parámetro	β -lactoglobulina			Caseinato de sodio		
	pH 7	pH 6	pH 3	pH 7	pH 6	pH 3
$t_{20\text{mL}}$ (min)	100 $\pm$ 3	85 $\pm$ 3	43 $\pm$ 2	36 $\pm$ 1	40 $\pm$ 2	55 $\pm$ 2
k_{dr} (ml/min) .10 ³	5,5 $\pm$ 0,5	5,3 $\pm$ 0,5	7,2 $\pm$ 0,7	4,0 $\pm$ 0,3	4,6 $\pm$ 0,3	5,4 $\pm$ 0,4
K_1 (min ⁻¹)	0,13 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	0,44 $\pm$ 0,05	-	0,12 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,02
K_2 (min ^{-0.5})	0,116 $\pm$ 0,009	0,091 $\pm$ 0,008	0,084 $\pm$ 0,004	-	0,072 $\pm$ 0,005	0,12 $\pm$ 0,01
a	2081 $\pm$ 20	1224 $\pm$ 15	813 $\pm$ 10	-	1196 $\pm$ 15	1676 $\pm$ 20
%FE	273 $\pm$ 10	290 $\pm$ 10	327 $\pm$ 10	273 $\pm$ 10	287 $\pm$ 10	253 $\pm$ 10

$t_{20\text{mL}}$: tiempo para que colapsen 20 ml de espuma; %FE: capacidad de espumado.

CONCLUSIONES

El método desarrollado para la determinación simultánea de velocidad de drenado, desproporción y colapso puede ser empleado satisfactoriamente para el estudio de la estabilidad de espumas en relación al efecto de distintas variables de composición y de proceso y de modificaciones estructurales de las proteínas, en el rango de concentraciones proteicas usadas en alimentos.

PARTE 2

***Propiedades de espumado de aislado de soja
nativo y desnaturalizado térmicamente en
un amplio rango de concentraciones***

2.1. Caracterización de los aislados proteicos de soja nativo y desnaturalizado.

El aislado de proteína de soja nativa presentó una solubilidad del 98%. En la preparación del aislado desnaturalizado, se utilizaron condiciones en las cuales las reacciones de agregación estuvieron minimizadas y no hubo formación de precipitado insoluble, siendo el aislado desnaturalizado 98% soluble en las concentraciones usadas. En la Figura 2.1 se muestran los termogramas obtenidos por DSC para NSP y DSP. El aislado nativo presenta dos transiciones endotérmicas (picos I y II) con $T_{\max}=76,3$ y $89,3$ °C, que pueden ser atribuidas a la desnaturalización térmica de las proteínas 7S y 11S respectivamente (Hermansson, 1978 y 1986). En el termograma de DSP se observa la desaparición casi total de ambos picos (I y II). La entalpía de desnaturalización del aislado NSP fue de 17,15 J/g, que corresponde a un porcentaje de desnaturalización del 0% (D%), mientras que para el aislado DSP fue de 2,05 J/g indicando que el mismo se encuentra en un 88% desnaturalizado. La mayor solubilidad obtenida en este trabajo en comparación con los resultados obtenidos en condiciones similares por Sorgentini y col . (1995) podría deberse al menor porcentaje de desnaturalización obtenida, con la consecuente menor formación de agregados.

La disociación y el desplegamiento de las subunidades moleculares por efecto del tratamiento térmico dejan expuestos grupos hidrofóbicos que previamente se encontraban en el interior de la estructura nativa. Se observó un aumento de los valores de hidrofobicidad superficial (S_o) desde 164,5 para NSP a 412,2 para DSP, coincidiendo con las observaciones experimentales de otros trabajos (Kato y col., 1983a, Wagner y Añón, 1990). Estos valores corresponden a soluciones 6%p/p, y no difieren significativamente de los obtenidos para los sistemas espumados (165,7 y 428,6 respectivamente).

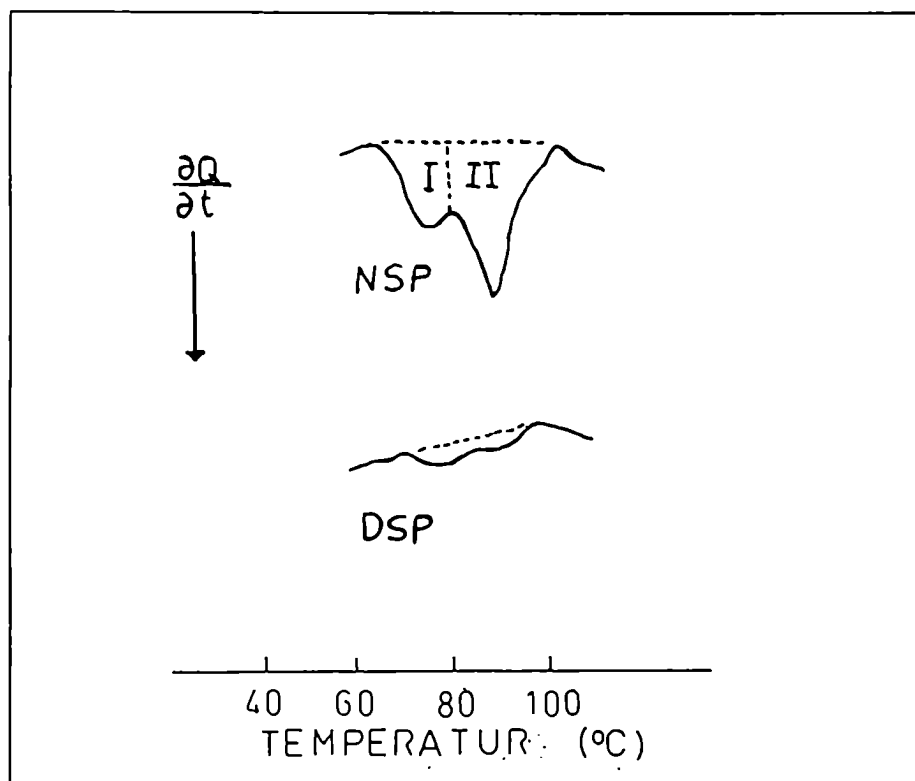


Figura 2.1: Termogramas de NSP y DSP.

2.2. Caracterización de las soluciones y de la interfase

2.2.1. Composición de proteínas de soja en solución y en la interfase aire - agua

En las Figuras 2.2.a y b se muestran los perfiles electroforéticos típicos obtenidos para un aislado de soja nativo y otro desnaturalizado térmicamente (los pesos moleculares de las subunidades de la β -conglucina están sujetos a error porque existen sobreestimaciones en las determinaciones para glicoproteínas por electroforesis, Petrucelli y Añon, 1994a). Las electroforesis realizadas con SDS muestran las fracciones obtenidas luego de la ruptura de enlaces hidrofóbicos y electrostáticos, destruyéndose la estructura cuaternaria de la proteína. El estudio

de las estructuras oligoméricas debe realizarse en condiciones electroforéticas no desnaturizantes y similares a las de trabajo, lo cual no fue posible debido a la baja fuerza iónica utilizada en la preparación de las soluciones (buffer fosfato 0,005M) y la baja carga neta presentada por las proteínas al pH 7 de trabajo.

Cuando soluciones proteicas de soja se calientan a baja fuerza iónica la globulina 11S se disocia en las subunidades A y B que luego se despliegan (Hashizume y col., 1979). Las subunidades básicas, B, interactúan con las subunidades de la globulina 7S formando un complejo soluble (Damodaran y Kinsella, 1982; German y col., 1982).

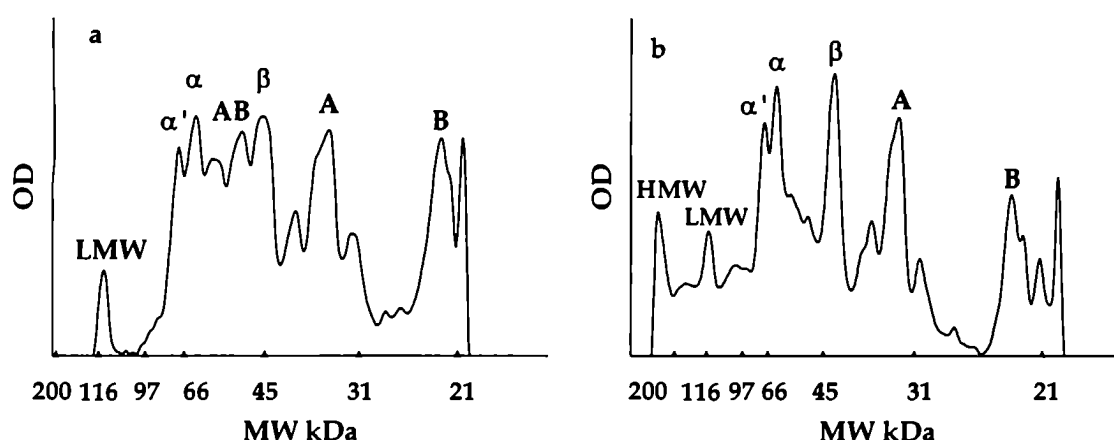


Figura 2.2: Densitogramas electroforéticos SDS-PAGE para soluciones 2% de aislado protéico de soja a) nativo y b) desnaturizado térmicamente.

La Figura 2.2 muestra que el tratamiento térmico conduce a una gran reducción del pico correspondiente a la fracción AB-11S (el área del pico decreció aproximadamente un 80%) y una disminución de A y B. El hecho de no observar un incremento en las fracciones A y B (provenientes de la reducción de AB - 11S por calor) indica la formación de agregados a través de uniones disulfuro. Otros autores han observado este comportamiento (Mori y col., 1982; Sathe y col., 1989; Petruccelli y Añón, 1995). Puede observarse también un incremento del área de las fracciones de peso molecular mayor a 100 kDa (denominadas LMW en el gráfico)

y la aparición de agregados de alto peso molecular (HMW). Estos agregados se rompen al tratar la muestra con β -mercaptoetanol como agente reductor (Figura 2.3.) sugiriendo que en la formación de los mismos están involucradas uniones por puente disulfuro.

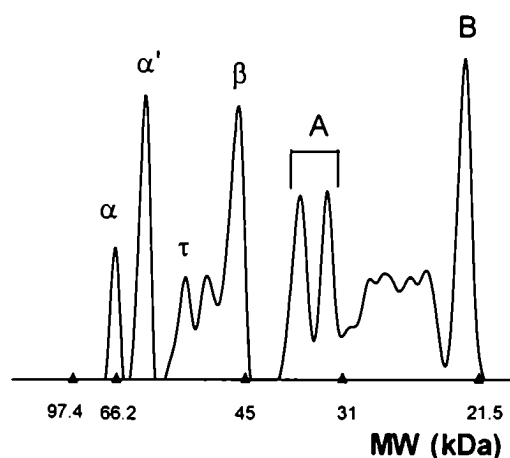


Figura 2.3: Densitograma electroforético SDS-PAGE- β -mercaptoetanol para soluciones 2% de aislado protéico de soja desnaturalizado térmicamente.

La composición de las fracciones de proteína de soja en las soluciones usadas para formar las espumas, se encontró afectada por la concentración inicial de proteína. En la Figura 2.4 a y b se muestran las proporciones de las fracciones que presentaron variaciones significativas por efecto del aumento de la concentración de la solución proteica. Para la proteína nativa, la formación de agregados de bajo peso molecular (LWM) no dissociables por SDS fue promovida por un incremento de la concentración. La proporción de los mismos se incrementó desde un 2,7% (a una concentración proteica de 0,5%) hasta un 3,7% (para una concentración de 6%). La proporción de AB sufrió un importante incremento al aumentar la concentración total de proteína en solución, lo cual resultó acompañado de una disminución de los polipéptidos A y B libres, indicando su posible asociación.

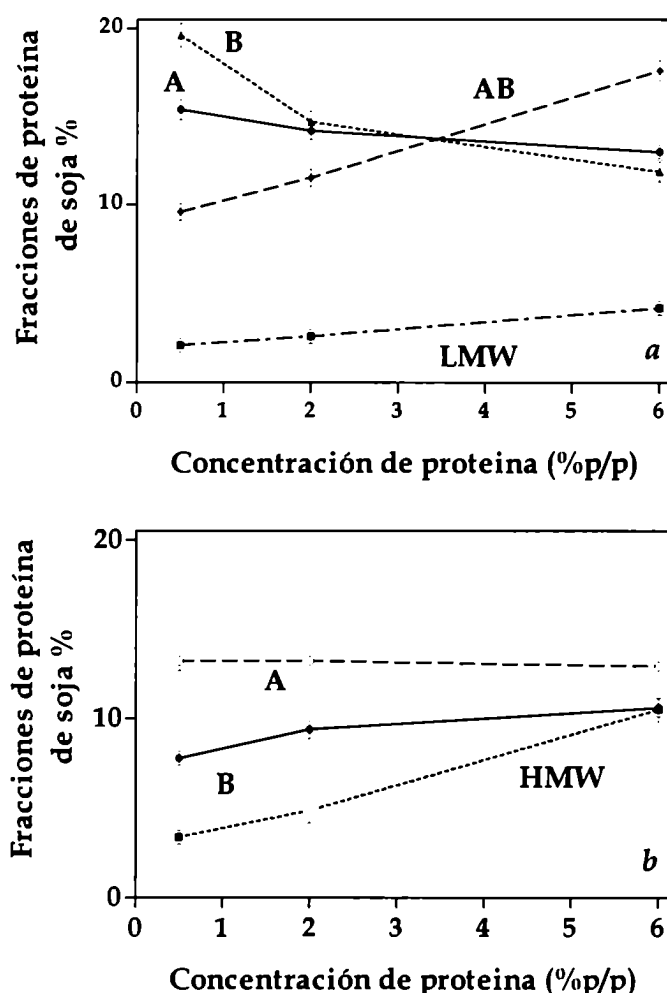


Figura 2.4: Efecto de la concentración de proteína en la composición de subunidades analizadas por electroforesis SDS - PAGE en soluciones de aislado de soja (las barras de error indican desviaciones standard) a) NSP y b) DSP.

En las soluciones de DSP, el aumento de la concentración proteica promovió un incremento del polipéptido B y la formación de agregados de alto peso molecular (HMW). La proporción de los agregados HMW aumentó desde un 3,1% hasta un 10,5% cuando la concentración de DSP se incrementó desde 0,5% hasta 6%. Una importante formación de agregados, a través de uniones disulfuro, estables a distintos pH y en presencia de SDS y urea, también fue encontrada en aislados tratados a altas temperaturas por Petruccelli (1993).

También se observó una pequeña disminución de las proporciones de las subunidades α y α' (no mostrado) con el incremento de la concentración, tanto para las soluciones de NSP como de DSP (principalmente al 6%). Estas subunidades de la β -conglucina y el polipéptido A de la glicina participan en agregados de bajo peso molecular entre 115-123 kDa que se forman durante el proceso de liofilización del aislado de soja, interactuando al menos parcialmente por medio de uniones disulfuro (Petrucci y Añón, 1995). La cantidad de agregados formados durante la liofilización se incrementa con el aumento de la concentración de proteína a la cual se realiza la neutralización, resultando este comportamiento concordante con los resultados mostrados. Los agregados de alto peso molecular (179-192 kDa) reportados por Petrucci y Añón (1995) consisten en trímeros y dímeros de las subunidades α y α' de la β -conglucina, con uniones iónicas y -S-S- mientras que los agregados de bajo peso molecular están formados por las subunidades α y α' y el polipéptido A de la glicina. Los agregados remanentes en el inicio del stacking gel, de peso molecular > 300 kDa (pues no penetran en el gel de 7%), que constituyen el 2% del total proteico y son sensibles a la acción del β -mercaptoetanol, estarían constituidos por las subunidades α y α' de la β -conglucina y los polipéptidos A y B de la glicina según lo sugerido por Petrucci y Añón (1994a). Asimismo, se forman agregados B- β en el proceso de desnaturalización (Arrese y col., 1991) unidos por enlaces hidrofóbicos, que se disocian en presencia de SDS. El polipéptido A presenta poca tendencia a la agregación, permaneciendo soluble tras la desnaturalización (Sorgentini y col., 1995), lo cual coincide con que LMW no varíe significativamente y aparezcan los agregados HMW.

La composición de proteínas en la interfase aire - agua de las espumas se comparó con la composición de las soluciones. Los perfiles electroforéticos de las proteínas adsorbidas en la interfase de las espumas de NSP resultaron similares a los observados en las soluciones usadas para formarlas, independientemente de la concentración proteica, indicando la ausencia de una adsorción preferencial de

alguna de las fracciones o su asociación en la interfase. Dickinson y Matsamura (1991) también reportaron que la composición de globulinas nativas 7S y 11S adsorbidas en la interfase aceite/agua era similar a la empleada para formar la emulsión. Las pequeñas diferencias que pudieron observarse, mostraron una tendencia a asemejarse a los perfiles de soluciones más concentradas, correspondiéndose con una concentración de la proteína en la interfase.

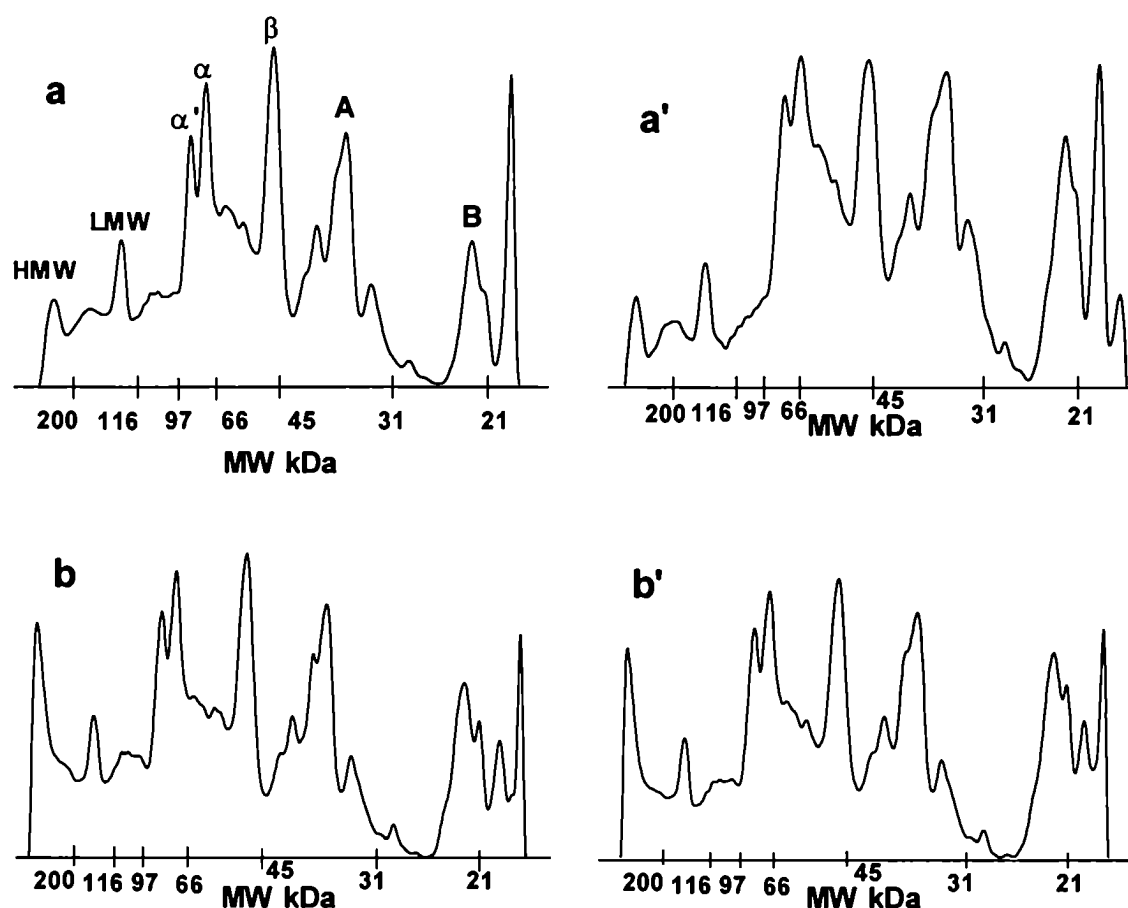


Figura 2.5: Densitogramas correspondientes a proteína de soja desnaturalizada 0,5% (a y a') y 6% (b y b') en solución (a y b) y en la interfase aire - agua (a' y b').

Para todas las concentraciones de DSP (Figura 2.5), en cambio, se observó un incremento en la proporción del polipéptido B en la interfase aire - agua (20 - 50% calculado como la relación entre las áreas del pico B en la interfase y la

solución). Una migración preferencial del polipéptido B a la interfase de emulsiones, también fue propuesta por Petruccelli y Añón (1994b). Un incremento del polipéptido A (20%) se observó a una concentración del 0,5% DSP.

2.2.2. Tensión y presión superficial

En la interfase aire-agua las proteínas forman estructuras que pueden ser descritas en términos de segmentos de una cadena de polipéptidos formando tanto lazos de residuos peptídicos en la interfase como bucles o colas de residuos que sobresalen hacia el seno de la fase acuosa (Dickinson y col. 1988). La presión superficial depende de la concentración superficial de los segmentos adsorbidos, de las interacciones laterales segmento - segmento, de las interacciones electrostáticas y segmento - solvente, y del grado de desdoblamiento de la proteína adsorbida (Narsimhan y Uraizee; 1992). Dos tipos de films superficiales extremos pueden existir: films diluidos, donde la monocapa consiste principalmente en moléculas desplegadas en la interfase en una configuración entrelazada y films concentrados, donde gran parte de la estructura nativa está retenida. La desnaturalización superficial involucra principalmente cambios en la estructura terciaria y cuaternaria. Las proteínas fuertemente agregadas tienen mayor posibilidad de formar films concentrados que especies monoméricas (Tornberg, 1978). Sin embargo, la flexibilidad molecular limitada de la proteína de soja nativa (Kim, 1985) le impide un desplegamiento completo inclusive a bajas presiones superficiales (π). Con el incremento de π , se forman progresivamente mayor cantidad de bucles y colas, y disminuye la proporción de residuos enlazados.

En las Figuras 2.6. a y b, se muestran las isothermas de presión superficial en la interfase aire - agua para proteína de soja nativa y desnaturalizada respectivamente. El efecto de la concentración de NSP o DSP sobre la presión superficial es el mismo para $C_p < 3\%$. Sin embargo, mientras que NSP alcanza un "plateau" bien definido en el rango 3,5 - 8%, indicando que la monocapa de proteína ha sido saturada, para DSP se observa un incremento en los valores hasta que la concentración de la solución alcanza el 8%p/p. Como resultado de la desnaturalización, existe un incremento en la hidrofobicidad, una mayor flexibilidad molecular y una ruptura de la subunidad A-B, lo cual permitiría que más proteína se adsorba y empaquete en la interfase provocando una mayor disminución de la tensión superficial en comparación con la proteína nativa.

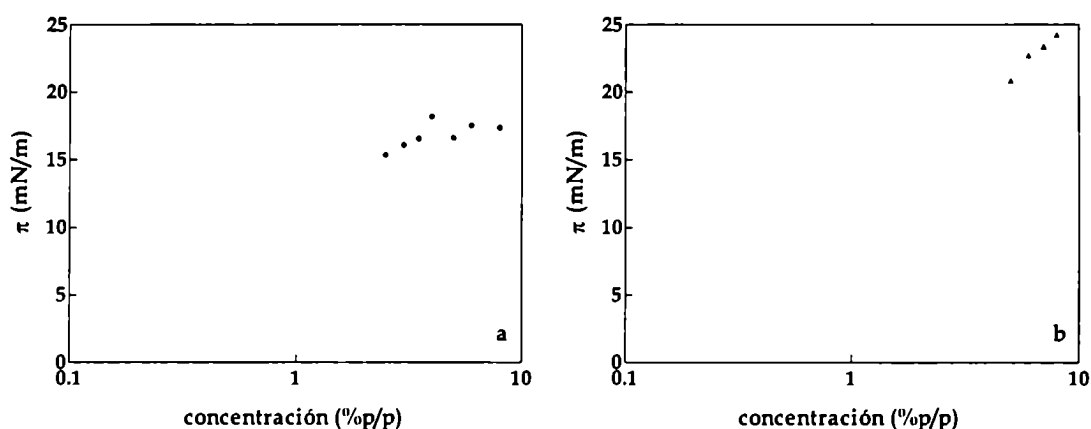


Figura 2.6: Efecto de la concentración de aislado proteico sobre la presión superficial " π " para a) NSP y b) DSP.

Ambas isothermas de presión superficial exhiben una inflexión a $\pi = 13$ mN/m. Un efecto similar en la interfase aire-agua ha sido reportado para lisozima a 8 mN/m y para α -lactalbumina bovina a 12 mN/m (Graham y Phillips, 1979b). Esta inflexión marcaría el punto en el cual las moléculas de proteínas globulares absorbidas estarían impedidas de desplegarse por la presión ejercida por las moléculas ya acomodadas en el film y la formación de bucles y colas comienza a ser dominante. Las proteínas globulares se empaquetan más eficientemente en la

primer capa, dando mayores concentraciones superficiales y film más gruesos a una dada presión superficial. Graham y Phillips (1979c) encontraron que en la lisozima (proteína globular) el grado de desdoblamiento es función de π y las moléculas no se despliegan completamente. Los elementos de estructura nativa remanente incluyen puentes disulfuro y α -hélices. La proteína de soja y especialmente DSP a altas concentraciones, podría formar en la interfase una estructura tipo gel como la lisozima, por interacciones intermoleculares proteína - proteína.

Con el fin de estudiar la cinética de adsorción de las proteínas en la interfase se utilizó el tensiolaminómetro de Whilhelmy. En la Figura 2.7 se muestran las curvas obtenidas de aumento de presión superficial con el tiempo para la proteína de soja nativa y desnaturalizada a una concentración del 0,5%p/p. Se observó una discrepancia en los valores de tensión superficial de equilibrio obtenidos por este método y por el método del estalagmómetro de Traube. Discrepancias de magnitud similar con respecto al tensiolaminómetro fueron observadas por Tornenberg (1978) comparando con el método de la gota pendiente. Diferencias de aproximadamente 8 mN/m fueron encontradas al comparar valores de equilibrio de la tensión superficial de soluciones proteicas determinados mediante el anillo de Du Noüy (valores mayores) y los obtenidos por medio de la evolución cinética en un tensiómetro dinámico de gota pendiente (Wüstneck y col., 1996), resultando ser mayores al aumentar la concentración proteica; las mismas fueron atribuidas a las propiedades reológicas superficiales y de dilatación de los films proteicos y a los tiempos relativos de las mediciones.

Las velocidades de difusión no pudieron evaluarse en las condiciones de trabajo, debido a la alta concentración de las soluciones, recubriéndose la interfase rápidamente. Las presiones obtenidas inicialmente fueron similares a las reportadas por Tornberg (1978) al completarse el período de difusión. Por lo tanto, las curvas fueron ajustadas a una ecuación de suma de dos exponenciales, $\pi = \pi_e \cdot (1 - A \cdot e^{-k_1 \cdot t} - B \cdot e^{-k_2 \cdot t})$ (ecuación 2.1, Graham y Phillips, 1979a) donde la

primer constante (k_1) corresponde a la fase donde predominan los fenómenos de penetración en la interfase y la segunda constante (k_2) está regida principalmente por los reacomodamientos conformacionales en el seno de la interfase saturada. Los cambios conformacionales dependen de la compresibilidad del film, siendo pequeños cuando el film es altamente incompresible. La constante k_2 tiene relación con las interacciones intra e intermoleculares. Las interacciones intermoleculares son predominantes en la superficie de los films donde las moléculas proteicas están esencialmente agregadas. Ambas velocidades están relacionadas con la entropía configuracional de los segmentos adsorbidos, que depende del número de lugares de la proteína para adsorberse y del número de formas para reacomodarse en la superficie (Narsimhan y Uraizee, 1992).

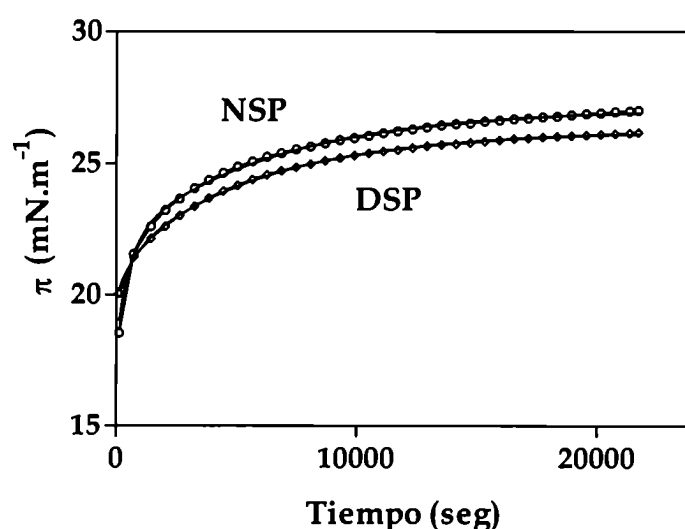


Figura 2.7: Evolución de la presión superficial (π) para soluciones 0,5% de aislado de soja nativo (NSP) y desnaturalizado (DSP).

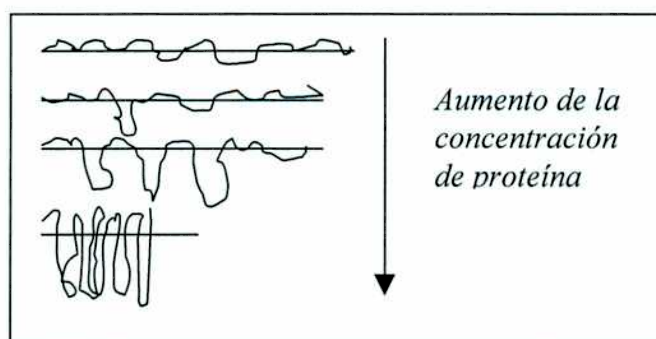
En la Tabla 2.1 se puede observar que las velocidades de penetración y reacomodamiento resultaron mayores al disminuir la concentración proteica. El efecto de la concentración es diferente al observado por otros autores (Tornberg, 1978; Graham y Phillips, 1979a), quienes trabajaron en soluciones diluidas, con menores concentraciones proteicas. Los resultados están de acuerdo con datos reportados por Wüstneck y col. (1996). A altas concentraciones de proteína en la

subfase, más moléculas de proteína están presentes en la interfase (Fig. 2.6) e interfieren con los procesos de penetración, desdoblamiento y reordenamiento. A bajas concentraciones, el área por molécula aumenta fuertemente cuando comienza la adsorción, y disminuye un poco por el incremento de π (Esquema 1). El grado de penetración, desdoblamiento y de cambios conformacionales (que resultan máximos a bajos valores de π) dependen del recubrimiento superficial, el cual varía con el tiempo y con la concentración en el seno de la solución (Narsimhan y Uraizee, 1992; Miller y col., 1998).

Tabla 2.1. : Constantes de velocidad de penetración y reacomodamiento en la interfase para soluciones de NSP y DSP 0,5 y 2%.

	0,5%		2%	
	$k_1 * 10^4$	$k_2 * 10^3$	$k_1 * 10^4$	$k_2 * 10^3$
NSP	1,57±0,03	1,85±0,09	1,46±0,02	1,67±0,06
DSP	1,69±0,02	1,41±0,09	1,05±0,02	1,22±0,03

$R^2 : 0,9982 - 0,9996$



Esquema 1: Conformación de las proteínas en la interfase con el aumento de la concentración proteica.

Diversos trabajos reportan mayores velocidades de descenso de la tensión superficial de proteínas desnaturalizadas (Mitchell, 1986; Damodaran y col., 1988) pero corresponden a estudios a menores concentraciones proteicas u a otras

proteínas. Sólo se observó una mayor velocidad de penetración por desnaturalización de la proteína a 0,5%. La menor velocidad de reacomodamiento en estas condiciones, podría deberse a la mayor presión inicial (π_i NSP 0,5%: 18,6 mN/m y π_i DSP 0,5%: 20,1 mN/m), pues la habilidad de las moléculas de adsorberse y desplegarse en una interfase ya cubierta por un film proteico, está limitada por la carga eléctrica y la presión superficial del film existente (Britten y Giroux, 1993). A la concentración de 2% las π_i fueron similares, $22,4 \pm 0,3$ mN/m para NSP y DSP. En las condiciones de trabajo, de baja fuerza iónica, la disociación de la estructura oligomérica en la NSP está favorecida, mejorando la migración, penetración y reacomodamiento de las subunidades en la interfase. Mejoras en la habilidad de proteínas globulares de adsorberse en la interfase en condiciones en las cuales la disociación de la estructura oligomérica se encuentra favorecida han sido reportadas por otros autores, siendo menor el efecto sobre proteínas tratadas térmicamente (Schwenke y col., 1993; Wagner y Gueguen, 1995). La presencia de agregados de alto peso molecular en DSP (Fig. 2.2.b y 2.4.b) dificultarían la penetración y el reacomodamiento, pues mayores tamaños moleculares aumentan la energía de la barrera de adsorción (Narsimhan y Uraizee, 1992). Asimismo, la conformación más extendida de la proteína desnaturalizada podría recubrir más la interfase y la presencia de numerosas interacciones sulfhidrilo dificultarían los reacomodamientos, pues las uniones disulfuro sirven como barrera de energía para el reacomodamiento de las cadenas peptídicas (Horiuchi y col., 1978).

2.2.3. Viscosidad de las soluciones

Las soluciones proteicas presentaron un leve comportamiento pseudoplástico, disminuyendo los índices de flujo con el aumento de la concentración proteica (n varió entre 0,96 - 0,81 para un rango de concentraciones de NSP y DSP entre 0,5 y 8%). Al someter a la dispersión proteica a una deformación, se rompen agregados de gran tamaño, disminuye el tamaño de la

partícula y la viscosidad (Puppo, 1997), lo cual explicaría el carácter pseuplástico presentado.

Al aumentar la concentración proteica, la viscosidad se incrementó en forma exponencial, encontrándose una concentración crítica (4%) a partir de la cual hay un cambio de comportamiento (Figura 2.8). A bajas concentraciones proteicas (donde se considera que no hay interacción entre las moléculas), la viscosidad de la solución depende del tamaño y la forma hidrodinámica de las moléculas, como así también de la hidratación y la carga eléctrica de la proteína (Puppo, 1997). En estas condiciones, no se observaron diferencias significativas en las viscosidades de las soluciones NSP y DSP, lo cual podría deberse a efectos contrapuestos sobre la viscosidad, de la disociación y el desplegamiento producidos en el aislado DSP (el primero la disminuye y el segundo la aumenta). Las diferencias marginales entre las viscosidades de las soluciones 0,5 - 2% son coincidentes con los resultados de Rao y col. (1986). A altas concentraciones, las interacciones moleculares entre las proteínas hidratadas y la perturbación interpartícula comienzan a ser dominantes. Con el aumento de la concentración, los coeficientes de consistencia de DSP se incrementaron mucho más que los de NSP. Los mayores coeficientes de consistencia observados en la proteína desnaturalizada, podrían estar relacionados no sólo con un aumento del volumen hidrodinámico de la proteína debido al desdoblamiento (Nir y col., 1994), sino también deberse a la formación de agregados solubles de alto PM, por reacciones de intercambio SH / S-S como se mostró en la Fig. 2.4. La mayor hidrofobicidad superficial de la proteína desnaturalizada promueve la formación de una matriz proteica (estabilizada por uniones hidrofóbicas) capaz de retener (u ocluir) cantidades significativas de agua en la estructura, estando la capacidad de retener agua de los aislados de soja relacionada con el comportamiento reológico de las dispersiones acuosas (Yao y col., 1988; Wagner y Añon, 1990).

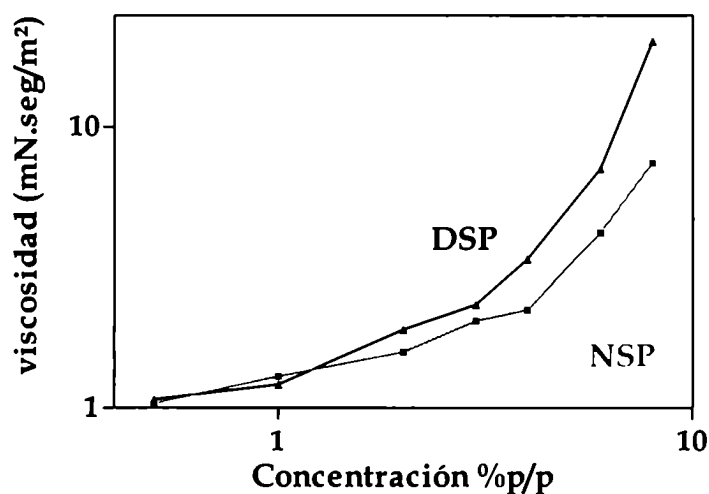


Figura 2.8: Variación de la viscosidad de soluciones de NSP y DSP a 225 seg-1 y 25°C.

2.2.4. Viscosidad superficial

La viscosidad superficial y el umbral de fluencia de un film interfacial, reflejan la cohesividad y resistencia del film proteico, vinculado con la magnitud y la fuerza de las interacciones proteína - proteína (Kim y Kinsella, 1987b). Se observó un aumento del torque (vinculado con la viscosidad superficial) durante el transcurso del tiempo hasta alcanzar un valor de equilibrio, reflejando la adsorción de la proteína en la interfase (Figura 2.9). Las variaciones de viscosidad superficial con el tiempo, observadas en la globulina 11S (Dickinson y Matsumura, 1991) fueron atribuidas a la formación lenta de uniones disulfuro durante el envejecimiento del film interfacial.

El tiempo necesario para llegar al equilibrio dependió principalmente de la velocidad de deformación (mayores velocidades para llegar al equilibrio al aumentar las revoluciones por minuto), en concordancia con lo observado por Blank (1969) en films de BSA, donde las interacciones eran aceleradas por el movimiento relativo en la superficie, aumentando la velocidad y la frecuencia del

contacto entre los grupos interactuantes. Las velocidades de aumento del torque fueron similares para las distintas concentraciones proteicas y para NSP y DSP.

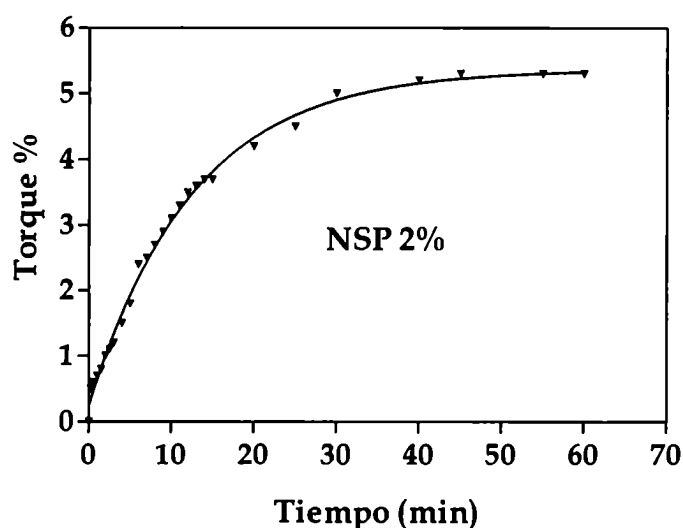


Figura 2.9: Variación del torque relacionado con la viscosidad superficial en función del tiempo para aislado protéico de soja nativo 2%p/p (12 rpm).

Los valores de torque resultaron menores a los reportados por Kim (1985) que utilizó un dispositivo similar al nuestro. Esto podría deberse al mayor espesor del borde del dispositivo en contacto con la superficie del líquido. Goodrich y Allen (1971) demostraron que la sensibilidad del dispositivo disminuye a medida que se incrementa el espesor. No obstante, la sensibilidad fue suficiente para medir en las concentraciones usadas en este trabajo.

En relación a los valores de torque de equilibrio, las interfases presentaron un comportamiento similar a la viscosidad de las soluciones, incrementándose levemente el carácter pseuplástico al aumentar la concentración. Generalmente, la presión superficial y las propiedades reológicas de los films interfaciales se incrementan con la concentración superficial hasta un nivel crítico, luego del cual ocurren pocos cambios (Rodríguez Patino y col., 1995). Ambas proteínas presentaron un pequeño incremento de la viscosidad superficial con la

concentración entre 0,5 y 2%, pero para mayores concentraciones proteicas no se observaron diferencias significativas. A bajas concentraciones, las moléculas proteicas adsorbidas, tienen tiempo de desplegarse y pueden constituir un film viscoso. A mayores concentraciones proteicas, la adsorción es más rápida, las moléculas tienen menos tiempos de desplegarse o pueden estar agregadas vía interacciones hidrofóbicas. Las proteínas presentan a altas concentraciones conformaciones intermoleculares más compactas en la fase adsorbida, presentando menores viscosidades superficiales (Miller y col., 1998; Dickinson y col., 1988).

No obstante las diferencias observadas en la composición interfacial y en la tensión superficial a altas concentraciones proteicas, donde la desnaturalización térmica produjo mayores disminuciones, las mismas no se vieron reflejadas en los valores obtenidos de viscosidad superficial entre NSP y DSP. La falta de diferencia podría estar vinculada a la recuperación parcial, al enfriarse, de la estructura terciaria, globular y compacta de las proteínas de soja, luego de la desnaturalización por calor (Damodaran, 1988; Iwabuchi y col., 1991b; Nir y col., 1994).

2.3. Capacidad de espumado

En la Figura 2.10 se observa la expansión de la espuma (%FE) a 25°C a distintas concentraciones proteicas. Los valores, que variaron entre 60 - 230%, son bajos con respecto a otros valores publicados (300 - 2000%, Halling, 1981) pero son similares a los reportados por Britten y col. (1992). La geometría del sistema puede limitar la cantidad de aire incorporado y ser responsable de los bajos valores obtenidos.

El tiempo de batido fue suficiente para alcanzar el máximo de espumado. No se observaron fenómenos de coagulación superficial, que dieran lugar a una

mayor desestabilización por exceso de agitación, en coincidencia con lo reportado en trabajos anteriores (Halling, 1981).

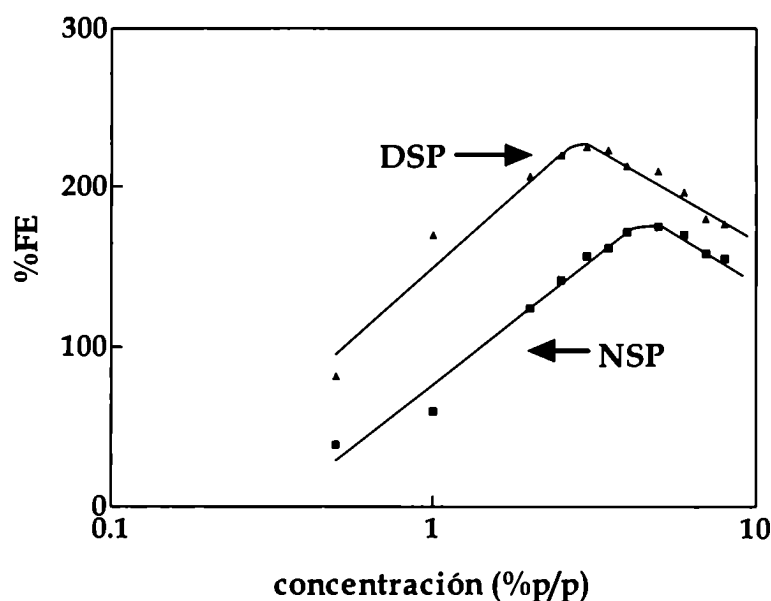


Figura 2.10: Variación de la expansión de la espuma con la concentración de proteína.

El %FE aumentó hasta un valor límite, luego del cual decreció. Un comportamiento similar fue reportado en otros trabajos (Britten y col., 1992; Cherry y Mc Watters, 1981; Vani y Zayas, 1995). Britten y col. (1992) estudiaron el efecto de la concentración de ovoalbúmina, caseinato de sodio y suero en las propiedades de espumado, y propusieron que la disminución en el volumen de espumado podría deberse a:

- una reducción de la solubilidad de las proteínas al aumentar la concentración (lo cual no se observó en este caso donde se obtuvieron solubilidades mayores al 98% en todas las soluciones).

- presencia de material insoluble que interfiere en la formación de espuma.

Para corroborar esto último se centrifugaron soluciones al 7% de NSP y DSP obteniéndose los resultados presentados en la Tabla 2.2.

Se observa que los sólidos insolubles explican parcialmente la disminución del volumen de espumado a altas concentraciones, afectando también a la

estabilidad de la espuma. Hermansson y col. (1971) también encontraron que la remoción de material insoluble reducía la estabilidad de espumas de concentrados proteicos de pescado, pero, el %FE no variaba. Según Dickinson (1989) la presencia de partículas sólidas adsorbidas de proteína insoluble serían particularmente efectivas en dar estabilidad a las espumas. Así mismo, la viscosidad de las soluciones centrifugadas disminuyó un 12% para NSP y un 20% para DSP.

Tabla 2.2.: Efecto del material insoluble (MI) en las propiedades de espumado

Solución proteica	Expansión de la espuma (%FE)		$k_{dr} \text{ (ml.min)}^{-1} \cdot 10^3$	
	NSP	DSP	NSP	DSP
Original (o)	158±6	180±6	6,8±0,9	5,5±1
Centrifugada (c)	173±6	203±6	12,2±2	8,1±0,9
Original + MI (o + MI)	161±6	180±6	7,8±0,9	4,9±0,7

(o) dispersión proteica 7%p/p; (c) dispersión proteica 7%p/p centrifugada a 2.500 rpm durante 20 min. con sólidos separados por filtración; (o + MI) material insoluble de la dispersión c que fue adicionado a una dispersión proteica 7%p/p con el fin de incrementar la cantidad de material insoluble.

Otro aspecto que debe ser considerado es la densidad de la espuma que afecta a la capacidad de espumado especialmente cuando la concentración proteica es alta. Si la proteína incorpora gran cantidad de líquido en la lamela de la espuma, la disponibilidad de líquido comienza a ser un factor limitante por lo cual no aumenta el volumen de espumado. Esta es una de las razones por las cuales la capacidad de espumado decrece a altas concentraciones proteicas después de haber alcanzado un máximo (Kim, 1985).

En el rango de concentraciones en que el %FE aumenta, se observó una relación logarítmica con la concentración, acorde con la relación obtenida por Britten y Lavoie (1992):

$$\%FE = j \cdot \log C + A \quad (2.2.)$$

donde C corresponde a la concentración proteica, A representa el valor de %FE de una solución al 1% y j es una constante que depende de las condiciones de batido. Los parámetros de regresión y los coeficientes de correlación obtenidos se muestran en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3.: Constantes del modelo matemático de expansión de la espuma (Britten y Lavoie, 1992)

Solución proteica	constante A ¹ A ± σ	Constante j ¹ j ± σ	R ²
NSP	77 ± 5	158 ^a ± 11	0,975*
DSP	149 ± 8	179 ^a ± 24	0,931*

¹ Parámetros de regresión y desviación estandar

* P<0,01

^a No difieren significativamente determinados por análisis de ANCOVA (P<0,05).

La regresión fue realizada con NSP 0,5 - 4% y con DSP 0,5 - 3,5% p/p.

Como puede observarse, los valores de j para NSP y DSP no difieren significativamente, mientras que A resultó mayor para DSP como era esperable. En todo el rango de concentraciones se observó una mayor capacidad de espumado del aislado desnaturalizado.

La estructura y las propiedades de los films formados por mezclas de proteínas son significativamente más complejos que aquellos de sistemas proteicos simples, debido a la formación de complejos proteína-proteína en la interfase

(Dickinson y col., 1988). La capacidad de espumado y la estabilidad de las espumas de aislados de soja no son efectos aditivos en cuanto a las propiedades de las proteínas 7S y 11S por separado (Yu y Damodaran, 1991b). Es posible que la disociación y desnaturalización causada por el tratamiento térmico o por una desnaturalización superficial, facilite las condiciones para una interacción intermolecular entre las proteínas en la interfase aire-líquido (Yu y Damodaran, 1991a).

Si se relacionan los %FE con la tensión superficial se observa que para NSP el máximo volumen de espumado coincide con la saturación de la interfase ($\pi = 17$ mN/m); para DSP este máximo estaría a una presión superficial similar ($\pi = 16$ mN/m) pero este valor es mucho menor que el correspondiente a la saturación de la monocapa. En todos los casos se observó un mayor %FE para la proteína desnaturalizada con respecto a la nativa, aún cuando no se observaron diferencias importantes en la tensión superficial hasta un 3% de concentración que lo justifiquen. La falta de correlación entre capacidad espumante y tensión superficial de equilibrio también fue reportada por Kitabake y Doi (1988). En dicho trabajo, coincidiendo con Mitchell (1986), se muestra como el poder espumante de distintas proteínas formadas por burbujeo, incluida la proteína de soja nativa, presenta una buena correlación con las constantes de velocidad del decaimiento de la tensión superficial. Sin embargo, los valores obtenidos en las velocidades de disminución de la tensión superficial para NSP y DSP (Tabla 2.2) no justifican las variaciones en la capacidad espumante observadas por la desnaturalización térmica. Phillips y col. (1990) tampoco encontraron una buena correlación entre velocidades de disminución de la tensión superficial y capacidad espumante, en espumas formadas por batido. La agitación de una solución proteica imparte cierta energía superficial, causando el desplegamiento de las proteínas. En forma similar a un proceso de mecanólisis, donde se observan tres fases: disociación, agregación y degradación, las fuerzas de corte ejercidas sobre las moléculas al batir podrían modificar las fuerzas secundarias (interacciones hidrofóbicas y iónicas) y

eventualmente romper uniones disulfuro, permitiendo mayor flexibilidad conformacional y afectando la formación de la capa proteica adsorbida en la región interfacial, incrementando el volumen de espuma y disminuyendo el drenaje por formación de un film estable y cohesivo (Rawel y col., 1994). La velocidad de adsorción no sería entonces un paso limitante en la formación de espumas por batido (Phillips y col., 1990). La agitación no solo produce cambios conformacionales, sino que también facilita las interacciones proteína – proteína, formándose agregados hidrofóbicos que se reducen con SDS (Ker y Chen, 1998).

La mejora en las propiedades espumantes, cuando las proteínas permanecen solubles luego de la desnaturalización térmica (Kato y col. 1981, 1983a), se ha explicado por un aumento de la hidrofobicidad superficial, obteniéndose buenas correlaciones (Kato y col., 1980; Townsend y Nakai, 1983). La presencia de mayor cantidad de especies monoméricas también contribuiría a mejorar la capacidad de formar espumas (Zhu y Damodaran, 1994). En la interfase aire – agua de DSP se observó la presencia predominante del polipéptido B (Fig. 2.5) altamente hidrofóbico y de pequeño tamaño molecular, que facilitaría la formación del film permitiendo una mayor incorporación de aire.

Se ha observado que sistemas que contienen tanto componentes ácidos como básicos exhiben marcadas mejoras en las propiedades de espumado (Poole y col., 1984), resultantes del aumento de las interacciones proteína – proteína en la superficie de las burbujas, a valores de pH entre sus puntos isoeléctricos, donde presentan cargas opuestas y pueden presentar interacciones electrostáticas (Poole, 1989). La ruptura de la subunidad A-B facilitaría la interacción entre componentes básicos (polipéptidos B, que en la proteína nativa están en el interior de la molécula de glicinina) y de componentes ácidos en el film interfacial. Esto sugeriría una posible atracción electrostática entre polipéptidos cargados negativamente como el A (pI entre 4,6 – 5,4) o las subunidades de la conglucina de soja que tienen carga negativa a pH neutro (pI entre 4,9 – 5,7) y el polipéptido básico B, en la interfase.

2.4. Estabilidad de las espumas

2.4.1. Estabilidad al drenado

La velocidad de drenaje de líquido se estudió a 25°C, en dos geometrías diferentes, en pipeta y en probeta, según el método de Elizalde y col. (1991) y se aplicó el modelo matemático según ecuación 1.2.

Geometría: pipeta de 10 mL

En las Figuras 1.4. a y b se mostraron las curvas correspondientes para algunas de estas espumas, obteniéndose valores de R^2 entre 0,997 – 0,999 cuando se aplicó la ecuación 1.2. En las Figuras 2.11. a y b, puede observarse el efecto de la concentración proteica sobre los parámetros V_L , n y tiempo de drenado de $V_L/2$ ($c^{1/n}$) para NSP y DSP respectivamente.

El volumen máximo de líquido drenado (V_L) no varió apreciablemente con la concentración para NSP mientras que para DSP mostró un pequeño incremento. Este comportamiento es específico de las condiciones experimentales usadas, donde el exceso de líquido que no es incorporado a la espuma (si existe), se separa de la espuma antes de realizar las mediciones de estabilidad. El pequeño incremento en V_L observado para DSP es probablemente consecuencia de la mejora tanto en el volumen de espumado como en la cantidad de líquido incorporado a la misma al aumentar la concentración proteica. Los valores de V_L resultaron mayores para las espumas de NSP que aquellas de DSP, lo cual es acorde con menores volúmenes de espumado de NSP (%FE 60 - 175%) en comparación con DSP (%FE 85 - 230%).

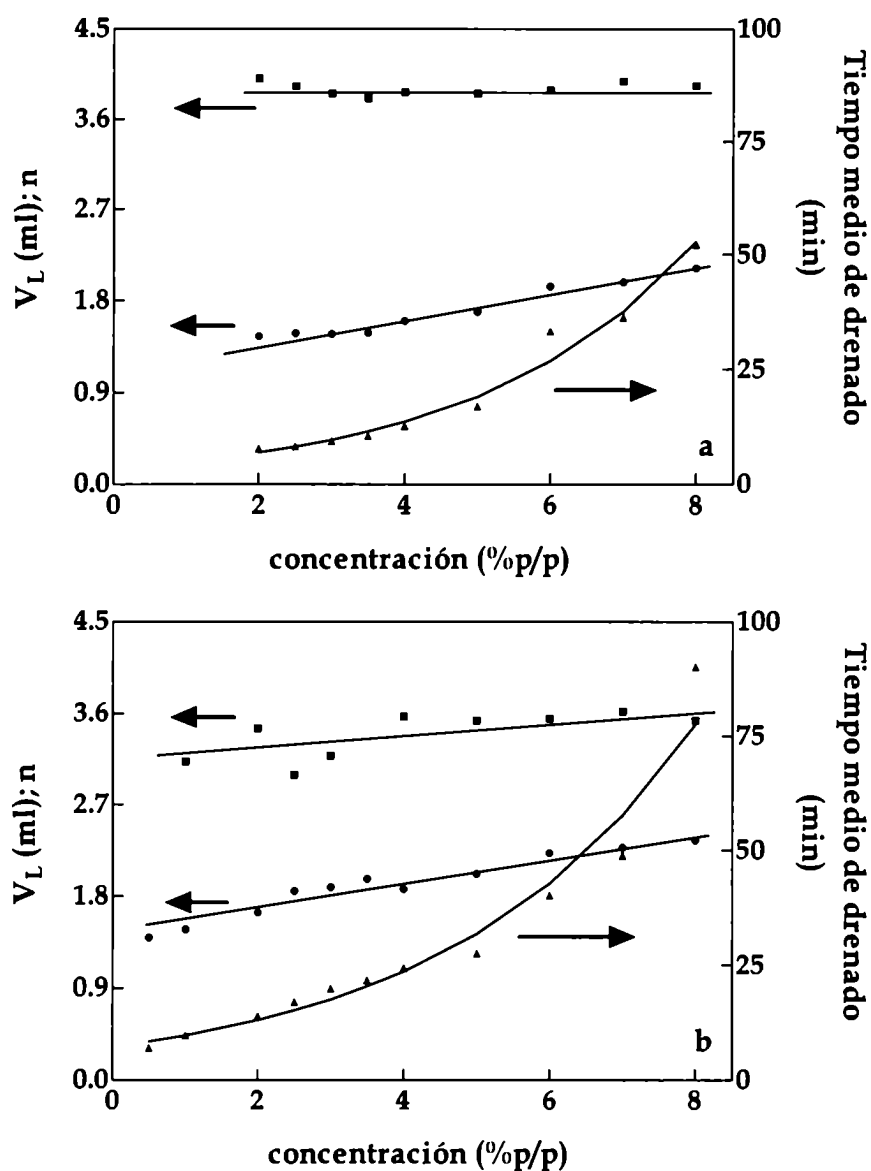


Figura 2.11: Efecto de la concentración de a) NSP y b) DSP sobre el volumen máximo de líquido drenado, V_L (■), el parámetro n (●) y el tiempo medio de drenado (▲).

El parámetro n obtenido por aplicación del modelo y relacionado con el comportamiento sigmoideo de las curvas de drenado, aumenta linealmente con la concentración y presenta mayores valores para DSP. Cuando la concentración disminuye, n se aproxima a 1, lo cual corresponde una cinética de segundo orden (comportamiento semejante al micaliano). El tiempo necesario para que drene

$V_L/2$ aumentó mucho con la concentración, especialmente a partir del 5%p/p, donde la interacción entre moléculas aumenta, incrementando la viscosidad de las soluciones y disminuyendo la velocidad de drenaje. Los tiempos de retardo obtenidos aumentaron con la concentración y fueron mayores para DSP que para NSP (Tabla 2.4.).

Tabla 2.4.: Tiempos de retardo "lag" para el comienzo del drenaje de líquido de espumas NSP y DSP en función de la concentración proteica.

	Concentración de aislado proteico %p/p										
	0,5%	1%	2%	2,5%	3%	3,5%	4%	5%	6%	7%	8%
	Tiempo (minutos)										
NSP	-	-	0	0	0	0	0	0,9	3,5	4,4	6,0
DSP	0	0,2	0,9	2	1,8	0,4	1,5	2,0	5,7	6,1	13,2

* los errores oscilan entre un 10 y un 30%

Las velocidades máximas de drenado "MDR", ml/min, (ecuación 1.4) resultaron siempre mayores para espumas de NSP que de DSP (por ejemplo, puede apreciarse al comparar las Figuras 1.7. a y 1.7. b, donde $MDR\ 6\% \ NSP = 0,091\text{ml/min}$ y $MDR\ 6\% \ DSP = 0,059\text{ml/min}$), en todo el rango de concentraciones estudiado, indicando que estas últimas son más estables al drenaje. Las relaciones k_{drNSP}/k_{drDSP} oscilaron entre 1,1 y 1,5 para las distintas concentraciones.

Al aumentar la concentración proteica fueron necesarios mayores tiempos para alcanzar la velocidad máxima y los máximos ocurrieron a mayores porcentajes de drenado.

En el rango de concentraciones estudiadas, se observó una relación logarítmica entre las constantes de velocidad (k_{dr}) o las velocidades máximas de drenaje (MDR) y la concentración proteica (Figura 2.12.a y b). Las constantes de drenado y las MDR pueden expresarse entonces en función de la concentración según:

$$k_{dr}(oMDR) = b \cdot e^{-g \cdot r} \quad (2.3.)$$

donde b y g son constantes.

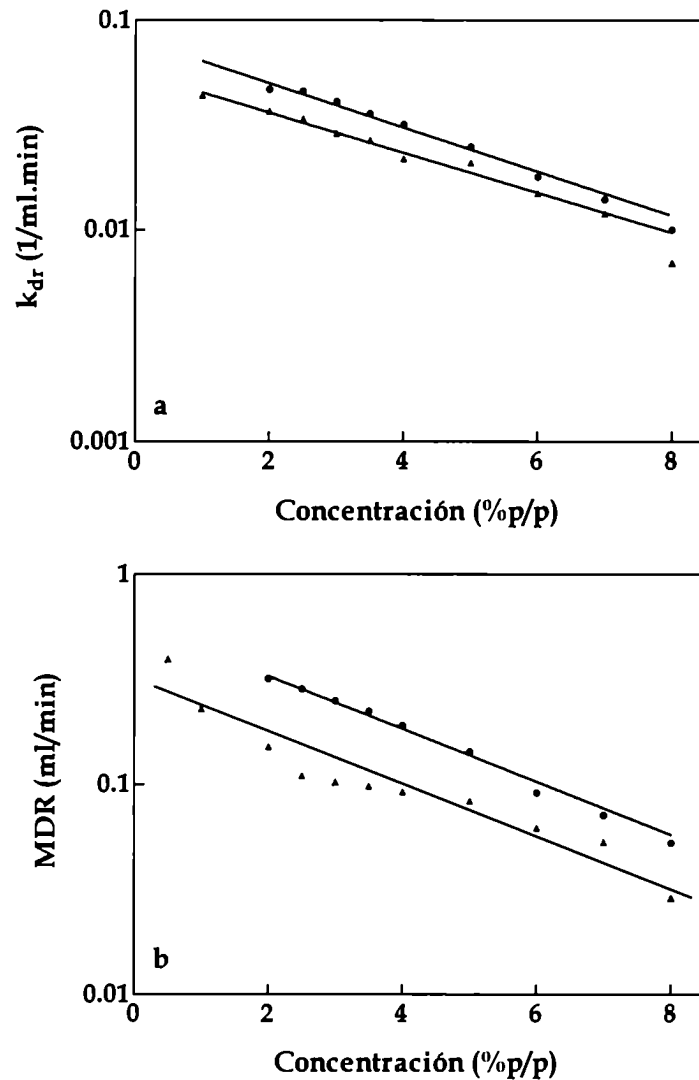


Figura 2.12: Efecto de la concentración de NSP (●) y DSP (▲) sobre: a) constantes de drenaje, k_{dr} , b) velocidades máximas de drenaje, MDR.

En la Tabla 2.5. se muestran las constantes y los coeficientes de correlación para NSP y DSP. El análisis de covarianza (ANCOVA) aplicado para determinar diferencias significativas entre las pendientes para NSP y DSP (constantes g) mostró que estas eran similares ($P < 0,05$), indicando que el proceso de

desnaturalización térmica de las proteínas de soja no modifica el efecto de la concentración sobre la velocidad de drenaje.

Tabla 2.5.: Constantes para caracterizar el efecto de la concentración proteica sobre las constantes de velocidad de drenado (k_{dr}) y la máxima velocidad de drenado (MDR).

Parámetro de estabilidad	aislado proteico	Constante b ^a		Constante g ^a		R ²
		b	s.d.	g	s.d.	
k_{dr}	NSP	0,081	0,004	0,24 ^b	0,02	0,985**
k_{dr}	DSP	0,053	0,002	0,20 ^b	0,01	0,977**
MDR	NSP	0,59	0,02	0,29 ^c	0,01	0,993**
MDR	DSP	0,28	0,02	0,28 ^c	0,03	0,927**

^a Parámetros de regresión y desviación estándar; ^b y ^c valores con letras iguales no difieren significativamente ($P < 0,05$), determinación por análisis de covarianza. ** $P < 0,01$

La desnaturalización mejoró mucho la estabilidad de las espumas al drenado. Diversos autores reportaron mejoras en la estabilidad de espumas de proteína desnaturalizada debido a la mayor hidrofobicidad superficial (Horiuchi y col., 1978; Arteaga y Nakai, 1993; Wagner y col., 1996) y a una mayor habilidad para asociarse y formar el film debido a la desnaturalización (Eldrige y col., 1963; Kato y col., 1983a).

Dada la presencia de agregados HMW en la interfase de espumas de DSP, se puede inferir que estos films tendrían una mayor capacidad de retención de agua, retardando el drenaje de líquido. Los agregados en el aislado DSP disminuyen el número de grupos sulfhidrilo libres, produciendo un incremento en la capacidad de absorción de agua (Wagner y Añon, 1990). Asimismo, producirían un efecto de estabilización al drenado por presencia de polímeros vía S-S, similar al observado en aislado de suero por Zhu y Damodaran (1994).

Adicionalmente, films interfaciales de mayor viscoelasticidad y mayor espesor, resultantes de un aumento de la concentración proteica, son factores importantes que reducen el flujo de líquido dentro de la estructura de la lamela (Kinsella, 1981a; Phillips, 1981; Dickinson y Stainsby, 1982) no sólo porque se desacelera el angostamiento del film, sino también porque se oponen al drenado a través del plateau border, retardando la transformación gradual de una espuma húmeda en una espuma seca (Angarska y col., 1998). Si bien en este trabajo no se determinó el espesor de los films, el gran aumento de π en la DSP al aumentar la concentración (Fig. 2.6.b, pág. 106) reflejaría una mayor cantidad de proteína adsorbida, lo cual implicaría un mayor espesor.

Un aumento de la viscosidad del líquido, especialmente si existe un umbral de fluencia, disminuye sensiblemente la velocidad de drenado (Walstra, 1989). En la Figura 2.13 se muestra la relación entre las constantes de velocidad de drenado (k_{dr}) y los coeficientes de consistencia de las soluciones (k_v). El aumento de estabilidad al drenaje de las espumas de proteína de soja al incrementarse la concentración proteica, puede entonces atribuirse principalmente a un aumento de viscosidad de la fase continua. De acuerdo con la ecuación de Reynolds propuesta por Scheludko (1967) la velocidad de drenado del film puede ser descripta por:

$$V_{rc} = -\frac{dh}{dt} = \frac{2h^3}{3\eta R^2} \Delta p, \text{ donde } h \text{ es el espesor del film, } t \text{ es el tiempo, } \eta \text{ la viscosidad}$$

dinámica de la fase continua, R el radio de la burbuja y $\Delta p = \pi_h - \pi_d$ es la diferencia entre la presión hidrostática capilar (π_h) y la presión de separación entre dos films (π_d). Cuando los films no son homogéneos, esta ecuación debe ser corregida y debe considerarse la tensión superficial del film (Tsekov, 1999).

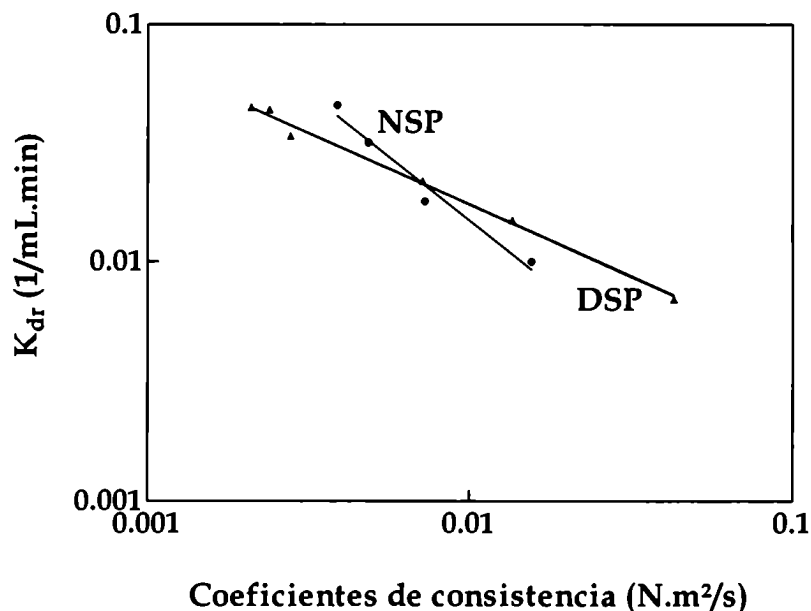


Figura 2.13: Relación entre las constantes de drenado (K_{dr}) y los coeficientes de consistencia (k_v): NSP (●): $\ln K_{dr} = -(9,1 \pm 10,14) - 1,06^a \pm 0,10 \ln k_v$ ($R^2=0,963$, $P<0,01$); DSP (▲): $\ln K_{dr} = -(6,89 \pm 0,10) - (0,621^b \pm 0,026) \ln k_v$ ($R^2=0,984$, $P<0,01$); ^{a,b} análisis de ANCOVA sobre igualdad de pendientes indica que son significativamente diferentes ($P<0,05$).

Con el aumento de la concentración proteica las velocidades de drenado disminuyen también por un incremento en la inmovilización de las superficies de las capas adsorbidas (Angarska y col., 1998).

Geometría: probeta A

Al cambiar la geometría del sistema el drenaje de líquido se modificó (Tablas 2.6. a y b).

Tabla 2.6.a: Parámetros de las curvas de drenado para NSP (probeta)

Conc.prot. %p/p	lag min	V _L ml	c ^{1/n} min	n	k _{dr} (ml.min) ⁻¹ .10 ²	R ²
2,0	0	14,6±0,5	3,2±0,2	0,82±0,04	1,7±0,2	0,995
3,0	0	13,3±0,4	6,2±0,6	1,19±0,06	1,4±0,2	0,994
4,0	0,2±0,1	13,9±0,5	6,8±0,5	1,36±0,05	1,4±0,1	0,997
5,0	1,1±0,1	13,8±0,4	8,9±1	1,48±0,06	1,2±0,1	0,997
6,0	1,4±0,3	14,4±0,5	8,8±0,8	1,42±0,05	1,1±0,1	0,997
8,0	2,2±0,4	14,3±0,4	14±1	1,72±0,05	0,82±0,06	0,998

Tabla 2.6.b: Parámetros de las curvas de drenado para DSP (probeta)

Conc.prot. %p/p	Lag Min	V _L ml	c ^{1/n} min	n	k _{dr} (ml.min) ⁻¹ .10 ²	R ²
2,0	0	15,1±0,5	6,8±0,4	1,11±0,03	1,1±0,1	0,998
3,0	0	13,4±0,3	12,4±1	1,76±0,06	1,1±0,1	0,997
4,0	1,2±0,2	13,4±0,3	14 ±2	1,72±0,06	0,92±0,05	0,998
5,0	1,5±0,1	13,2±0,2	15 ±1	1,80±0,04	0,91±0,01	0,999
6,0	2,5±0,2	13,4±0,7	19 ±2	1,96±0,04	0,77±0,07	0,999
8,0	4,1±0,3	14,3±0,3	40 ±5	2,07±0,05	0,36±0,05	0,999

Las velocidades de drenado fueron mucho mayores que en la geometría anterior y los tiempos para que drene V_L/2 fueron menores. Esto se corresponde con una mayor inestabilidad de la espumas al aumentar la superficie de contacto aire-espuma.

El tiempo lag previo al drenaje de la espuma disminuyó aproximadamente tres veces y los parámetros característicos del comportamiento sigmoideo (n) fueron un poco menores a los encontrados en las condiciones anteriores, siendo

siempre mayores para la proteína desnaturalizada. Las espumas provenientes de DSP resultaron más estables al drenaje en todo el rango de concentraciones estudiado, correspondiendo valores entre 1,7 - 3,3 a la relación k_{drNSP}/k_{drDSP} .

Visualmente se observó una mayor velocidad de desproporción en la probeta que en la pipeta, lo cual se debería al aumento del área interfacial superficie-espuma al cambiar la geometría.

Las constantes de velocidad de drenado también presentaron una relación exponencial con la concentración y una relación doble logarítmica con los coeficientes de consistencia de las soluciones como los encontrados con la otra geometría.

Para estudiar si el efecto del cambio de geometría era similar para ambas proteínas, se compararon los tiempos correspondientes al drenado de la mitad del volumen máximo, $V_L/2$ (Figura 2.14). Como el cambio de geometría involucró un cambio de volumen de espuma tomado y diferentes volúmenes máximos drenados, no resultó conveniente comparar las constantes de velocidad K_{dr} (Elizalde y col., 1991).

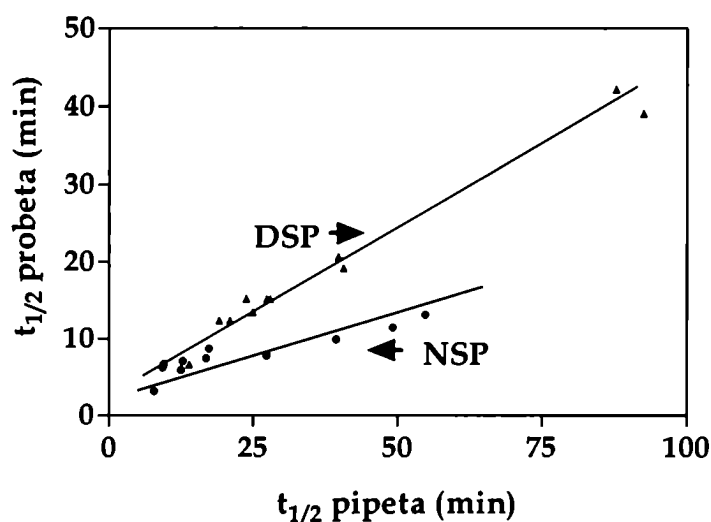


Figura 2.14: Correlación entre el tiempo medio de drenado en las distintas geometrías, pipeta y probeta.

La obtención de dos correlaciones distintas para NSP y DSP se debe a que el cambio de geometría afecta a todos los procesos de desestabilización (drenado, colapso y desproporción) y la magnitud y relación en que ellos varían no es la misma para ambas proteínas.

2.4.2. Estabilidad de las espumas según el método reológico

En las Figuras 2.15 a y b, se muestran las curvas de viscosidad aparente de las espumas en función del tiempo para distintas concentraciones de NSP y DSP.

En las Tablas 2.7 a y b, se presentan los resultados experimentales obtenidos para la viscosidad aparente máxima, el tiempo para alcanzarla y los parámetros a , K_1 y K_2 y sus desviaciones estándar obtenidas por análisis de regresión no lineal de la ecuación 1.1 aplicados a distintas espumas de proteína de soja. La ecuación 1.1 presenta un muy buen ajuste a los datos experimentales como puede apreciarse por los valores de R^2 y por las curvas en las Figuras 2.15 a y b.

La viscosidad máxima alcanzada disminuyó con el aumento de la concentración para la proteína desnaturalizada. Para la proteína nativa se encontró una disminución hasta un 4% de concentración y luego aumentó nuevamente. Se encontró una buena correlación entre la relación de las constantes de drenado y desproporción (K_1/K_2^2) y la máxima viscosidad aparente alcanzada ($R^2 = 0,907$, $P < 0,1$ para espumas NSP; $R^2 = 0,945$, $P < 0,1$ para espumas DSP), lo cual prueba que esta última depende del balance entre las velocidades de los dos procesos involucrados.

El tiempo al cual se alcanzó la viscosidad máxima aumentó con la concentración de proteína (al aumentar la estabilidad de la espuma) siendo mayor para las espumas provenientes de la proteína nativa hasta un 4%, situación que luego se invirtió. En cuanto al porcentaje de espuma que drenó al alcanzar dicho punto varió para NSP entre 60-65% (excepto para 2%: 72%) y para DSP entre 35-56% (excepto para 8%: 67%). Las densidades de las espumas correspondientes a

dicha viscosidad máxima disminuyeron con el aumento de la concentración y, excepto para el 8%, resultaron mayores para DSP que para NSP. Estas determinaciones también estarían vinculadas a la relación entre ambos procesos de desestabilización. No se halló ninguna relación matemática consistente entre el parámetro "a" y la viscosidad máxima alcanzada, presentando ambos un comportamiento similar con la concentración.

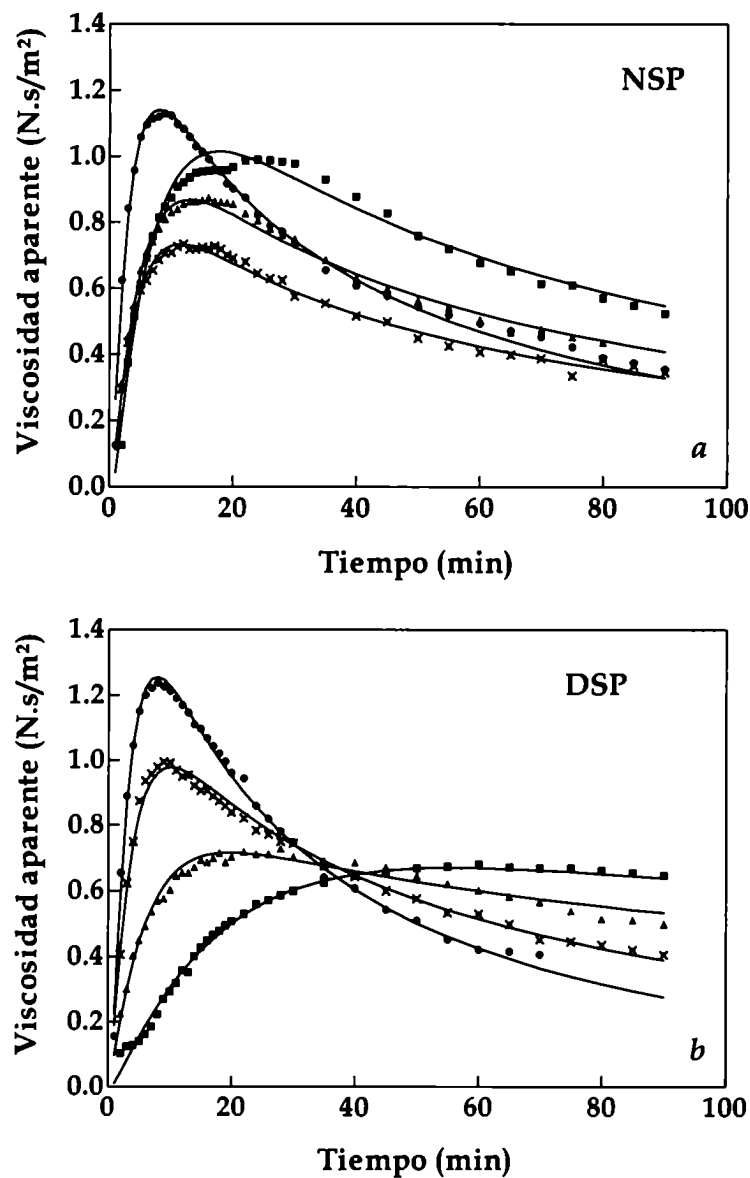


Figura 2.15: Viscosidad aparente de las espumas en función del tiempo para distintas concentraciones de proteína: (●) 2%; (×) 4%; (▲) 6%; (■) 8%; a) NSP y b) DSP.

Tabla 2.7.a: Constantes del modelo cinético para la evolución de la viscosidad aparente de espumas de NSP.

Conc. Prot. %p/p	Viscosidad Máxima (cps)	tiempo visc.máx. (min)	a (cps)	K ₁ (min) ⁻¹	K ₂ (min) ^{-0,5}	K ₁ /K ₂ ²	R ²
2,0	1123±32	9,0±0,6	2165±82	0,331±0,007	0,188±0,008	9,4	0,984
3,0	1024±13	10,9±0,3	2030±70	0,310±0,005	0,190±0,008	8,6	0,993
4,0	724±10	12,2±0,2	1249±40	0,259±0,006	0,138±0,006	13,6	0,988
5,0	862±13	14,3±0,9	1557±69	0,243±0,006	0,146±0,008	11,4	0,992
6,0	983±30	16 ±2	1864±49	0,207±0,005	0,148±0,006	9,5	0,992
8,0	1012±13	25 ±5	1988±87	0,162±0,004	0,137±0,008	8,6	0,986

Tabla 2.7.b: Constantes del modelo cinético para la evolución de la viscosidad aparente de espumas de DSP.

Conc. Prot. %p/p	Viscosidad Máxima (cps)	tiempo visc.máx. (min)	a (cps)	K ₁ (min) ⁻¹	K ₂ (min) ^{-0,5}	K ₁ /K ₂ ²	R ²
2,0	1228±11	8,0±0,1	2854±60	0,349±0,004	0,249±0,005	5,6	0,994
3,0	1083±14	8,8±0,2	2570±107	0,268±0,005	0,225±0,008	5,3	0,987
4,0	1018±13	9,8±0,1	1833±105	0,280±0,001	0,157±0,009	11,3	0,969
5,0	874± 8	18,0±1	1298±60	0,250±0,001	0,105±0,008	23,0	0,978
6,0	732± 5	24 ±4	1022±57	0,174±0,009	0,067±0,009	38,8	0,983
8,0	657±24	59 ±1	1025±56	0,055±0,001	0,052±0,005	20,3	0,992

Las constantes de velocidad de drenado (K₁) decrecieron aproximadamente un 50% para las espumas de NSP y un 85% para DSP, en el rango de concentración 2-8%. Las constantes de desproporción (K₂), disminuyeron hasta un 26% para las espumas de NSP con un aumento de la concentración hasta un 4%; un incremento posterior de la concentración no afectó dicho valor (Tabla 2.7.a). En cambio, para las espumas de DSP, la velocidad de desproporción se redujo en un 80% por el

incremento de la concentración proteica entre un 2% - 8% (Tabla 2.7.b.). La relación entre las constantes de drenaje y desproporción (K_1 / K_2^2) para las espumas de NSP indican que la contribución relativa del drenaje a la desestabilización de la espuma aumenta hasta una concentración del 4-5%. Las espumas de DSP presentaron un comportamiento diferente; a bajas concentraciones la contribución relativa del drenaje fue menor que para NSP y, además, la relación K_1 / K_2^2 aumentó hasta un 6% de concentración. Las diferencias observadas entre las espumas de NSP y DSP se deben principalmente al efecto diferente de la concentración sobre la desproporción.

Las constantes de velocidad de drenado (K_1) provenientes de mediciones de viscosidad aparente presentaron una alta correlación con las constantes de velocidad de drenaje de líquido (k_{dr}) (Figura 2.16) lo cual reafirma que puede asumirse que el incremento de la viscosidad de la espuma en el tiempo se debe al proceso de drenaje.

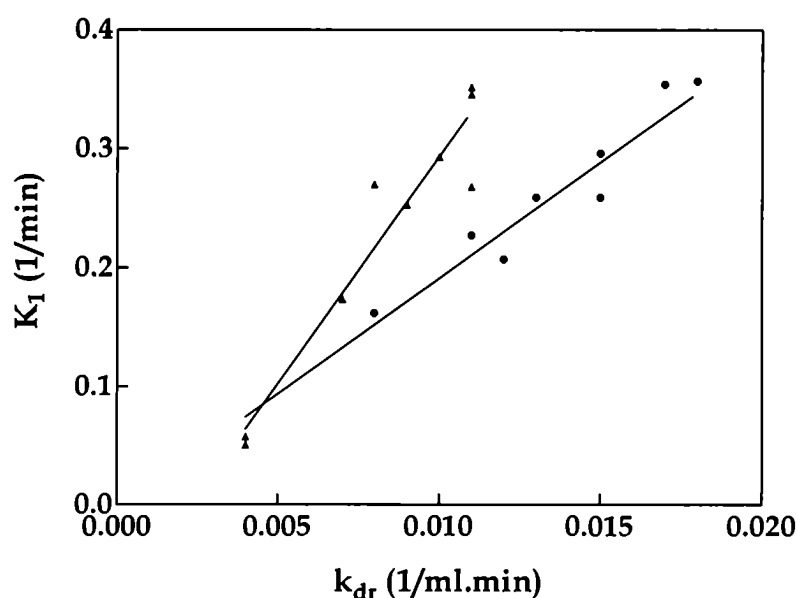


Figura 2.16: Relación entre las constantes de drenado (viscosidad: K_1) y de drenaje de líquido (k_{dr}), para NSP (●) y DSP (▲). Correlaciones obtenidas: para NSP, $K_1 = (0,04 \pm 0,03) + (16^a \pm 2) k_{dr}$ ($R^2 = 0,924$ $P < 0,01$); para DSP, $K_1 = (-0,07 \pm 0,03) + (38^b \pm 3) k_{dr}$ ($R^2 = 0,951$ $P < 0,01$).

^{a,b}: pendientes significativamente diferentes, ANCOVA ($P < 0,05$).

Mientras las mediciones directas de constantes de velocidad de drenaje de líquido (k_{dr}) revelaron un incremento de la estabilidad al drenado de espumas DSP comparadas con espumas NSP (Tabla 2.6. a y b), en un amplio rango de concentraciones, las constantes de velocidad de drenado provenientes de mediciones de viscosidad aparente (K_1) sólo mostraron esa tendencia a concentraciones mayores al 6% (Tablas 2.7.a. y 2.7.b.). Las propiedades superficiales del film han sido identificadas como un factor muy importante en la reología de las espumas (Halling, 1981; Nutt y Burley, 1989). Podría suponerse que la falta de diferencia entre las constantes de drenado (K_1) entre espumas DSP y NSP a bajas concentraciones, estuviera relacionada con una mayor viscosidad superficial de los films de DSP, lo cual influiría en un mayor aumento de la viscosidad aparente. Esta hipótesis no es correcta, pues como se explicó en 2.2.4. la viscosidad superficial de los films de DSP y NSP fue similar. El comportamiento diferente podría estar relacionado con los distintos mecanismos que determinan el drenaje de líquido. La constante k_{dr} está principalmente vinculada con el drenado gravitatorio global de la espuma, mientras que en K_1 el efecto del drenado gravitatorio es menor, presentando mayor influencia el drenaje capilar (pág. 87).

Ambas constantes de velocidad k_{dr} o K_1 presentaron una alta correlación con los índices de consistencia de las soluciones proteicas. Dichas relaciones pueden expresarse, como se vio anteriormente, según: $k_{dr} \text{ o } K_1 = b \cdot k_v^k$. En la Tabla 2.8 se presentan las constantes y los coeficientes de correlación obtenidos.

Tabla 2.8: Constantes para el modelo matemático que relaciona velocidades de drenado y viscosidad de soluciones de proteína de soja.

Constantes de velocidad de drenado	N S P			D S P		
	$b \pm \sigma^1$	$g \pm \sigma^1$	R^2	$b \pm \sigma^1$	$g \pm \sigma^1$	R^2
k_{dr} (1/ml.min)	0,0010 $\pm 0,0002$	-0,50 ^{a,c} $\pm 0,03$	0,991*	0,0010 $\pm 0,0003$	-0,41 ^{a,d} $\pm 0,04$	0,958*
K_1 (min ⁻¹)	0,026 $\pm 0,004$	-0,43 ^{b,c} $\pm 0,03$	0,985*	0,007 $\pm 0,003$	-0,70 ^{b,e} $\pm 0,09$	0,929*

¹ parámetros de regresión y desviación estandar

* $P < 0.01$

^{a,b,c,e} parámetros de regresión con la misma letra no difieren significativamente ($P < 0.05$) por determinación por análisis ANCOVA.

Las constantes de velocidad de disminución de la viscosidad aparente (K_2) presentaron una estrecha correlación con la tensión superficial de las soluciones proteicas (Figura 2.17), indicando que la velocidad de desproporción disminuye cuando baja la tensión superficial. La correlación entre K_2 y la tensión superficial fue muy buena para DSP, siendo menor para NSP, pero con un buen valor de P ($P < 0,01$). El menor valor de R^2 para NSP puede deberse al estrecho rango de valores de tensión superficial (Fig. 2.6). Los coeficientes de regresión para NSP y DSP, no difirieron significativamente ($P < 0,025$). Estos resultados están de acuerdo con la siguiente ecuación (Prins, 1988) que expresa el tiempo necesario para que una burbuja pequeña se contraiga hasta un cierto tamaño (R) por difusión del gas desde ella hacia otra burbuja mayor localizada a una distancia promedio (D):

$$R^2 = R_0^2 - (4 R' T D S \infty \gamma / p_0 \delta) t \quad (2.4.)$$

donde R_0 es el radio de la burbuja a t (tiempo) = 0, D es el coeficiente de difusión del gas en el líquido, S_∞ es la solubilidad del gas en el líquido, p_0 es la presión sobre el sistema, R' es la constante de los gases, T es la temperatura, δ es la densidad de la fase líquida y γ es la tensión superficial. Los resultados obtenidos son acordes a la proporcionalidad entre la velocidad de contracción de las burbujas y la tensión superficial, y corroboran la validez de atribuir los valores de K_2 al proceso de difusión del gas entre las burbujas.

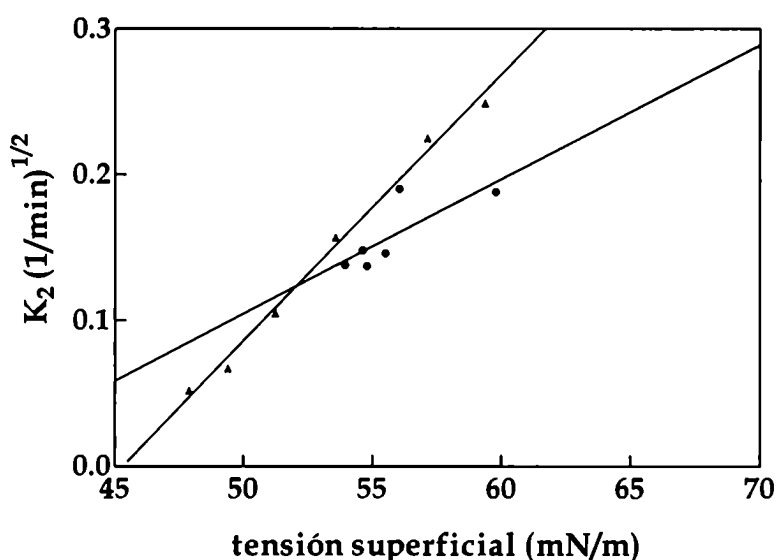


Figura 2.17: Relación entre las constantes de decaimiento de la viscosidad, por desproporción (K_2) y la tensión superficial (γ) de las dispersiones proteicas, NSP (•) y DSP (▲); para NSP $K_2 = (-0,36 \pm 0,2) + (0,0093 \pm 0,0036)\gamma$ ($R^2 = 0,627$ $P < 0,01$) y para DSP $K_2 = (-0,83 \pm 0,04) + (0,0183 \pm 0,0008)\gamma$ ($R^2 = 0,992$ $P < 0,01$).

La menor estabilidad a la desproporción, de la proteína desnaturalizada a bajas concentraciones proteicas no puede explicarse por diferencias en la tensión superficial. La mayor participación de los polipéptidos B (con carga positiva y cercanos al pI) en el film de DSP, disminuiría las repulsiones electrostáticas entre los films superficiales necesarias para que las burbujas se mantengan a una distancia crítica y minimicen la coalescencia (Kinsella, 1981a); esto también permitiría una mayor velocidad de difusión del aire, aumentando la velocidad de

desproporción. Una variación en el tamaño de las burbujas entre NSP y DSP también sería un factor a tener en cuenta para explicar las diferencias observadas en la velocidad de desproporción.

2.4.3. Estabilidad al colapso

La estabilidad al colapso se evaluó en la probeta utilizada en el método reológico (en las pipetas no se observó colapso durante el transcurso de la medición).

Al aumentar la concentración proteica (C_p) el colapso de las espumas se retardó ya que aumentaron los tiempos necesarios para observar el comienzo del mismo (Figura 2.18). La densidad de la espuma al comienzo del colapso, para el aislado nativo, disminuyó principalmente entre $C_p = 0,5\% - 2\% \text{p/p}$. A mayores concentraciones, los cambios fueron menores, probablemente por la saturación de la interfase (Fig. 2.6.a). En cambio, para el aislado desnaturalizado el efecto fue importante entre $C_p = 2\% - 6\% \text{p/p}$ (Figura 2.18). Para la proteína desnaturalizada se observaron tiempos levemente menores para el comienzo del colapso a $C_p \leq 2\% \text{p/p}$, con respecto a la proteína nativa.

A altas concentraciones (6 - 8%) la estabilidad al colapso de las espumas de proteína desnaturalizada fue mucho mayor y las densidades de la espuma al comenzar el colapso disminuyeron significativamente, observándose la formación de una película rígida en la superficie de las espumas, probablemente como resultado de interacciones entre moléculas de proteínas adsorbidas, dando films más fuertes y cohesivos (Kim y Kinsella, 1987b). Polimerizaciones en la interfase aire - agua por uniones disulfuro, fueron observadas en espumas de β -lactoglobulina por Courthaudon y col. (1991) y también fueron observadas para la proteína de soja en la interfase aceite - agua (Dickinson y Matsumura, 1991).

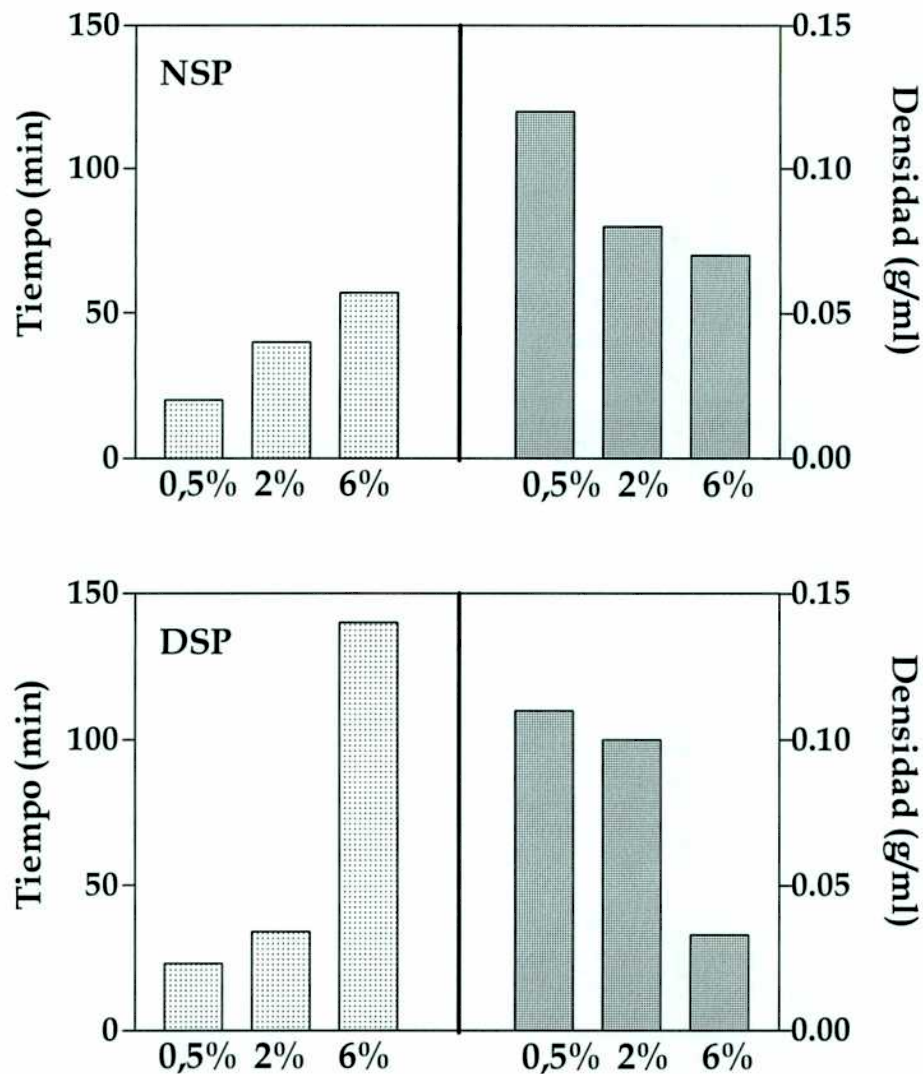


Figura 2.18: Tiempo al cual comenzó el colapso y densidad de las espumas en ese tiempo para espumas de NSP y DSP.

CONCLUSIONES

El método desarrollado para caracterizar la estabilidad de espumas pudo ser aplicado a altas concentraciones proteicas y para espumas de alta estabilidad, en condiciones limitantes para otras metodologías. El método es relativamente simple y provee información fundamental de los procesos principales que afectan a la desestabilización de espumas: drenaje de líquido, desproporción y colapso. Los modelos matemáticos permitieron el cálculo de constantes de velocidad para los distintos procesos y la evaluación de su importancia relativa.

La concentración proteica resultó un parámetro crítico para las propiedades espumantes, pues su aumento redujo la tensión superficial, aumentó la viscosidad de la fase continua y modificó la composición y propiedades del film interfacial. La capacidad espumante aumentó en forma limitada con el aumento de la concentración de proteína de soja. La estabilidad al drenado se incrementó principalmente debido al aumento de la viscosidad con la concentración proteica. La estabilización a la desproporción en cambio, se vinculó a la disminución en la tensión superficial. Una mayor concentración proteica en la interfase produjo también una mayor estabilidad al colapso.

La desnaturalización controlada de las proteínas de soja mejoró la formación de espuma, redujo el drenaje de líquido en todo el rango de concentraciones y a altas concentraciones redujo la desproporción y el colapso. La formación de películas rígidas en la interfase espuma / aire debido a la desnaturalización de la proteína, a altas concentraciones proteicas, produjo una estabilización adicional al colapso.

PARTE 3

***Interacciones proteína de soja -goma no
gelificante (xántica) en la formación y
estabilidad de espumas***

3.1. Características de las soluciones proteína - goma xántica y de la interfase

Las proteínas de soja, en su forma nativa y desnaturalizada, formaron sistemas homogéneos y estables con la goma xántica, en un amplio rango de concentraciones, sin observarse separación de fases. El comportamiento fue similar al observado en otros sistemas a pH 7 (Syrbe y col., 1995) y condiciones en que ambas macromoléculas presentan cargas negativas ($\text{pH} > \text{pI}$), dando lugar a una repulsión electrostática neta y cierta incompatibilidad termodinámica. En una aproximación muy amplia, la concentración total de biopolímeros debe ser aproximadamente 4%p/p antes de que ocurra separación de fases (Tolstoguzov, 1986). Este valor es mayor que las concentraciones totales utilizadas ($\leq 2,5\%$ p/p). A bajas concentraciones, la proteína y el polisacárido coexisten en una fase única conteniendo los polímeros en dominios donde se excluyen mutuamente, si existe incompatibilidad termodinámica (Ledward, 1994).

3.1.1. Composición de proteínas de soja en solución y en la interfase aire - agua

La goma xántica promovió la formación de agregados de alto peso molecular (HMW) en las soluciones de NSP y DSP (Figuras 3.1.a, 3.1.b y 3.2). A bajas concentraciones de NSP (0,5%), también se formaron agregados de bajo peso molecular (LMW) y se redujo la proporción de los polipéptidos A y β , y en menor medida, el polipéptido B y las subunidades α y α' (resultados no mostrados).

En las soluciones de DSP (0,5%) (Figura 3.2), la goma xántica también redujo la proporción de polipéptidos A, y de las subunidades β , α y α' (no mostrados) como en las soluciones de NSP, pero incrementó enormemente la proporción del polipéptido B.

La adición de goma xántica a las soluciones tuvo un efecto similar al observado previamente por el incremento de la concentración de proteína (Figura 2.4.), lo cual puede atribuirse principalmente a efectos de volumen de exclusión (Antipova y Semenova, 1997). A pH neutro, como el usado en este estudio, es esperable una interacción repulsiva proteína - polisacárido pues las proteínas de soja y la goma xántica se encuentran cargadas negativamente. Dichas interacciones producen un aumento del potencial químico y de la actividad termodinámica de la proteína en solución (Pavlovskaya y col. , 1993). Bajo estas condiciones de limitada compatibilidad termodinámica entre los dos biopolímeros (dado que no hay separación de fases) y considerando que la goma, altamente hidrofílica, absorbe gran cantidad de agua (Walter y col., 1990), la solución proteica se comportaría como una de mayor concentración efectiva.

En presencia de goma xántica, los perfiles electroforéticos de NSP o DSP adsorbidos en la interfase aire - agua de las espumas resultaron significativamente diferentes de los correspondientes a las soluciones usadas para formar las espumas. La estructura y las propiedades de los films adsorbidos en sistemas mixtos son complejos, especialmente después de que el film sufre cierto "añejamiento" por el transcurso del tiempo. Condiciones de pH y fuerza iónica que favorecen la asociación de moléculas en el seno de la solución o dan lugar a la formación de un complejo de coacervación, tenderán también a favorecer las interacciones en la interfase (Dickinson y col., 1988).

En la Figura 3.3 se comparan la proporción de cada fracción proteica de NSP en solución y en la interfase aire - agua. La preferencia por la adsorción/formación de agregados HMW en la interfase de espumas NSP a diferentes concentraciones proteína - polisacárido es evidente, siendo la proporción en la interfase mayor que en solución. A las menores concentraciones de xántica (0,025%) y NSP 0,5 y 2%, se observó también un pequeño incremento de agregados LMW, subunidad AB y α' , en la interfase. Asimismo, el polipéptido A y

la subunidad β decrecieron. La mayor concentración de goma xántica (0,05%) promovió la adsorción del polipéptido B en la interfase de las espumas.

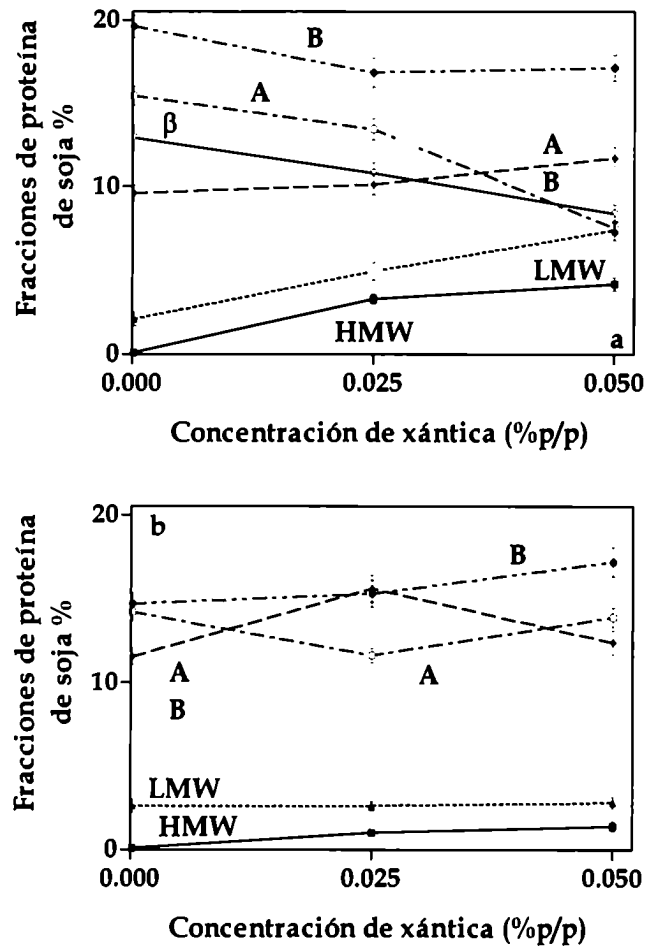


Figura 3.1: Efecto de la concentración de goma xántica en la composición proteica de soluciones de aislado de soja nativo a) 0,5% y b) 2%p/p (las barras de error indican desviaciones estandar).

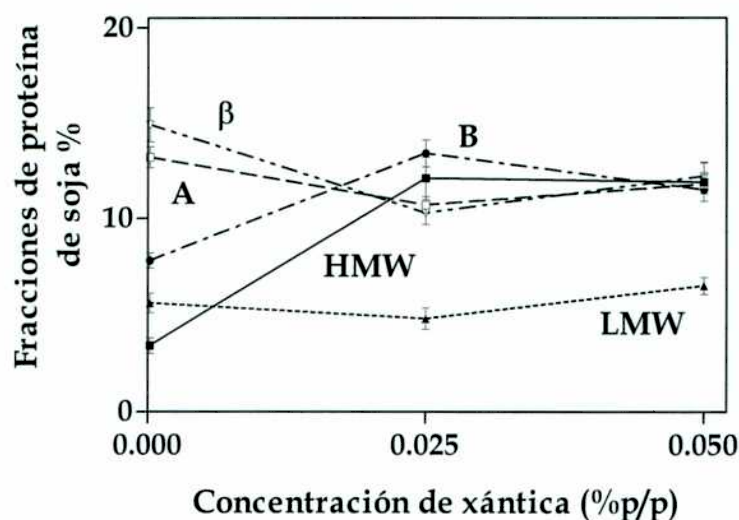


Figura 3.2: Efecto de la concentración de goma xántica en la composición proteica de soluciones de aislado de soja desnaturizado 0,5%p/p (las barras de error indican desviaciones estandar).

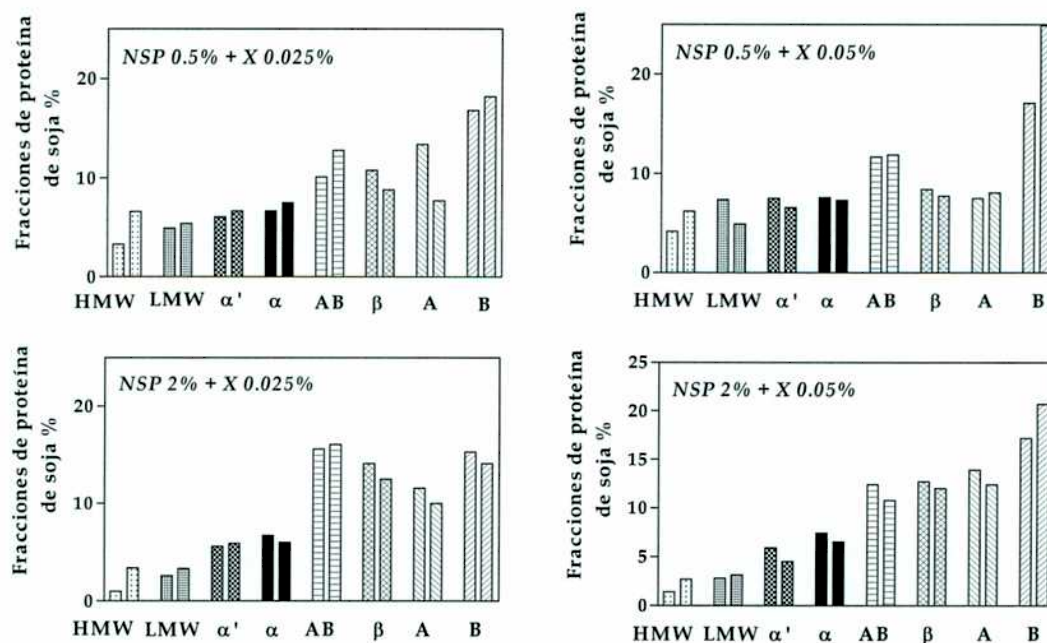


Figura 3.3: Composición proteica de sistemas NSP + G.X. en solución y en la interfase aire - agua. Primera barra: proporción de cada fracción proteica en solución. Segunda barra: proporción de cada fracción proteica en la interfase de las espumas.

Al contrario de lo observado para espumas NSP, la Figura 3.4 muestra que la proporción de los agregados HMW y LMW en las interfases de las espumas DSP, en presencia de xántica, fue menor que el observado en las soluciones empleadas para su preparación, indicando una reducción substancial de la preferencia por los agregados en la superficie de las burbujas. Sin embargo, se observó una prevalencia marcada del polipéptido B en la interfase aire - agua.

La presencia de goma xántica tuvo un efecto importante en la adsorción competitiva de las diferentes fracciones proteicas, efecto dependiente de la desnaturalización de la proteína. Los resultados en las espumas con NSP en ausencia de goma (parte 2.2.1.) mostraron que independientemente del aumento de la cantidad de agregados en la solución debido al aumento de la concentración de proteína, las fracciones proteicas se absorbieron proporcionalmente, sin presentar preferencia por los agregados en la interfase (parte 2). Sin embargo, cuando la agregación proteica en solución fue promovida por la presencia de xántica, posiblemente por efectos de volúmenes de exclusión, la composición de proteínas en la interfase aire - agua cambió, enriqueciéndose en los agregados LMW y HMW. Podría inferirse entonces que el incremento de la proporción de agregados en la superficie de las burbujas de espumas NSP en presencia de xántica, no se debe a una adsorción preferencial, sino a su formación en la interfase. Esto necesariamente sugiere la participación de la xántica en la interfase, donde promovería la agregación de las subunidades proteicas ya absorbidas.

Si bien los estudios electroforéticos con SDS no permiten la determinación de complejos estabilizados por uniones electrostáticas o hidrofóbicas, son una herramienta útil para detectar la formación de agregados o complejos proteicos no disociables en estas condiciones, como los observados en presencia de goma xántica.

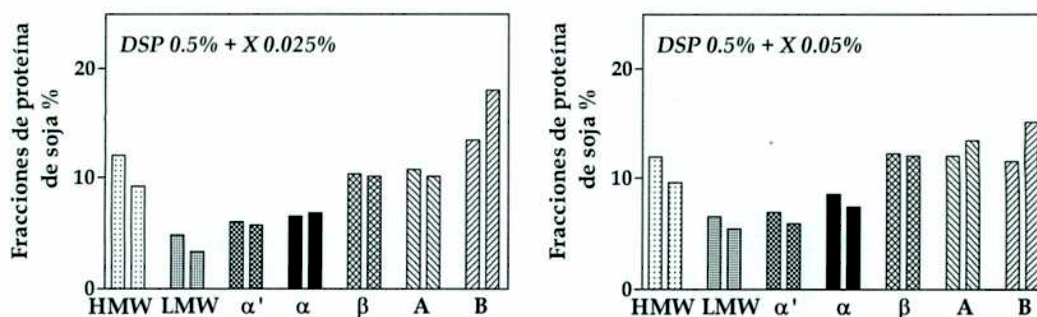


Figura 3.4: Composición proteica de sistemas DSP + G.X. en solución y en la interfase aire - agua.

3.1.2. Tensión y presión superficial

Las soluciones de goma xántica presentaron tensiones superficiales mayores a las del agua (Tabla 3.1.), en coincidencia con resultados de trabajos preexistentes (Cottrel y col., 1980). De acuerdo a muchos autores (Luyten y col., 1993; Bergenstahl y col., 1995), la adsorción de la goma xántica en la interfase es poco probable. Más aún, la GX causó un leve incremento de la tensión superficial de las soluciones de NSP, lo cual fue consistente con reportes anteriores (Yilmazer y col., 1991; Luyten y col., 1993). En algunos casos, los polisacáridos no reducen la tensión interfacial, pero, forman una interfase viscosa y ordenada que previene la coalescencia de las gotas de aceite (Hancock, 1984).

Si la presencia de la GX sólo produjera un incremento de la adsorción de la proteína en la interfase por aumento de la concentración efectiva en la solución debido a una limitada incompatibilidad termodinámica proteína - polisacárido, la tensión superficial debería disminuir o permanecer constante (si el incremento en la concentración no es significativo). Esto fue postulado por Burova y col. (1992), en otros sistemas conteniendo glubulina 11S y se observó a altas concentraciones de goma (0,1% p/p), principalmente con NSP. El aumento en la tensión superficial de las soluciones proteicas a bajas concentraciones de goma, indicaría que la

misma participa interactuando con la proteína. Un efecto similar fue encontrado por Semenova y col., (1999) entre maltodextrinas y globulina 11S, el cual fue atribuido a interacciones atractivas, aún cuando ambas macromoléculas presentaban igual carga neta en las condiciones experimentales.

Tabla 3.1: Tensión superficial de equilibrio de soluciones de mezclas de goma xántica - NSP (o DSP) a 25°C, ($\gamma_{H_2O} = 71,97 \text{ mN/m}$). Mediciones realizadas con el estalagmómetro de Traube.

Goma Xántica %	$\gamma \text{ (mN/m)}$				
	sin proteína	NSP		DSP	
		0,5%	2%	0,5%	2%
0	71,97	63,2	55,6	62,1	55,3
0,025	74,0	64,3	56,5	64,2	56,2
0,05	75,6	65,4	56,7	64,6	56,4
0,10	77,2	63,2	55,9	64,5	56,3

* las tensiones superficiales a concentraciones de goma xántica mayores a 0,1% no pudieron ser medidas debido a la alta viscosidad de las soluciones.

La mayor presencia de agregados en la interfase, podría generar un film más concentrado, con menor posibilidad de desnaturalización superficial, provocando el aumento de la tensión interfacial.

La cinética de adsorción en la interfase fue estudiada por medio de la variación de la presión superficial con el tiempo (Figura 3.5) obteniéndose los valores de las constantes (k_1 y k_2) vinculadas con las velocidades de penetración y reacomodamiento en la interfase respectivamente, por aplicación del modelo de Graham y Phillips (1979a) (ecuación 2.1., parte 2.2.2.).

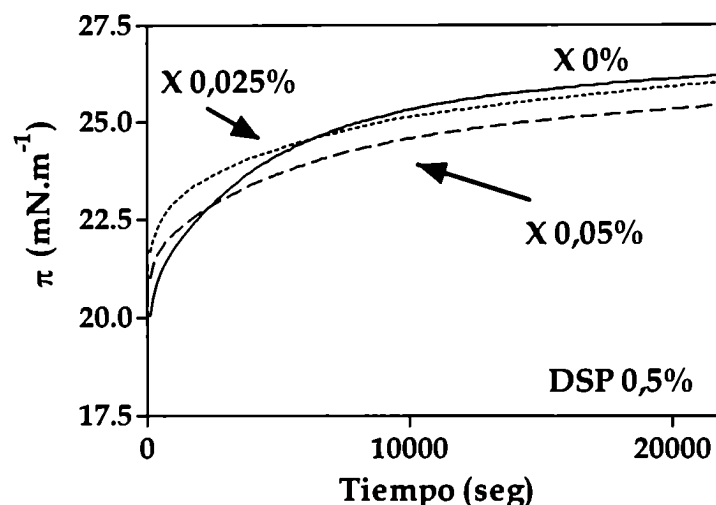


Figura 3.5: Variación de la presión superficial (π) con el tiempo para soluciones de aislado de soja desnaturalizado (DSP) 0,5% y goma xántica 0,025 y 0,05% (método de la placa de Whilhelmy).

En la Tabla 3.2. se muestran los valores obtenidos para mezclas con 0,5% o 2% de aislado proteico con 0 - 0,05% GX. El agregado de goma disminuyó la velocidad de los procesos de adsorción, siendo más importante el efecto sobre la penetración en la interfase (excepto para DSP 2%). El efecto sobre el reacomodamiento en la interfase fue sólo importante en DSP 0,5%.

En sistemas poliméricos densos o muy viscosos, el transporte de masa es muy lento, llevando mucho tiempo llegar al equilibrio film - solución, lo cual tiene implicancias importantes en los efectos durante el transcurso del tiempo en espumas y emulsiones (Dickinson y col., 1988). En las condiciones experimentales, luego de 6 horas de medición no todos los sistemas habían alcanzado el equilibrio (según el criterio de Rodríguez Niño y col., 1998: variaciones menores a $0,1\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ en 30 minutos).

Tabla 3.2: Constantes vinculadas con la adsorción en la interfase, k_1 (penetración en la interfase) y k_2 (reacomodamientos conformacionales), para mezclas de aislado de soja nativo y desnaturalizado (0,5 y 2%) y goma xántica (0,025 y 0,05%).

Proteína	Conc. %p/p	G. xántica %p/p	k_1 (seg) ⁻¹ *10 ⁴	k_2 (seg) ⁻¹ *10 ³
NSP	0,5	0	1,57±0,03	1,85±0,09
NSP	0,5	0,025	1,06±0,03	0,99±0,03
NSP	0,5	0,05	1,01±0,02	1,24±0,04
NSP	2	0	1,46±0,02	1,67±0,06
NSP	2	0,025	0,97±0,01	1,73±0,03
DSP	0,5	0	1,69±0,02	1,41±0,09
DSP	0,5	0,025	1,03±0,02	1,31±0,05
DSP	0,5	0,05	1,31±0,01	1,59±0,09
DSP	2	0	1,05±0,02	1,22±0,03
DSP	2	0,025	1,03±0,02	1,31±0,05

R²: 0,9977 - 0,9996.

Se observaron mayores presiones superficiales iniciales por el agregado de GX (incrementos de hasta el 7,8%). Además, la presencia del polisacárido en las cercanías de la interfase, interactuando con la proteína, podría generar una carga superficial adicional. Ambos efectos pueden determinar menores velocidades de penetración y reacomodamiento y limitar los cambios conformacionales (Britten y Giroux, 1993; Schwenke y col., 1993). Similarmente, Schwenke (1996) encontró una disminución de k_1 y k_2 en sistemas altamente succinilados. Este comportamiento fue explicado por un impedimento en la penetración de moléculas altamente cargadas y desplegadas, debido a efectos de repulsión electrostática y estéricos. Interacciones atractivas entre ambas macromoléculas también disminuirían la velocidad de adsorción (Semenova y col., 1999). Una interacción atractiva entre

residuos básicos de la proteína con la goma xántica formaría complejos electrostáticos aumentando la carga molecular en la interfase e inhibiendo el reordenamiento por efectos repulsivos.

3.1.3. Viscosidad de las soluciones

La viscosidad de las soluciones aumentó significativamente con el incremento de la concentración de goma xántica, siendo la alta capacidad de absorción de agua de la goma un factor determinante (Sánchez y col., 1995). En la Figura 3.6.a se muestran las curvas de flujo de soluciones de NSP (2%) y GX en diferentes concentraciones. Las características reológicas de las mezclas fueron similares a las de goma sola, en coincidencia con lo observado con proteínas de suero (Sanchez y col., 1997; Bryant y McClements, 2000). Para el análisis de los datos se aplicó el modelo de la ley de la potencia, según lo sugerido por diversos autores, que demostraron la ausencia de un umbral de fluencia en estas concentraciones (Tanaka y col., 1976; Speers y Tung, 1986; Parker y col., 1995 y Pettitt y col., 1995). El comportamiento pseudoplástico se debe a la movilidad reducida del sistema macromolecular. El aumento de la velocidad de deformación ejerce modificaciones importantes sobre la goma xántica, disminuyendo la viscosidad. Las moléculas de GX presentan forma de varillas de estructura rígida de doble hélice que se reorientan por un esfuerzo de corte, y forman agregados que se destruyen por las fuerzas de deformación (las asociaciones intramoleculares serían principalmente por los grupos acetato unidos a las manosas y las intermoleculares por los grupos metilpiruvato) (Tako y Nakamura, 1984; Pastor y col., 1994).

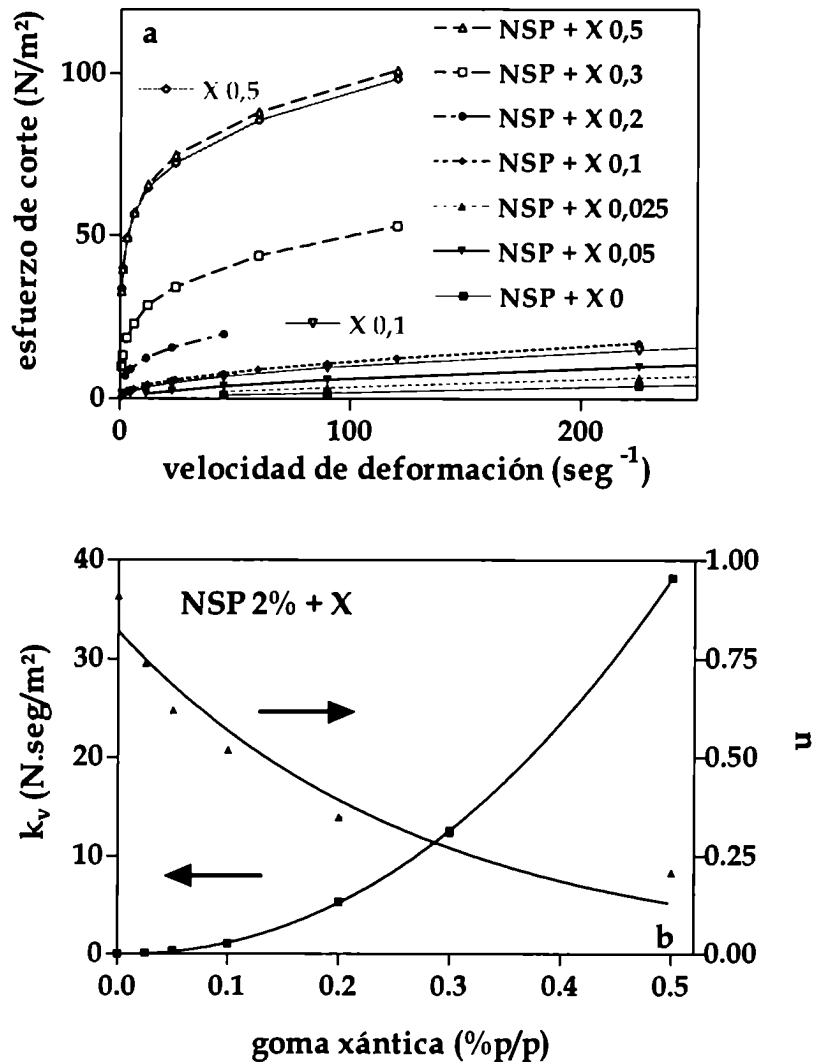


Figura 3.6: a) Comportamiento reológico de soluciones de aislado nativo de soja 2% con diferentes concentraciones de goma xántica; b) Efecto del agregado de goma sobre los coeficientes de consistencia ($k_v = a \cdot [x]^b$, $b = 2,16 \pm 0,03$; $a = 171 \pm 4$) y los índices de flujo ($n = a \cdot e^{-[x]^b}$, $b = 3,7 \pm 0,6$; $a = 0,82 \pm 0,05$), en soluciones de NSP 2%.

El carácter pseudoplástico de las soluciones aumentó con el incremento de goma, presentándose una relación doble logarítmica entre la concentración de la misma y el coeficiente de consistencia, mientras que la variación de los índices de flujo resultó exponencial (Figura 3.6.b), en coincidencia con resultados obtenidos por otros autores para goma sola (Speers y Tung, 1986; Pastor y col., 1994).

La viscosidad aparente presentó una variación exponencial con el agregado de goma (Figura 3.7) no observándose diferencias significativas entre las constantes del modelo exponencial que las describe, correspondientes a la proteína nativa o desnaturalizada, a 0,5 y 2%. A altas concentraciones de aislado proteico (2%) y principalmente para la proteína desnaturalizada, se encontraron viscosidades significativamente mayores que para la goma sola. El efecto sinérgico observado, puede deberse a un efecto de exclusión macromolecular, disminuyendo el volumen libre disponible en la fase acuosa para ambos biopolímeros, aumentando la viscosidad interna del sistema (Stainsby, 1980; Sánchez y col., 1995; Sanchez y col., 1997). No se observaron diferencias en el comportamiento viscoso de los sistemas con concentraciones de goma superiores a 0,1%, asemejándose al de las soluciones de goma sola.

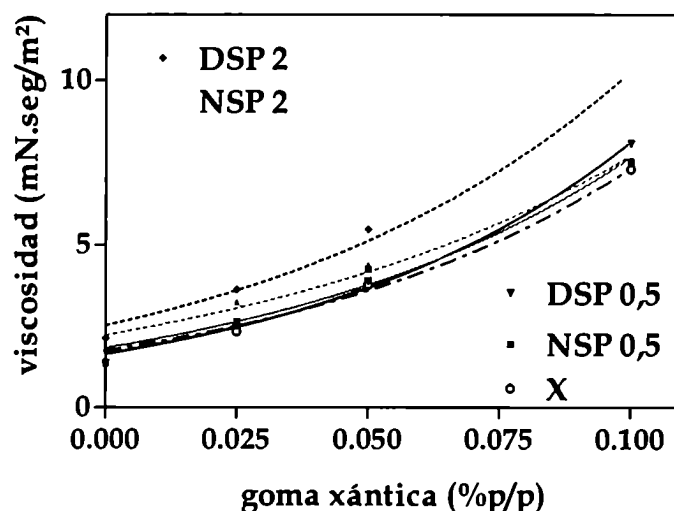


Figura 3.7: Viscosidad de las soluciones a 225 seg-1 y 20°C, ($\eta = a \cdot e^{[X]^K}$, $K = 14 \pm 2$; $a = 1,7 - 2,5 \pm 0,1$).

Bryant y McClements (2000) estimaron que los incrementos de viscosidad de soluciones de goma xántica por agregado de proteína podían darse por dos factores: i) por un incremento de la concentración efectiva del polisacárido en la fase acuosa, y ii) por la presencia misma de las moléculas proteicas. En las

condiciones experimentales, ambos biopolímeros presentan carga negativa, existiendo una apreciable repulsión electrostática, sugiriendo un mecanismo de incompatibilidad termodinámica. Estudios por microscopía óptica (Syrbe y col., 1995) mostraron en sistemas de GX y proteínas del suero, regiones ricas en polisacárido rodeadas de fase acuosa enriquecida en proteína. La formación de una emulsión agua / agua a altas concentraciones de goma (estando la separación de fases impedida por la formación de una estructura tipo gel débil, según Sanchez y col., 1997) donde la fase continua comienza a ser la enriquecida en polisacárido, dominando la fluidodinámica del sistema, podría explicar el efecto de enmascaramiento producido anulando diferencias entre sistemas con distinta concentración proteica y con NSP o DSP. Este modelo se asemeja al propuesto para mezclas de proteínas de suero (14%p/p) y GX (0,3 - 0,5%p/p), donde la alta viscosidad de la fase continua regida por el polisacárido impide la gelificación de la proteína, la cual se agrega por tratamiento térmico (Sanchez y col., 1997).

3.1.4. Viscosidad superficial

Las soluciones de goma xántica presentaron una disminución de la viscosidad superficial en el tiempo (excepto para GX 0,5%), lo cual puede atribuirse a una leve desorción de la goma, a un efecto en la medición por el carácter pseudoplástico de las soluciones o a una combinación de ambas causas (Figura 3.8 a y b). Al estudiarse la viscosidad del film superficial de las soluciones mezcla (Figura 3.9.), se observó inicialmente un descenso de la viscosidad superficial, y luego un aumento hasta llegar a la viscosidad de equilibrio. Los comportamientos observados se relacionaron a los procesos de desorción y adsorción asociados al comportamiento interfacial de cada componente por separado (Figura 2.9. y 3.8.a y b). Los posibles comportamientos de adsorción o desorción estarían de acuerdo con las tensiones superficiales (la proteína la baja y la goma la sube ligeramente) (Tabla 3.1).

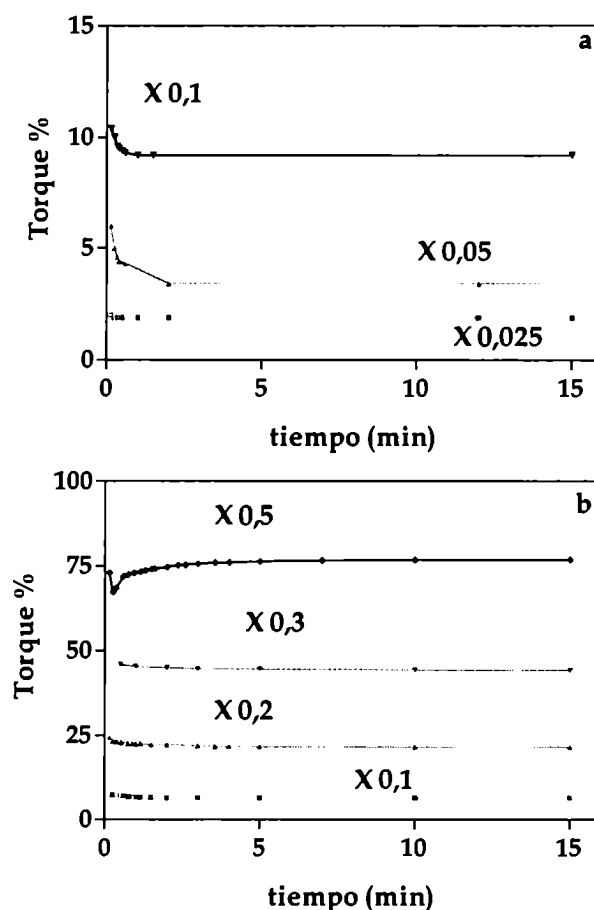


Figura 3.8: Variación del torque(vinculado a la viscosidad superficial) en función del tiempo para concentraciones de goma xántica a) 0,025, 0,05 y 0,1% (12 rpm) b) 0,1; 0,2; 0,3 y 0,5% (6 rpm).

Con el fin de analizar el efecto del agregado de goma sobre la evolución de la viscosidad superficial, se graficó la diferencia entre el torque, $T_s(t)$, y el torque mínimo obtenido, T_{smin} . Se observaron mayores incrementos de torque en presencia de GX que para la proteína sola (Figura 3.10), lo cual podría deberse a la agregación de la proteína en la interfase, a una alta densidad de empaquetamiento y/o a entrecruzamientos moleculares (Dickinson, 1989). La velocidad de los procesos, a una dada velocidad de deformación, dependió principalmente de la concentración de goma. Las velocidades de aumento de la viscosidad superficial disminuyeron con el aumento de goma (Figura 3.10.b), en concordancia con las

menores velocidades de adsorción (penetración y reacomodamiento) en presencia de xántica (Tabla 3.2).

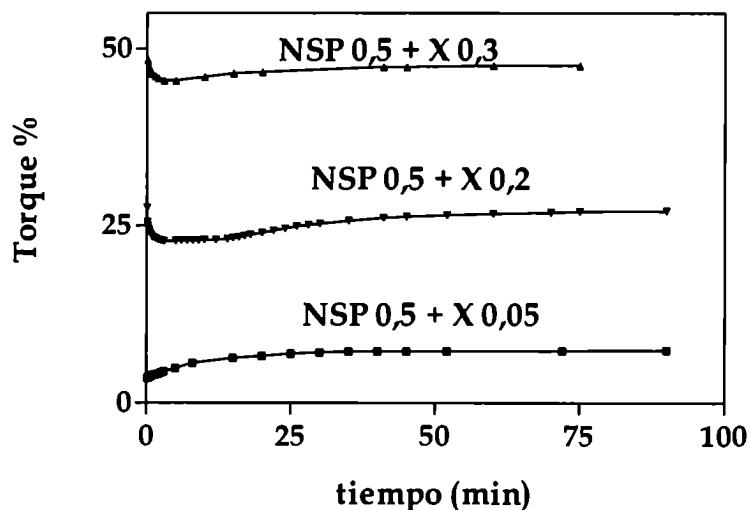


Figura 3.9: Variación del torque (vinculado a la viscosidad superficial) en función del tiempo para soluciones de aislado proteico de soja nativo (NSP) 0,5% y goma xántica 0,05%; 0,2% y 0,3% (6 rpm).

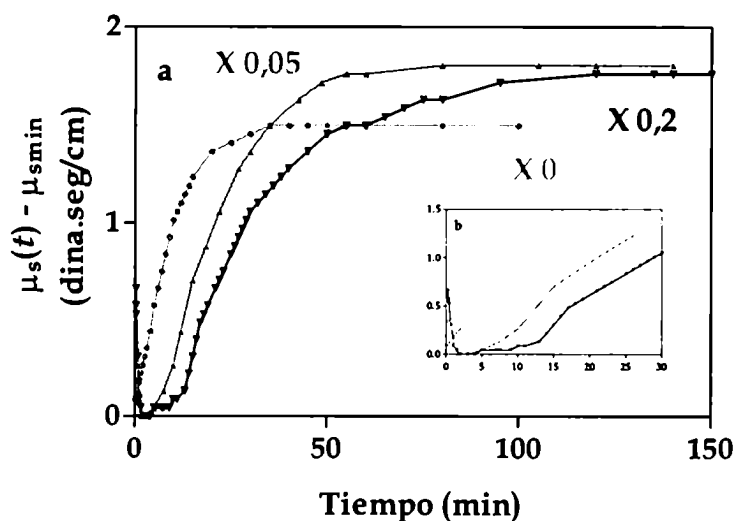


Figura 3.10: a) Diferencia entre el torque a tiempo t $T_s(t)$ (vinculado con la viscosidad superficial) y el torque mínimo obtenido ($T_{s,min}$) para NSP 2% + GX a 6 rpm; b) Ampliación de los primeros 30 minutos.

Las interfases de las soluciones de goma sola y de las mezclas de goma y proteína presentaron un comportamiento newtoniano para bajas concentraciones y pseudoplástico para altas concentraciones de goma (Figura 3.11).

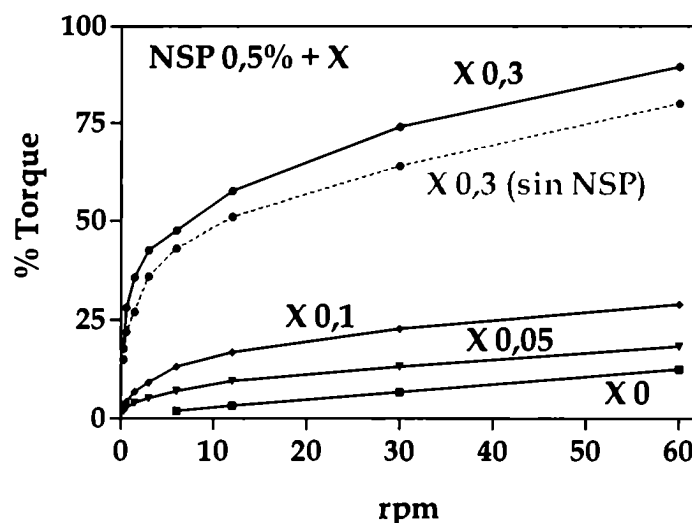


Figura 3.11: Torque en el equilibrio en función de la velocidad, para soluciones proteicas de soja 0,5%p/p con distintas concentraciones de goma xántica.

La presentación de un comportamiento dependiente de la concentración de goma implica que ésta tiene un rol determinante en la formación del film y sus características.

Mientras que la viscosidad de las soluciones de NSP/GX no presentó ni sinergismo ni antagonismo (3.1.3), se observó una interacción sinérgica en los torques (vinculados con la viscosidad superficial) de equilibrio (T_s), en los sistemas con NSP 0,5% (Figura 3.12). En la Figura 3.12.a puede apreciarse que el torque (NSP = 0,5%) se incrementó entre el 61 - 36% en presencia de GX: 0,025 - 0,1%, con respecto a la suma de los torques de los componentes individuales. Sin embargo, como se observa en la Figura 3.12.b, cuando la concentración de proteína fue del 2%, el torque de NSP/GX, resultó aproximadamente igual a la suma de los torque de ambos componentes por separado. Las soluciones de proteína desnaturalizada 0,5% presentaron un efecto sinérgico menor ($\approx 35\%$), mientras que las de DSP 2% no presentaron sinergismo (Figuras 3.12 c y d). Interacciones sinérgicas en mediciones de viscosidad superficial a pH neutro fueron observadas por Ahmed y

Dickinson (1991) entre caseína y propilenglicol alginato (PGA). El polisacárido presentaría un comportamiento similar al de electrolitos, reduciendo las repulsiones entre grupos proteicos en la interfase aire - agua y promoviendo la formación de films más condensados y de mayor viscosidad superficial (Blute y col., 1994).

El sinergismo observado en la viscosidad superficial de los films 0,5% NSP - 0,025% GX está en concordancia con los resultados electroforéticos, que muestran una mayor proporción de agregados en la interfase de espumas NSP para esta relación proteína - polisacárido (Fig. 3.3).

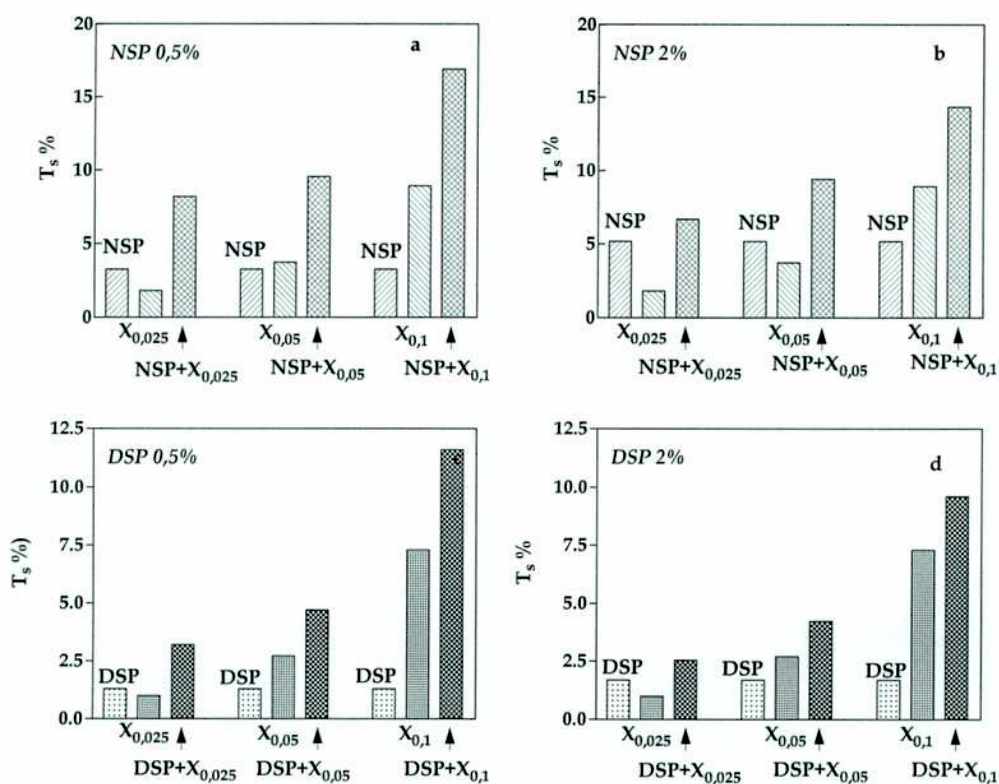


Figura 3.12: Torque en el equilibrio (vinculado a la viscosidad superficial) " T_s " (a 12 rpm) de films de proteína de soja y goma xántica (X) a distintas concentraciones, en comparación con los torques de los componentes individuales a) NSP: 0,5% b) NSP: 2% c) DSP: 0,5% y d) DSP: 2%.

Nota: los gráficos 3.12 a y b son a 20°C y los 3.12 c y d son a 25°C. La viscosidad superficial disminuye con el aumento de la temperatura, lo cual puede apreciarse en la variación de los valores correspondientes a goma xántica sola.

¿Por qué el comportamiento reológico superficial está principalmente determinado por la presencia del polisacárido, mientras que el de la tensión superficial está determinado por la proteína?

Las mediciones de tensión superficial son dependientes de los cambios de energía libre en la vecindad inmediata de la superficie (principalmente segmentos en forma de trenes de polímeros flexibles lineales), mientras que la reología superficial también muestra efectos de regiones conectadas más alejadas de la superficie misma (bucles y colas de polímeros flexibles, fuerzas de interacción secundarias, posible composición de distintas especies poliméricas). La viscosidad superficial puede dar muestra de las interacciones atractivas proteína - proteína en el film, así como también de interacciones proteína - polisacárido (Courthaudon y col., 1991). El fortalecimiento lento de las interacciones proteína - proteína entre segmentos no pertenecientes a la primer capa de adsorción o el espesamiento del film debido a una lenta precipitación afectan a las propiedades viscoelásticas superficiales, pero no a la presión superficial (Dickinson y col., 1988).

Una posible interpretación para estas observaciones sería la formación de una estructura combinada en la interfase, donde la proteína formaría una primera capa predominantemente en contacto con la fase gaseosa determinando la tensión superficial, la cual estaría recubierta por una capa de polisacárido absorbido por interacciones electrostáticas, dominando la reología superficial. Este modelo fue propuesto por Galazka y Dickinson (1995) para describir el comportamiento de films proteicos mixtos de β -caseína + gelatina. Bajo las condiciones de adsorción de la proteína en la interfase, las características de la interacción proteína - polisacárido puede ser muy diferente a la encontrada en el seno de la solución, debido a las alteraciones conformacionales de la proteína en la interfase.

3.2. Capacidad de espumado

3.2.1. Método de batido

En la Figura 3.13 se observa el efecto de distintas concentraciones de goma xántica sobre la capacidad de espumado de soluciones de NSP y DSP a 0,5 y 2% a 20°C. Dado que la GX no posee propiedades tensioactivas no tiene capacidad para formar espumas por sí misma. El agregado de goma xántica a soluciones de proteína 0,5% produjo un incremento sustancial en la capacidad de espumado, lo cual no está vinculado con efectos de disminución de la tensión superficial ni con mayores velocidades de adsorción en la interfase como se mostró previamente. Puede relacionarse entonces con un aumento tanto de la viscosidad superficial como de la viscosidad de la fase continua, que impedirían la desestabilización durante el proceso de formación de la espuma.

A bajas concentraciones de goma xántica (o en ausencia de la misma), parte del líquido no se incorpora a la espuma, (ej. porcentaje de líquido no incorporado a la espuma: NSP 0,5% = 50%; NSP 0,5% + X 0,025% = 20%), incorporándose toda la solución a GX > 0,05%. A altas concentraciones de goma, la alta viscosidad del sistema limita la incorporación de aire, como se observó al aumentar la concentración proteica (Figura 2.10). Una vez que toda la solución fue incorporada a la espuma, la disponibilidad de líquido comienza a ser un factor limitante por lo cual no aumenta el volumen de espumado y se observa una disminución del %FE (para DSP 2%) o valores de %FE constantes (para DSP 0,5%). Esta disminución se observó para NSP 2% a concentraciones de GX > 0,05%. El aumento de la viscosidad de las soluciones limita la incorporación de aire, similarmente a lo observado al aumentar la concentración (parte 2.3). En la formación de espumas por batido, la hidrodinámica del sistema es muy importante en la determinación de la velocidad de formación de burbujas de aire y altas viscosidades pueden prevenir la incorporación de aire en el líquido (Halling, 1981). Las limitaciones en

la formación de espuma anulan las diferencias debidas a la estructura y a la concentración proteica. La mayor incorporación de líquido en la espuma y la disminución del volumen de espumado tienen un efecto contrapuesto en la densidad de las espumas, permaneciendo aproximadamente constante para NSP y DSP 0,5% ($0,55 \pm 0,07$ g/mL y $0,49 \pm 0,05$ g/mL respectivamente) y produciendo espumas más densas a mayor concentración proteica (δ_{esp} se incrementó de $0,34 \pm 0,01$ a $0,48 \pm 0,01$ g/mL para DSP 2% y de $0,38 \pm 0,01$ a $0,45 \pm 0,01$ g/mL para NSP 2%).

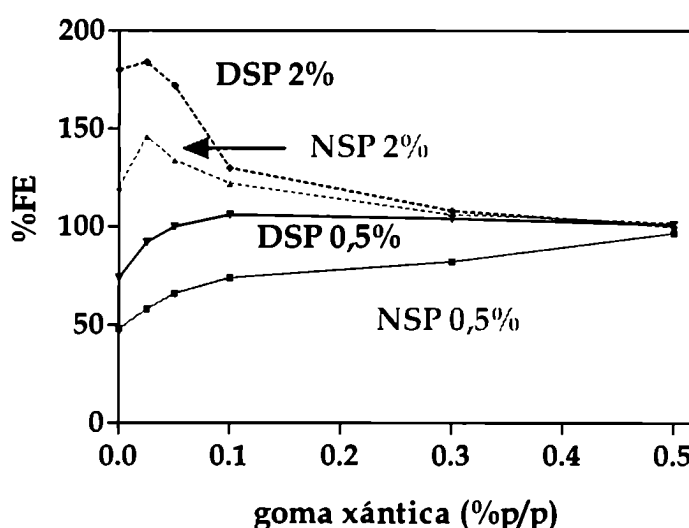


Figura 3.13: Efecto de la goma xántica sobre la capacidad de espumado de aislado de soja nativo (NSP) y desnaturalizado (DSP) 0,5 y 2%p/p.

3.2.2. Método de burbujeo

En la Tabla 3.3 se presentan los parámetros que describen la formación de las mismas espumas por el método de burbujeo.

La cantidad de gas necesario para obtener 35 ml de espuma (vol. aire), el volumen de líquido máximo incorporado ($L_{\text{máx}}$) y la capacidad de espumado (FC), aumentaron con el agregado de GX, principalmente hasta un 0,05%. Los parámetros de burbujeo mostraron menor sensibilidad frente a las diferencias estructurales entre NSP y DSP. Los valores de $L_{\text{máx}}$ y FC revelaron una mejora en la formación de la espuma por desnaturalización de la proteína, pero mostraron

variaciones menores en comparación con el método de batido (FE). La concentración proteica influyó más que las modificaciones en la estructura, en el volumen de aire inyectado.

Tabla 3.3: Parámetros que describen la formación de espumas por el método de burbujeo.

Proteína %p/p	Goma Xántica %	L _{máx} mL	Vol.aire mL	FC *100	DM	v _i (mL.s ⁻¹) .10 ²
NSP 0,5%	0	2,48±0,02	40,7±0,9	62,6±0,2	0,097	2,32±0,03
	0,025	3,62±0,1	41,7±0,1	63,8±0,2	0,136	2,73±0,02
	0,05	5,88±0,04	42,2±0,2	68,4±0,3	0,204	3,91±0,01
	0,1	6,85±0,2	44,0±0,1	67,8±0,5	0,229	5,85±0,04
NSP 2%	0	5,18±0,03	39,7±0,8	71,0±0,2	0,184	3,92±0,01
	0,025	6,77±0,02	41,0±0,5	72,6±0,2	0,227	4,21±0,02
	0,05	7,09±0,05	40,7±0,5	73,9±0,3	0,236	5,38±0,04
	0,1	6,5±0,1	41,6±0,1	70,9±0,5	0,220	6,21±0,04
DSP 0,5%	0	3,73±0,1	42,5±0,9	62,9±0,4	0,140	2,85±0,01
	0,025	4,56±0,1	43,2±0,3	63,8±0,2	0,165	3,21±0,01
	0,05	7,05±0,05	43,5±0,3	69,1±0,2	0,235	4,22±0,02
	0,1	6,95±0,03	43,5±0,3	68,9±0,5	0,232	6,45±0,05
DSP 2%	0	5,59±0,08	36,5±0,5	78,3±0,2	0,196	4,26±0,01
	0,025	7,39±0,1	36,8±0,2	82,6±0,2	0,243	5,74±0,03
	0,05	7,73±0,1	37,2±0,2	82,6±0,3	0,252	7,39±0,06
	0,1	7,2±0,5	39,1±1	77,2±0,8	0,238	6,68±0,1

Las densidades de las espumas (DM) resultaron mucho menores que las obtenidas por el método de batido, lo cual influyó posteriormente en la estabilidad de las mismas. La formación de espumas menos densas por burbujeo está

relacionada con un drenaje más rápido durante la formación (Germick y col., 1994). Los valores de DM y FC presentaron un comportamiento similar, aún cuando de acuerdo a Razafindralambo y col. (1997) estos parámetros pueden no evolucionar de forma coincidente.

La velocidad de formación de espuma " v_i ", es un parámetro que involucra tanto la capacidad de espumado como la estabilidad de la espuma en formación brindando información del comportamiento superficial de la proteína en la etapa inicial de formación de la espuma, en la cual los procesos de desestabilización son incipientes (Wagner y col., 1996). Las velocidades se obtuvieron de la pendiente inicial de la curva de volumen de líquido vs tiempo, tomando los primeros 50 seg de la curva y sin considerar el tiempo que tarda en empezar a formarse la espuma (8 a 20 seg, siendo mayor para GX 0,1%). Este parámetro fue el que mejor reflejó el efecto del agregado de GX, siendo sensible a la estructura y a la concentración proteica. La velocidad (v_i) aumentó con el agregado de goma, siendo mayor a mayor concentración de proteína y mayor para DSP que para NSP. La habilidad de la velocidad de formación de la espuma para revelar diferencias en la estructura proteica fue previamente demostrada por comparación de aislados proteicos de soja nativos y desnaturalizados por tratamiento ácido (Wagner y col., 1996). Mientras que no se observaron diferencias en FC entre los aislados, v_i aumentó con la concentración y el grado de desnaturalización, presentando una buena correlación con la hidrofobicidad superficial (Wagner y col., 1996).

Contrariamente a lo observado en otros sistemas (Graham y Phillips, 1979a; Kato y col., 1983a; Wagner y Guéguen, 1999a), no se encontró una buena correlación entre la velocidad de formación de la espuma o la capacidad de espumado y la velocidad de adsorción en la interfase, aún en ausencia de GX. En sistemas muy viscosos, la velocidad de drenado es mucho menor que la velocidad de incorporación de líquido, siendo éste un factor preponderante en la velocidad de formación de las espumas (Germick y col., 1994).

El tiempo para que la espuma llegue al sensor ubicado a los 35 ml no coincidió siempre con el tiempo de máxima incorporación de líquido, lo cual podría deberse a que el aire ocluido en el seno de la solución ejerció suficiente presión como para generar más espuma, aún después de cesar el flujo de gas. La diferencia entre el tiempo de burbujeo (llegada hasta el sensor) y de máxima incorporación de líquido en la espuma se incrementó con el aumento de viscosidad del sistema, llegando a ser de hasta 140 seg. Así mismo, al aumentar la concentración de goma, se observó un pequeño tiempo lag (ej: GX 0%: 8 seg, GX 0,1%: 18-20 seg), previo al comienzo de formación de espuma, que también se debería a la oclusión de aire en las soluciones altamente viscosas.

Para evaluar los parámetros de estabilidad de las espumas se tomaron los tiempos a partir del tiempo de máxima incorporación de líquido, momento en el cual se consideró que comenzaba el drenaje de líquido.

3.2.3. *Correlación entre ambos métodos*

Las propiedades espumantes de los sistemas proteicos están marcadamente influidas por las condiciones de preparación de las espumas. En la formación de espumas por batido, el sistema es más homogéneo y cada burbuja está sujeta a fuerzas mecánicas severas, lo cual promueve una coalescencia más rápida, estableciéndose un equilibrio dinámico entre la formación y la destrucción mecánica de las burbujas. Las mayores densidades de las espumas hacen que las burbujas se distorsionen a forma polihédrica, con lamelas muy finas (Prins, 1988). Durante el burbujeo, la ruptura de la burbuja es función del espesor de la lamela y de las propiedades viscoelásticas del film (Waniska y Kinsella, 1979).

Las capacidades de espumado evaluadas por el método de batido y por el método de burbujeo estuvieron altamente correlacionadas (Figura 3.14). El valor de R^2 obtenido fue similar al hallado por otros autores al correlacionar métodos de batido y de burbujeo (Wright y Hemmant, 1987; Husband y col., 1994). No se

encontró una buena correlación de proporcionalidad inversa entre las densidades de las espumas obtenidas por burbujeo y la capacidad de espumado obtenida por batido, como postulan German y col. (1985), debido a la limitación en la incorporación de aire por la alta viscosidad del sistema.

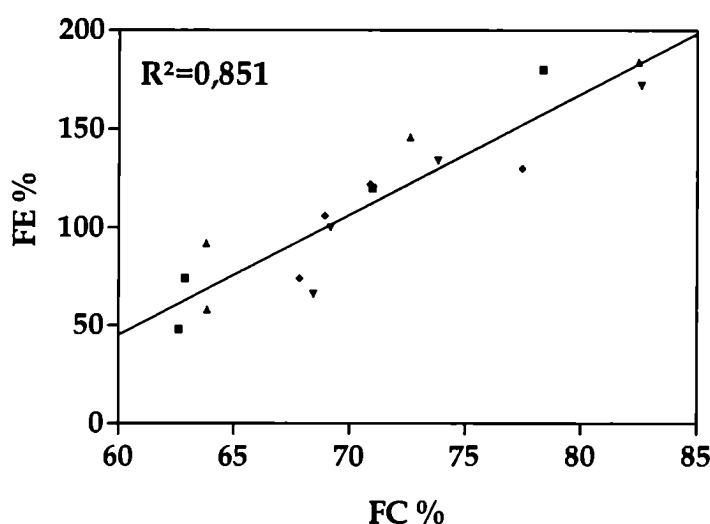


Figura 3.14: Correlación entre la capacidad de espumado de mezclas de proteína de soja y goma xántica, evaluadas por el método de batido (%FE) y por el método de burbujeo (%FC) ; GX 0%: □; 0,025%: ▲; 0,05%: ▼ y 0,1%: ◆.

3.3. Estabilidad de las espumas

3.3.1. Estabilidad al drenaje gravitacional de líquido

El estudio de la cinética de drenado según la separación gravitacional de líquido se realizó según lo explicado en la parte 1.3. a 20°C.

El agregado de goma xántica produjo un gran aumento en la estabilidad al drenado de las espumas (Figura 3.15), presentando las constantes de velocidad de drenado una disminución exponencial con la concentración de goma (Figura 3.16). Diversos trabajos han mostrado el efecto estabilizador de la goma xántica en sistemas termodinámicamente inestables como emulsiones debido principalmente

a su capacidad espesante (Hennock y col., 1984; Kiosseoglou y col., 1988; Yilmazer y col., 1991; Dickinson y col., 1994).

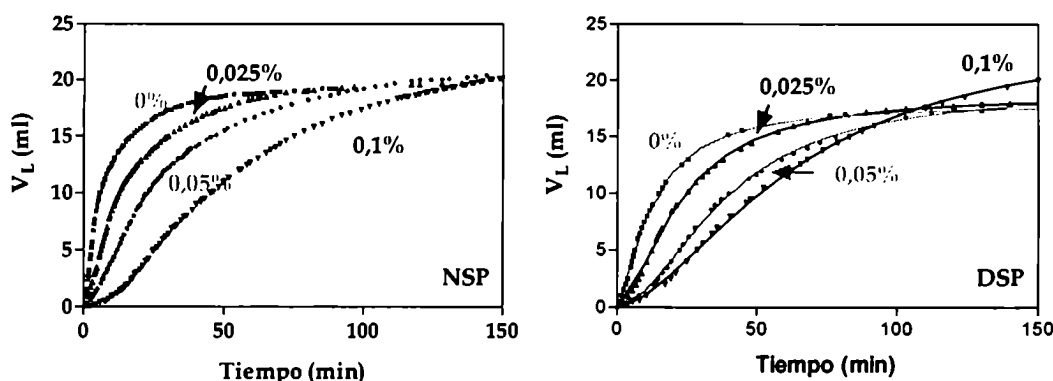


Figura 3.15: Efecto de la goma xántica en el drenado de líquido, para espumas de aislado de soja 2%p/p a) nativo (NSP), b) desnaturalizado (DSP); X: 0%:■ 0,025%:▲ , 0,05%:● , 0,1%:▼.

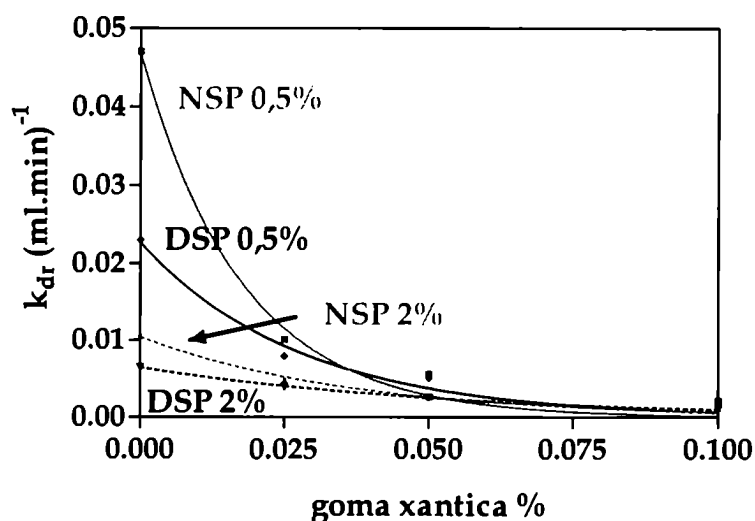


Figura 3.16: Variación de las constantes de drenado con la concentración de goma xántica, ■ (NSP 0,5%); ▲ (NSP 2%); • (DSP 0,5%); ▼ (DSP 2%). $k_{dr} = a \cdot e^{-b[GX]}$; $R^2 = 0,912 - 0,9994$, $P < 0,05$.

La viscosidad de la solución fue un factor determinante de la estabilidad, encontrándose una alta correlación entre las constantes de drenado y los coeficientes de consistencia de las soluciones (relación doble logarítmica) (Tabla

3.4). El efecto de la viscosidad fue mayor a menor concentración de proteína y para NSP que para DSP (Figura 3.17).

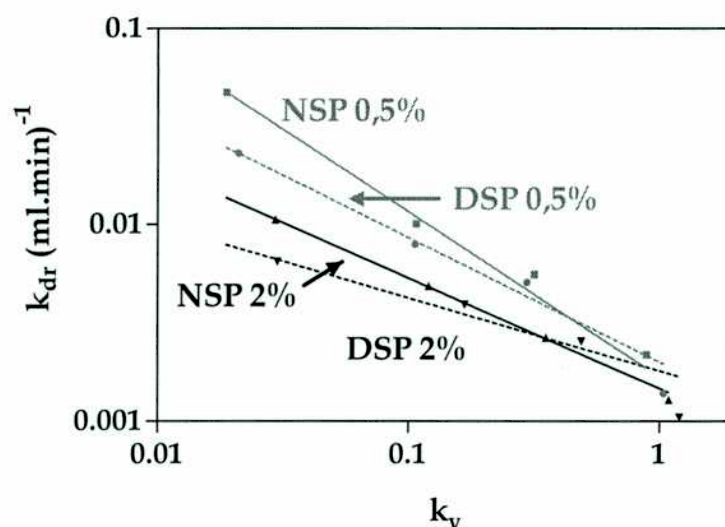


Figura 3.17: Variación de las constantes de drenado con los coeficientes de consistencia de las soluciones para mezclas de proteína de soja y goma xántica, ■ (NSP 0,5%); ▲ (NSP 2%); • (DSP 0,5%); ▼ (DSP 2%).

Tabla 3.4: Correlación entre las constantes de drenado de las espumas (k_{dr}) y los coeficientes de consistencia (k_v) de las soluciones para NSP y DSP 0,5 y 2%p/p y goma xántica 0 - 0,1 % p/p según: $k_{dr} = a \cdot k_v^b$

Parámetro	NSP 0,5%	NSP 2%	DSP 0,5%	DSP 2%
b	0,84 ^a ±0,04	0,56 ^b ±0,01	0,67 ^b ±0,06	0,40 ^c ±0,06
$a \cdot 10^3$	1,7±0,3	1,47±0,05	1,7±0,4	1,6±0,3
R^2	0,9983	0,9997	0,9924	0,9587

^{a,b,c} El análisis de ANCOVA sobre la igualdad de las pendientes indica que son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Si se compara el aumento de estabilidad al drenado producido por el incremento de concentración proteica con el producido por el agregado de la goma espesante, se observa que para similares k_{dr} las viscosidades de los sistemas con polisacárido son mucho mayores (Tabla 3.6). Esto indica que la viscosidad de

la fase continua es importante en el mecanismo de drenado, pero no es el único factor determinante del proceso, el cual también está influido por las características del film formado.

Tabla 3.6: Comparación de la estabilidad al drenado de espumas de soluciones proteicas 6% con espumas de estabilidad similar provenientes de menor concentración proteica y agregado de goma xántica.

Sistema	$t_{1/2}$ (min)	k_{dr} (ml*min)	k_v (dina.s/cm ²)
NSP 6%	14±1	0,0063±0,0006	0,073±0,001
NSP 2% + X 0,025%	13±1	0,0049±0,0004	0,120±0,002
DSP 6%	36±1	0,0027±0,0001	0,136±0,002
DSP 2% + X 0,05%	37±1	0,0026±0,0001	0,488±0,007

Al aumentar la concentración de goma xántica disminuyen las diferencias de estabilidad debidas a la estructura nativa o desnaturalizada de la proteína. La geometría del sistema influye en esta diferenciación, pues, como se ha discutido anteriormente, al variar las dimensiones del recipiente donde se estudia la estabilidad, se modifican de forma diferente las velocidades de los distintos procesos que llevan a la desestabilización de la espuma (colapso, desproporción y drenado), afectando la velocidad de drenaje. En la Tabla 3.7 puede apreciarse que en la pipeta la estabilidad de las espumas de NSP y DSP 2% con goma xántica 0,1% resultó sensiblemente diferente, mientras que en las probetas la diferencia fue mucho menor. Para concentraciones de goma aún mayores (0,3 y 0,5%), en la geometría de la pipeta las diferencias debido a la estructura proteica se minimizaron. La presencia de un umbral de fluencia en la fase continua no fue evidenciado, pues sino el drenado debería haberse detenido por completo (Halling, 1981; Parker y col., 1995).

Tabla 3.7: Efecto del cambio de geometría en las constantes de drenado de soluciones NSP y DSP 2% con goma xántica.

Geometría	Solución mezcla	$k_{dr} \cdot 10^3$ (ml.min) ⁻¹
ProbetaA	NSP 2% + GX 0,1%	1,5±0,1
	DSP 2% + GX 0,1%	1,5±0,1
Probeta B	NSP 2% + GX 0,1%	1,29±0,07
	DSP 2% + GX 0,1%	1,05±0,04
Pipeta	NSP 2% + GX 0,1%	6,7±0,3
	DSP 2% + GX 0,1%	3,5±0,2
(ml.h) ⁻¹ ·10 ²		
Pipeta	NSP 2% + GX 0,3%	2,2±0,3
	DSP 2% + GX 0,3%	2,8±0,2
Pipeta	NSP 2% + GX 0,5%	0,63±0,08
	DSP 2% + GX 0,5%	0,49±0,07

Las dimensiones de las probetas A y B se detallan en Mat. Y Mét. pág. 73

3.3.2. Estabilidad de las espumas según el estudio de su comportamiento reológico

En las Figuras 3.18 a, b, c y d, se muestran las curvas de viscosidad aparente en función del tiempo obtenidas para NSP y DSP 0,5 y 2% con concentraciones de goma xántica entre 0,025 – 0,1%. La adición de goma modificó ambas partes de las curvas de viscosidad aparente, así como también el máximo de viscosidad alcanzado.

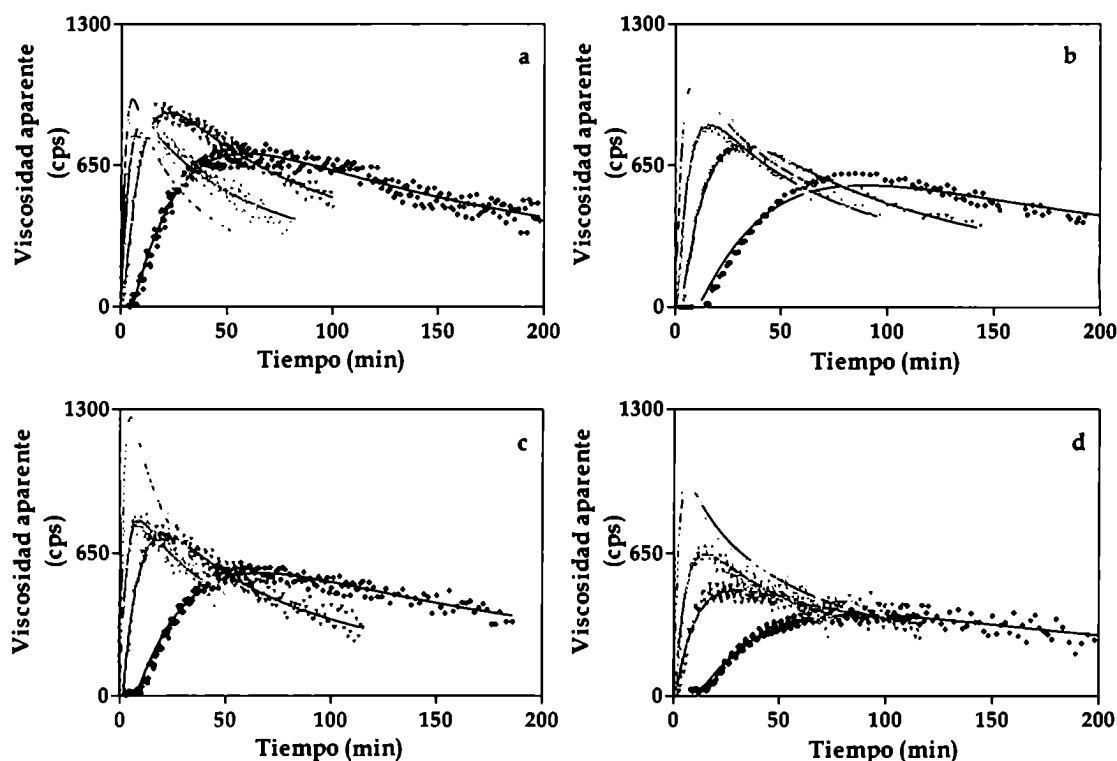


Figura 3.18: Efecto del agregado de goma xántica sobre la viscosidad aparente de las espumas en función del tiempo, a) NSP 0,5%, b) NSP 2%, c) DSP 0,5% y d) DSP 2%. X 0%: ■; X 0,025%: ▲; X 0,05%: ▼ y X 0,1%: ◆.

El agregado de goma produjo una gran disminución en la constante reológica de drenado (K_1) y de desproporción (K_2) resultando el efecto mayor a menor concentración proteica (Figura 3.19 a y b). El efecto sobre la constante de drenado K_1 del modelo reológico está principalmente vinculado al aumento de la viscosidad de la fase continua (Tabla 3.8.), de la misma forma que la constante K_{dr} para el drenaje de líquido, estando ambos parámetros altamente correlacionados ($R^2 = 0,940 - 0,987$). El efecto del agregado de xántica sobre K_2 resultó menor que sobre las constantes de drenado. El aumento de la viscosidad superficial y de la viscosidad de la fase continua disminuyen la solubilidad y la velocidad de difusión del aire entre burbujas, estabilizando el proceso de desproporción. Sin

embargo, el leve aumento de la tensión superficial produce el efecto opuesto por aumento de la presión dentro de las burbujas.

Tabla 3.8: Correlación entre las constantes de drenado de las espumas por el método reológico (K_1) y los coeficientes de consistencia (k_v) de las soluciones para NSP y DSP 0,5 y 2%p/p y goma xántica 0 - 0,1%p/p según:

$$K_1 = a \cdot k_v^b$$

Parámetro	NSP 0,5%	NSP 2%	DSP 0,5%	DSP 2%
B	0,62±0,05	0,57±0,03	0,58±0,09	0,50±0,06
a	0,07±0,01	0,047±0,006	0,08±0,03	0,06±0,02
R^2	0,994	0,995	0,973	0,926

La mayor estabilidad al drenado y a la desproporción que se presentaban al aumentar la concentración proteica o desnaturalizar la proteína, desaparecen con el aumento de la concentración de goma xántica.

El mayor efecto que la goma xántica presentó sobre las espumas con 0,5% de aislado proteico no puede atribuirse a mayores efectos sobre la viscosidad de la fase continua (parte 3.1.3). Podría atribuirse entonces al efecto sinérgico observado en la viscosidad superficial. La interacción sinérgica entre el aislado de soja 0,5% y la goma xántica en el film interfacial, podría explicar la mayor estabilización al drenado y la desproporción a bajas concentraciones proteicas. La mayor viscosidad de los films y de la fase continua puede prevenir el drenado del líquido y disminuir las velocidades de difusión de aire entre las burbujas que se desproporcionan.

La existencia de una interacción proteína-polisacárido ha sido señalado como un factor que puede retardar aún más el drenaje de líquido y la desproporción de las burbujas de aire y fortalecer el film interfacial (Ahmed y Dickinson,1991). La formación de complejos electrostáticos débiles entre proteínas y polisacáridos en la interfase aire - agua a pH neutro es consistente con

resultados obtenidos por Imeson y col. (1977) y Ahmed y Dickinson (1991). Aún cuando ambas macromoléculas posean una carga neta negativa a pH 7, pueden ocurrir interacciones electrostáticas entre la cadena de polisacárido cargado negativamente y regiones de las moléculas cargadas positivamente. A bajas fuerzas iónicas en buffer fosfato, las interacciones electrostáticas locales pueden ser reforzadas por asociaciones hidrofóbicas entre grupos éster del polisacárido y cadenas no polares de la proteína (Ahmed y Dickinson, 1991).

Pavlovska y col. (1993) por mediciones del segundo coeficiente del virial de una mezcla de globulina 11S de *Vicia faba* y de dextrano (polisacárido neutro), mostraron que cuando la fuerza iónica disminuyó de 0,1 a 0,01 mol/l en buffer fosfato, proteínas y polisacáridos neutros (a pH mayor que el punto isoeléctrico), pueden mostrar compatibilidad termodinámica inducida por una interacción atractiva neta. El desdoblamiento de la proteína de soja en la interfase, facilita la exposición de grupos catiónicos y de grupos hidrofóbicos, aumentando la posibilidad de interacciones. Las atracciones electrostáticas pueden no darse en solución, pero si en la interfase donde hay desplegamiento de la proteína.

La participación de la goma xántica en el film interfacial, formando una estructura combinada e interactuando con la proteína de soja, podría explicar el incremento en la expansión y la estabilidad de espumas de los sistemas proteína - polisacárido que no pueden ser explicados exclusivamente en términos de la viscosidad de la solución. En otros trabajos (Garti y col., 1994; Ward-Smith y col., 1994) también se ha encontrado un aumento de la estabilidad de emulsiones proteicas por influencia de polisacáridos que no pudo interpretarse solo en términos de un incremento en la viscosidad de la fase acuosa. Garti y col. (1994) evidenciaron la participación de las gomas en la interfase aceite - agua como cristales líquidos en las lamelas, mejorando la estabilidad con respecto a la coalescencia. Similarmente a lo observado en emulsiones (Hennock y col., 1984; Parker y col., 1995) , la goma xántica formaría una estructura de microgel débil en

la fase acuosa que mantendría a las burbujas suspendidas en el medio, previniendo la desproporción.

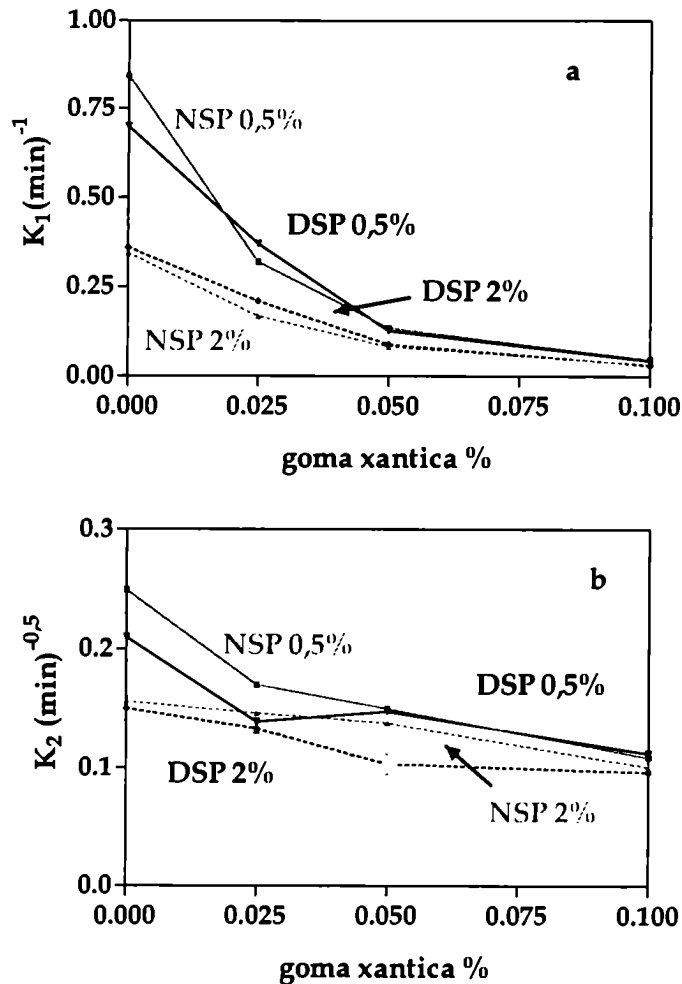


Figura 3.19: Efecto del agregado de goma xántica en las constantes obtenidas de las curvas reológicas a) drenado, K_1 ; b) desproporción, K_2 , NSP 0,5%: ■; NSP 2%: ▲; DSP 0,5%: ▼ y DSP 2%: ◆

3.3.3. Estabilidad de las espumas según el método de burbujeo

Con el fin de analizar si las conclusiones obtenidas sobre el efecto de la goma xántica son independientes o no del método de formación de la espuma, se estudiaron las propiedades de espumado de los sistemas por el método de burbujeo. Las curvas obtenidas (Figura 3.20.a) también mostraron variaciones por el efecto de agregado de GX, aumento de la concentración proteica y cambio de

estructura por desnaturalización térmica. La primera parte de las curvas corresponde a la incorporación de líquido en la espuma y la segunda, representa el drenaje de líquido luego de finalizado el burbujeo. La forma típica de las curvas reportadas en bibliografía es similar a la que exhiben las espumas sin agregado de goma. La alta viscosidad de los sistemas que contienen goma causa una desviación de la forma standard, presentando dos etapas de formación de la espuma (Figura 3.20.b, i y ii), siendo la velocidad de la segunda etapa dependiente de la concentración de goma (menor velocidad a mayor concentración), observándose inclusive defectos en algunas curvas con GX 0,1%. Curvas similares, en las cuales se observaban dos etapas de formación de la espuma, fueron reportadas en sistemas de BSA y dióxido de carbono (Phianmongkhol y Varley, 1999) y fueron vinculadas a velocidades de desproporción y colapso altas con respecto al drenado. Además se observó la aparición de un tiempo lag previo al drenado de líquido (meseta en el máximo, Fig. 3.20.b iii).

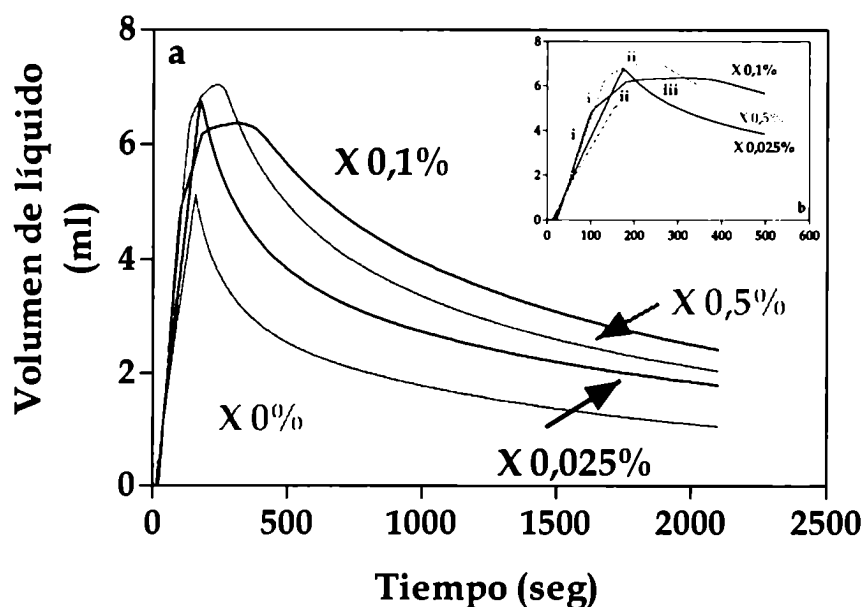


Figura 3.20: a) Volumen de líquido drenado en función del tiempo para espumas de NSP 2% con distintas concentraciones de goma xántica (método de burbujeo), b) Ampliación de los primeros 500 segundos.

Para obtener constantes de velocidad relacionadas con el proceso de drenaje y el de desproporción se aplicó el modelo de Monsalve y Schechter (1984) según lo detallado en la pág. 71. Inicialmente existe un decaimiento rápido del líquido en la espuma, vinculándose principalmente a efectos gravitatorios en el interior del film (constantes vinculadas al drenado), mientras que la difusión del gas interburbujas tiene efectos posteriores (constantes vinculadas al mecanismo de desproporción) (Ross, 1943). Al evaluar las velocidades de drenado ($1/\tau_1$) y de desproporción ($1/\tau_2$) (Figura 3.21 a y b) se obtuvieron resultados similares a los del método de batido, excepto para DSP 0,5% en ausencia de goma, que fue inesperadamente muy estable.

Diferentes comportamientos respecto al drenado observados en las distintas condiciones, pueden deberse al efecto de la variación en las densidades de las espumas. En las espumas formadas por burbujeo, que presentan un tamaño de burbuja más uniforme, la desproporción es menos importante (Halling, 1981). También la composición de fracciones proteicas en la interfase puede ser diferente con respecto a las espumas producidas por batido (parte 3.1.1.) y que no son sometidas a un esfuerzo de corte mecánico. Aunque los dos métodos (burbujeo y batido), difieren en el proceso y el tiempo involucrado en la formación de la espuma, y las propiedades de las burbujas pueden ser diferentes, las conclusiones con respecto al efecto de la goma xántica son similares.

En la Tabla 3.9. se muestran los valores de las pendientes y los coeficientes de regresión obtenidos para correlaciones entre los distintos parámetros de estabilidad obtenidos por ambos métodos. Se encontraron buenas correlaciones cuando se compararon los parámetros de drenado de líquido de la espuma formada por batido ($t_{1/2}$, K_{dr}) y los correspondientes parámetros de burbujeo ($t_{1/2}$, $1/L_{max} \cdot t_{1/2}$). La constante de drenado obtenida por el método reológico (K_1) mostró una buena correlación con el parámetro de Monsalve y Schechter (τ_1), sin embargo las velocidades de desproporción del método reológico (K_2) no mostraron una correlación buena con el parámetro $1/\tau_2$.

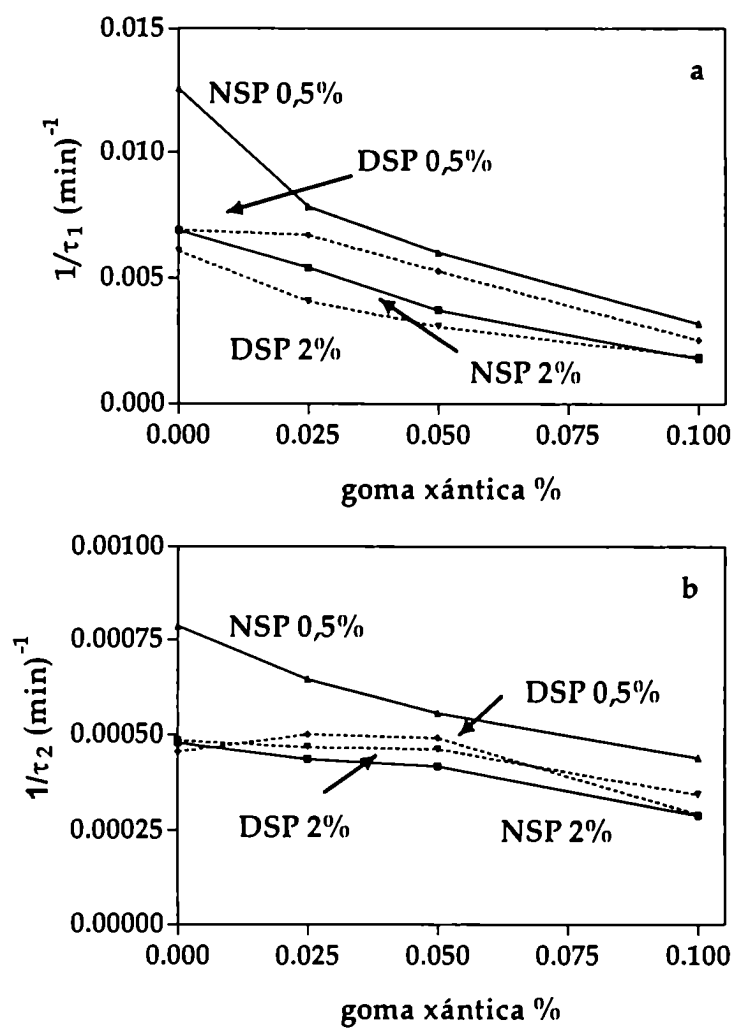


Figura 3.21: Efecto de la goma xántica en las velocidades de desestabilización obtenidas por el método de burbujeo: a) drenado, $1/\tau_1$ y b) desproporción $1/\tau_2$.

Tabla 3.9: Valores de las pendientes y de los coeficientes de correlación entre los parámetros de estabilidad obtenidos por el método de batido - reológico y los correspondientes al método de burbujeo.

Método batido - reológico	Método de burbujeo	Resultados globales		Resultados para grupos individuales de datos NSP 0,5%, NSP 2%, DSP 0,5 y DSP 2%	
Parámetro	Parámetro	B	R ²	B	R ²
$t_{1/2}$ (min)	$t_{1/2}$ (seg)	0,12±0,01	0,879 ^a	0,05 a 0,14	0,915 a 0,987 ^b
K_{dr} (min.ml) ⁻¹	$1/(V_{max} \cdot t_{1/2})$ (mL.seg) ⁻¹	13±1	0,872 ^a	7 a 15	0,857 a 0,987 ^b
K_1 (min) ⁻¹	$1/\tau_1$ (seg) ⁻¹	77±10	0,796	59 a 118	0,796 a 0,991 ^c
K_2 (min) ^{-0.5}	$1/\tau_2$ (seg) ⁻¹	283±57	0,640 ^d	202 a 398	0,209 a 0,995 ^e

Valores de P: ^a P < 0,0001; ^b P < 0,006 a 0,07; ^c P < 0,0025 a 0,1; ^d P < 0,0002; ^e P < 0,01 a 0,5 (las peores correlaciones corresponden a DSP 0,5 y DSP 2% donde los cambios fueron muy pequeños).

Buenas correlaciones entre métodos conductimétricos y volumétricos, fueron obtenidas también por otros autores (Wright y Hemmant, 1987; Baniel y col., 1997; Phianmongkhol y Varley, 1999).

3.3.4. Estabilidad al colapso

La estabilidad al colapso se estudió en la probeta B, donde se realizaron las mediciones de viscosidad aparente de las espumas obtenidas por batido. En las espumas de mayor concentración de goma (GX 0,1%) se observó inicialmente

cierta expansión de la espuma durante los primeros minutos (de 50 a 52 mL), concomitantemente con una disminución inicial de la viscosidad aparente al comenzar la curva (luego del tiempo lag, por ejemplo a los 20 min aprox. para DSP 2% + GX 0,1%). El mismo fenómeno se observó a altas concentraciones proteicas (DSP>6%). Este fenómeno podría estar vinculado con un proceso de cremado, que en sistemas menos viscosos sería muy rápido y anterior al comienzo de la medición, siendo imposible su observación.

En la Figura 3.22 se observa la estabilización al colapso producida por el agregado de goma en espumas de aislado de soja nativo 2%.

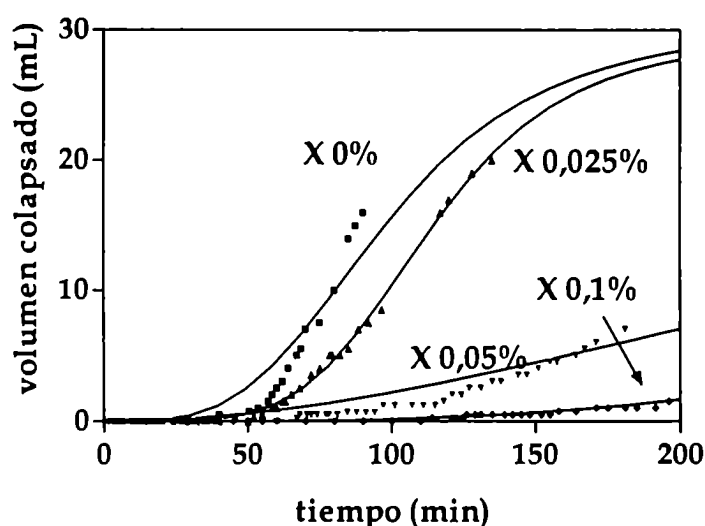


Figura 3.22: *Curvas de colapso para espumas de aislado proteico de soja nativo 2% y diferentes concentraciones de goma xántica.*

Al disminuir la velocidad de drenaje en presencia de xántica, las condiciones que favorecen la ruptura del film ocurren a tiempos mayores (Figura 3.23). La ruptura del film comienza cuando se alcanza un espesor crítico, necesario para el acercamiento de las burbujas y el pasaje de la barrera DLVO (Halling, 1981). La estabilidad de la espuma al colapso puede incrementarse por una disminución del flujo viscoso en el interior de la lamela (vinculado con un aumento de la viscosidad de la fase continua), retardando el angostamiento y la

ruptura del film, aunque las propiedades mecánicas del film absorbido sean poco alteradas (Mita y col., 1977; Dickinson, 1989). La ruptura de la burbuja ocurre luego de cierto grado de deformación, cuando la tensión ejercida excede la presión de Laplace. El pasaje de líquido que drena entre las burbujas las somete a un esfuerzo de corte que las deforma (si se movieran con el líquido no se deformarían), siendo máxima la deformación cuando el film es inmóvil, facilitándose la ruptura (Prins, 1999). En presencia de GX, la formación de gradientes de tensiones y la deformación de las burbujas sería mayor por la mayor viscosidad de la fase continua pero la alta viscosidad superficial podría prevenir la ruptura del film superficial. La elasticidad del film es un prerequisite que determina la capacidad del film de expandirse y contraerse como respuesta a tensiones locales y está directamente relacionada con la estabilidad de las espumas (Graham y Phillips, 1979c; Mac Ritchie, 1978). Si bien no se determinaron las propiedades elásticas de los films, podría esperarse que la goma xántica adsorbida en la interfase estabilizada por la proteína, le confiera mayor resistencia a la deformación, por un aumento de la hidratación debido a la capacidad de absorción de agua de la goma y a un mayor espesor del film mixto.

La densidad de la espuma al comienzo del colapso aumentó apreciablemente con el agregado de goma xántica, indicando que el colapso ocurre cuando menor cantidad de líquido ha drenado de las espumas. Una mayor densidad de la espuma al comenzar el colapso, implica la ruptura de un film más hidratado. La presencia del polisacárido interactuando con la proteína en una estructura tipo gel aumenta la capacidad de absorción de agua del film. En espumas de alta concentración proteica y con alta capacidad de absorción de agua, los films se rompen luego de cierto grado de "deshidratación", a densidades mucho menores (parte 2.4.3.). Esto indicaría un comportamiento diferente por la presencia de la goma xántica.

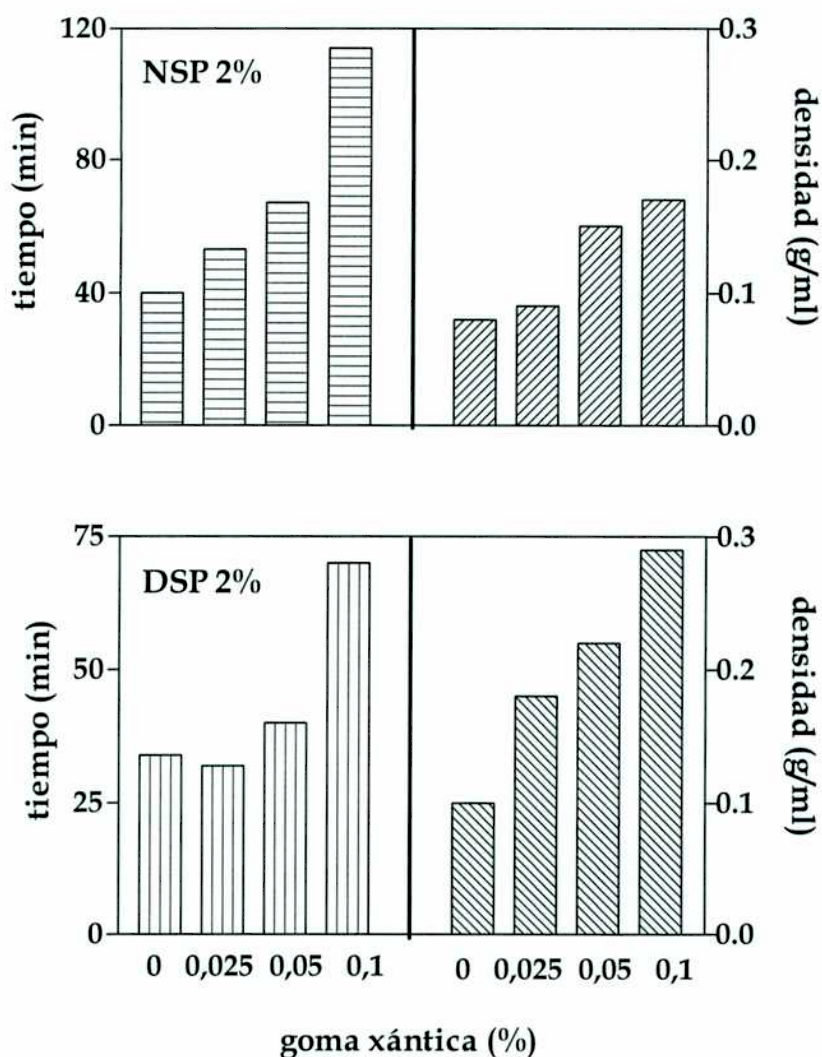


Figura 3.23: Tiempo y densidad de la espuma al comienzo del colapso para NSP 2% y DSP 2% con distintas concentraciones de goma xántica.

Se observó un comportamiento diferente según la estructura de la proteína (Figura 3.23 y 3.24). A diferencia de lo observado para el drenaje y la desproporción, en cuanto a la anulación de las diferencias en el comportamiento entre la proteína nativa y la desnaturalizada por agregado de la goma xántica, en el colapso no se observó dicha tendencia (Figura 3.24). La mayor estabilidad de las espumas de NSP con respecto al colapso en presencia de goma xántica puede vincularse a las diferencias inducidas por la goma en la composición de la

interfase, donde causa un incremento en la proporción de agregados de alto peso molecular (> 200 kDa) y del polipéptido AB, en comparación con las soluciones usadas para hacer las espumas. Por el contrario, en las espumas de proteína desnaturalizada, la goma produce una disminución en la proporción de agregados de alto peso molecular y un incremento en el polipéptido B.

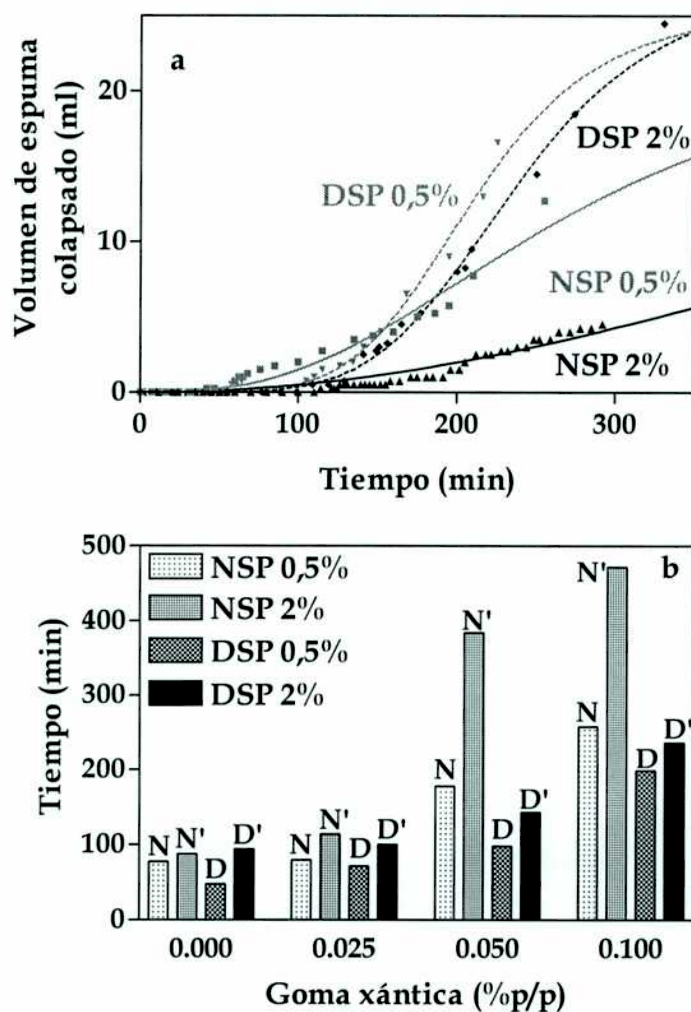


Figura 3.24: a) Volumen de espuma colapsada en función del tiempo para NSP y DSP 0,5 y 2% + X 0,1% y b) Tiempo para que colapse la mitad de la espuma (calculado por modelado).

El mayor grado de interacción entre proteínas en la interfase de las espumas de NSP impartiría al film de proteína nativa una mayor resistencia

mecánica a la ruptura. La preponderancia del polipéptido básico en la interfase de espumas desnaturalizadas podría inducir una mayor interacción electrostática con la goma xántica, disminuyendo las interacciones proteína - proteína y generando un film más frágil. Así mismo, disminuirían las repulsiones electrostáticas entre dos burbujas adyacentes.

CONCLUSIONES

El agregado de goma xántica estabiliza las espumas. El incremento de la viscosidad de la fase acuosa no fue suficiente para explicar la estabilización producida por el agregado de goma en el drenado, la desproporción y el colapso. Interacciones específicas de la goma xántica y las proteínas de soja en la interfase aire - agua influyen en su composición, agregación, y en la reología superficial.

A pesar de que el mecanismo de formación de las espumas difiere entre los métodos de burbujeo y batido, numerosos parámetros que describen la formación de la espuma y la estabilidad al drenado y a la desproporción indican que las diferencias observadas debido a la estructura proteica o a la concentración, se anulan en presencia de goma xántica a altas concentraciones, pues la misma domina la reología superficial y del seno de la solución de los sistemas mezcla.

La desnaturalización térmica mejora la formación de la espuma en presencia de goma xántica, estabiliza al drenaje y en menor medida a la desproporción, pero promueve el colapso. El colapso de las espumas parece estar determinado principalmente por las características del film interfacial como el grado de agregación de las proteínas en la interfase, el espesor y el grado de hidratación del film. Mientras estas dos últimas características serían promovidas por la adsorción de la goma xántica tanto en las interfases de NSP y DSP, mejorando la estabilidad al colapso, la agregación proteica es sólo promovida en la proteína nativa. Esta diferente interacción proteína - goma generaría una mayor estabilidad al colapso en las espumas de proteína nativa en comparación con la desnaturalizada.

PARTE 4

***Interacciones proteína de soja -goma
gelificante (κ -carragenano) en la formación
y estabilidad de espumas***

4.1. Características de las soluciones proteína - κ -carragenano

Al igual que el comportamiento observado con goma xántica, las mezclas de proteínas de soja (nativa o desnaturalizada) y κ -carragenano (KC), formaron sistemas homogéneos y estables, no observándose separación de fases, en condiciones en que ambos biopolímeros presentan carga negativa neta y cierta incompatibilidad termodinámica. Dependiendo de la concentración de ambos biopolímeros y de las condiciones de trabajo, el polisacárido pudo o no gelificar en los sistemas estudiados.

En la Figura 4.1. se observa el termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido de una solución de NSP 2% + CK 0,5%. Debido a la baja concentración proteica, la visualización de los picos endotérmicos fue sólo posible restando a la endoterma obtenida en la primer corrida, la obtenida en el "rescan" posterior a la desnaturalización térmica. No se observó un corrimiento de los picos de desnaturalización correspondientes a la 7S y la 11S a mayores temperaturas, pero si la aparición de una variación entálpica a $107,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ que no se observó en muestras de proteína o de polisacárido solo.

La presencia de otros componentes en la solución proteica puede afectar la estructura macromolecular de la proteína por interacción directa con la misma, o indirectamente afectando la estructura y las propiedades del solvente, o por combinación de ambos mecanismos (Lee y Timasheff, 1981). Las sales y los azúcares producen un efecto estabilizador, observándose el corrimiento de los picos de desnaturalización de las globulinas 7S y 11S, a temperaturas más altas (Hermansson, 1978; Iwabuchi, 1981 a y b; Wright, 1982). La alta resistencia a la desnaturalización en presencia de sales es atribuida a la estabilización de la estructura cuaternaria, mientras que el efecto de estabilización a la desnaturalización por calor por agregado de azúcares, excluidos del dominio proteico, se relaciona con el efecto en la estructura del agua en la vecindad de la

proteína y consecuente modificación de las interacciones hidrofóbicas (Wright, 1982).

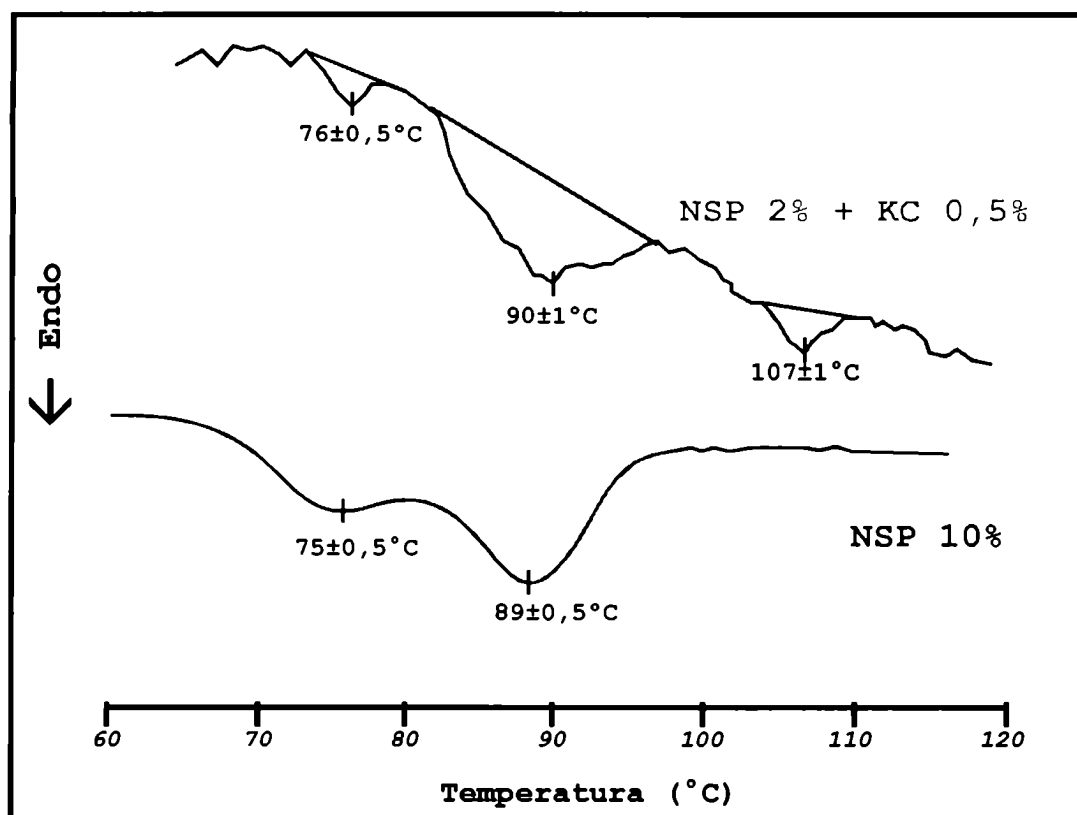


Figura 4.1: Termograma para una mezcla de NSP 2% + KC 0,5%.

En el caso de una limitada compatibilidad termodinámica entre las proteínas y el KC se podría esperar un incremento en las temperaturas de desnaturalización debido a efectos de volúmenes de exclusión, pero los resultados obtenidos coinciden con los de Burova y col. (1992) que mostraron que la presencia de KC no afectaba la temperatura de desnaturalización de 11S de leguminosas. Dichos autores en cambio observaron un segundo pico a menores temperaturas y baja fuerza iónica, correspondiente probablemente a un complejo proteína - polisacárido, con un alto coeficiente de sedimentación. El pico observado a 107°C podría estar vinculado con la desnaturalización térmica de agregados proteicos cuya formación sería inducida por la presencia del

polisacárido. La aparición de una pequeña endoterma a mayor temperatura que las correspondientes a las temperaturas de desnaturalización de las globulinas 7S y 11S, también se observó mediante la misma metodología con agregado de goma xántica (datos no mostrados). En el caso de la goma xántica, se mostró que estos agregados son estables en un medio con SDS y por lo tanto involucrarían enlaces covalentes (parte 3.1.1.).

4.1.1. Tensión superficial

Análogamente al comportamiento evidenciado por la goma xántica, el KC produjo un pequeño incremento de la tensión superficial (Tabla 4.1.). Así mismo, en las soluciones de proteína, el agregado de hidrocoloide produjo un leve aumento de la tensión superficial a bajas concentraciones del mismo (0 – 0,025%). El efecto fue similar para NSP y DSP. Semenova y col. (1999) también observaron aumentos en la tensión superficial de globulinas 11S Vicia Faba en presencia de KC. Los mismos fueron atribuidos al aumento de las interacciones hidrofóbicas en el interior de la molécula proteica, pudiendo desplazarse el balance superficial hidrofílico / hidrofóbico hacia una mayor hidrofiliidad superficial (aumentando probablemente la afinidad termodinámica de la proteína por el medio acuoso y provocando consecuentemente una disminución en la actividad superficial de la misma) y a la presencia de complejos de naturaleza electrostática que formarían una capa hidrofílica densa alrededor de las moléculas proteicas por uniones hidrógeno. La existencia de complejos electrostáticos proteína – polisacárido KC – 11S (Vicia Faba) a $\text{pH} > \text{pI}$, fue demostrada mediante mediciones del segundo coeficiente del virial (Burova y col., 1992); el complejo sería débil, no – cooperativo a consecuencia de interacciones electrostáticas locales.

Mayores concentraciones de polisacárido producirían la agregación y concentración de la proteína en la interfase disminuyendo nuevamente la tensión superficial.

Tabla 4.1: Efecto del agregado de κ -carragenano sobre la tensión superficial de soluciones de aislado de soja nativo 0,5 y 2% (25°C).

Concentración Hidrocoloide	Sin proteína γ (mN.m ⁻¹)	NSP 0,5% γ (mN.m ⁻¹)	NSP 2% γ (mN.m ⁻¹)
0	71,97	63,2	55,6
0,025	72,9	63,9	56,0
0,05	73,9	62,9	55,6
0,1	74,4	62,8	55,5

4.1.2. Viscosidad de las soluciones

Se analizaron las propiedades reológicas de las soluciones mixtas en condiciones de concentración y temperatura (25°C) en las cuales no se observó gelificación.

Las soluciones de KC (0,025 a 0,1%) presentaron bajas viscosidades (incrementándose levemente con el aumento de la concentración) y comportamiento newtoniano. Las mezclas de proteína desnaturalizada - KC presentaron valores de viscosidad similares a los obtenidos sumando las viscosidades correspondientes a cada componente por separado (Figura 4.2) y mostraron un aumento del carácter pseudoplástico al aumentar la concentración de polisacárido (los valores de índice de flujo disminuyeron de 0,96 a 0,83). Soluciones de NSP 0,5% o NSP 2% con agregado de KC presentaron un comportamiento viscoso similar. A diferencia de lo observado en presencia de goma xántica, el comportamiento viscoso de la solución proteica dominó la reología del sistema global. El aumento de la temperatura en estas soluciones produjo disminuciones poco significativas de la viscosidad.

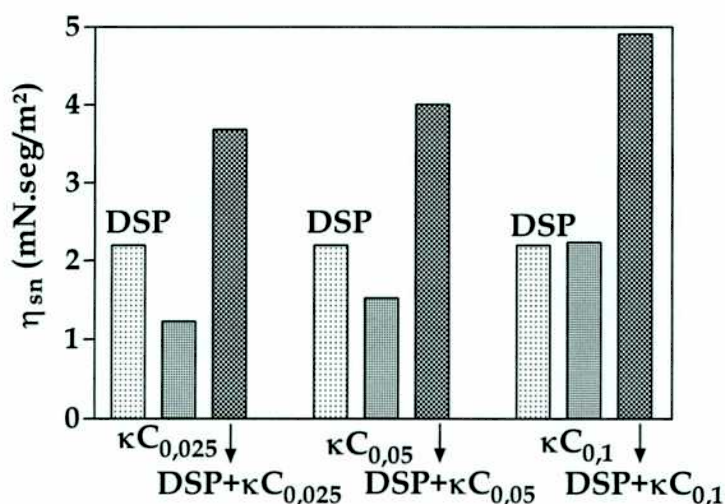


Figura 4.2: Viscosidad de soluciones (velocidad de deformación 90 seg⁻¹) de κ -carragenano y aislado proteico de soja desnaturalizado 2% a 25°C.

A concentraciones mayores a 0,1% de KC, las soluciones gelifican si las temperaturas son apropiadas.

4.1.3. Viscosidad superficial

El KC no tiene tendencia a adsorberse en la interfase, siendo el torque, vinculado a la viscosidad superficial de las soluciones, muy bajo. Las soluciones de las mezclas proteína - KC presentaron valores de torque similares a los de las proteínas solas (Figura 4.3).

Estos resultados son muy diferentes a los obtenidos con goma xántica que evidenció un efecto sinérgico. Esto indicaría una menor participación del KC en la subcapa de la interfase.

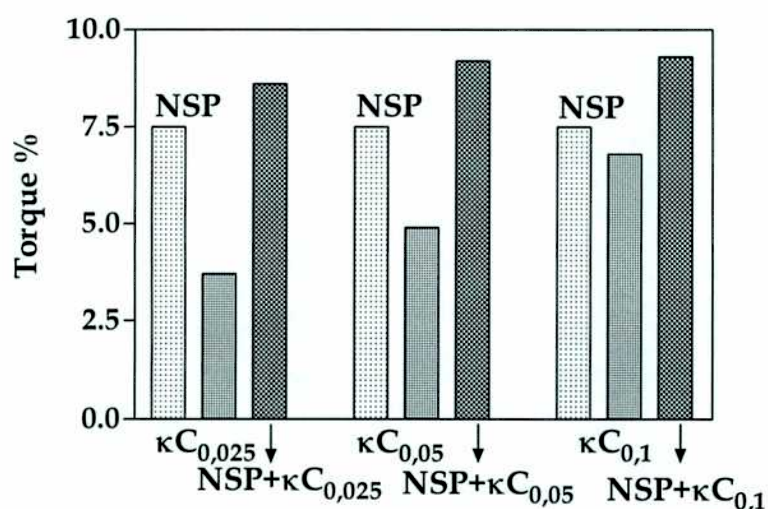


Figura 4.3: Torque vinculado con la viscosidad superficial (60rpm) de films de proteína de soja nativa (2%) y κ -carragenano (κ C) a distintas concentraciones en comparación con la viscosidad superficial de los componentes individualmente, a 25°C.

(Nota: las mediciones correspondientes a este gráfico son a 60 rpm, mientras que las del gráfico 3.12 son a 12 rpm).

4.2. Capacidad de espumado

Las espumas se produjeron por el método de batido. El agregado de KC produjo a bajas concentraciones un leve incremento de la capacidad espumante vinculado con el aumento de viscosidad de la fase continua (Figura 4.4). Concentraciones mayores al 0,1%, en las cuales el KC puede gelificar, produjeron un gran aumento de la viscosidad y limitaron la cantidad de aire que pudo ser incluida, disminuyendo la capacidad espumante. A diferencia del efecto de la goma xántica, el aislado desnaturalizado presentó una mayor capacidad espumante aún en sistemas altamente viscosos donde la incorporación de aire está limitada.

Con el agregado de polisacárido disminuyó la cantidad de líquido no incorporado a la espuma, siendo completa la incorporación para NSP a concentraciones de KC mayores de 0,3% y para DSP a concentraciones mayores a 0,05%.

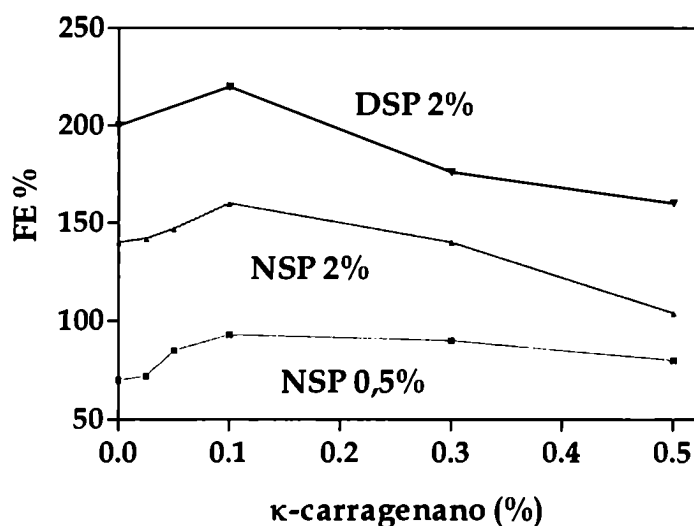


Figura 4.4: Efecto del agregado de κ -carragenano sobre la capacidad de espumado de aislados proteicos de soja nativo y desnaturalizado a 30°C.

Un descenso de la temperatura causó una disminución importante en la capacidad espumante de las soluciones con alta concentración de carragenano (disminuyó aproximadamente un 25% para 20°C) debido a la posibilidad de gelificación. Con el fin de evaluar si el proceso de gelificación limitaba la incorporación de aire, se produjeron las espumas a partir de soluciones líquidas o a partir de los geles previamente formados, ambas a la misma temperatura, no observándose diferencias en la capacidad espumante.

4.3. Estabilidad de las espumas

4.3.1. Condiciones no gelificantes

La estabilidad de las espumas se estudió por el método de batido - reológico. El agregado de KC en condiciones de concentración y temperatura en las cuales no gelifica, provocó disminuciones en las velocidades de drenado y desproporción de las espumas (Figura 4.5.a), pero menores que las producidas por el agregado de goma xántica (Fig. 3.19). Esto se debe a la menor viscosidad que presentaron los sistemas con KC en relación con las que contenían GX (4.1.2. y 3.1.3.).

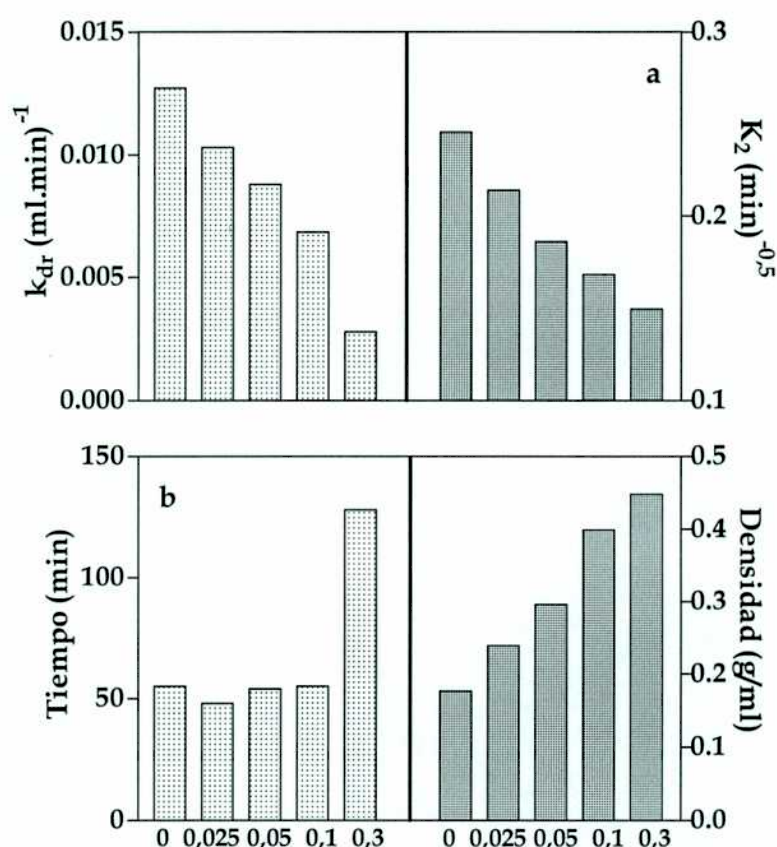


Figura 4.5: Efecto de κ -carragenano sobre la estabilidad de espumas de proteína de soja nativa 2% a) constantes de drenado y de desproporción; b) tiempo para que colapse la mitad de la espuma y densidad de la espuma al inicio del colapso (T: 30°C).

El proceso de colapso comenzó a tiempos similares hasta KC 0,1%. A mayor concentración (KC = 0,3%), donde el sistema es altamente viscoso se retardó (Figura 4.5.b). La ruptura del film comenzó a mayores densidades de la espuma, en forma similar a lo observado por el agregado de goma xántica (Figura 3.23). A diferencia de lo observado por agregado de GX, no se observaron diferencias entre el colapso de las espumas de NSP y las de DSP.

4.3.2. Condiciones gelificantes

El KC forma geles termorreversibles, los cuales se forman en condiciones de extenso contacto polímero - polímero involucrando las partes menos solubles de las macromoléculas. El KC gelifica en presencia de iones potasio y sus propiedades de gelificación pueden ser afectadas por la adición de proteína, disminuyendo la concentración crítica para gelificar comparada con la del polisacárido sólo (Samant y col., 1993) y aumentando la temperatura de gelificación.

En las Figuras 4.6 a y b se compara el comportamiento de mezclas de NSP o DSP 2% con KC 0,3% en condiciones en las cuales se produce la gelificación del KC ($T = 20^{\circ}\text{C}$) y en las cuales no gelifica ($T = 23$ y 28°C). La proteína debido a la baja concentración en la que se encuentra no gelifica (Hermansson, 1986) y por lo tanto el aumento de la viscosidad aparente de la espuma con el tiempo refleja la gelificación del polisacárido. En la espuma de NSP 2% + KC 0,3% que no gelificó (28°C) se observó un comportamiento similar a los vistos anteriormente, donde existen procesos de drenaje, desproporción y colapso. Al disminuir la temperatura ($T = 20^{\circ}\text{C}$), la gelificación compite con el drenado, presentándose un cambio abrupto en la cinética de drenado de líquido una vez formado el gel (Fig. 4.6.b).

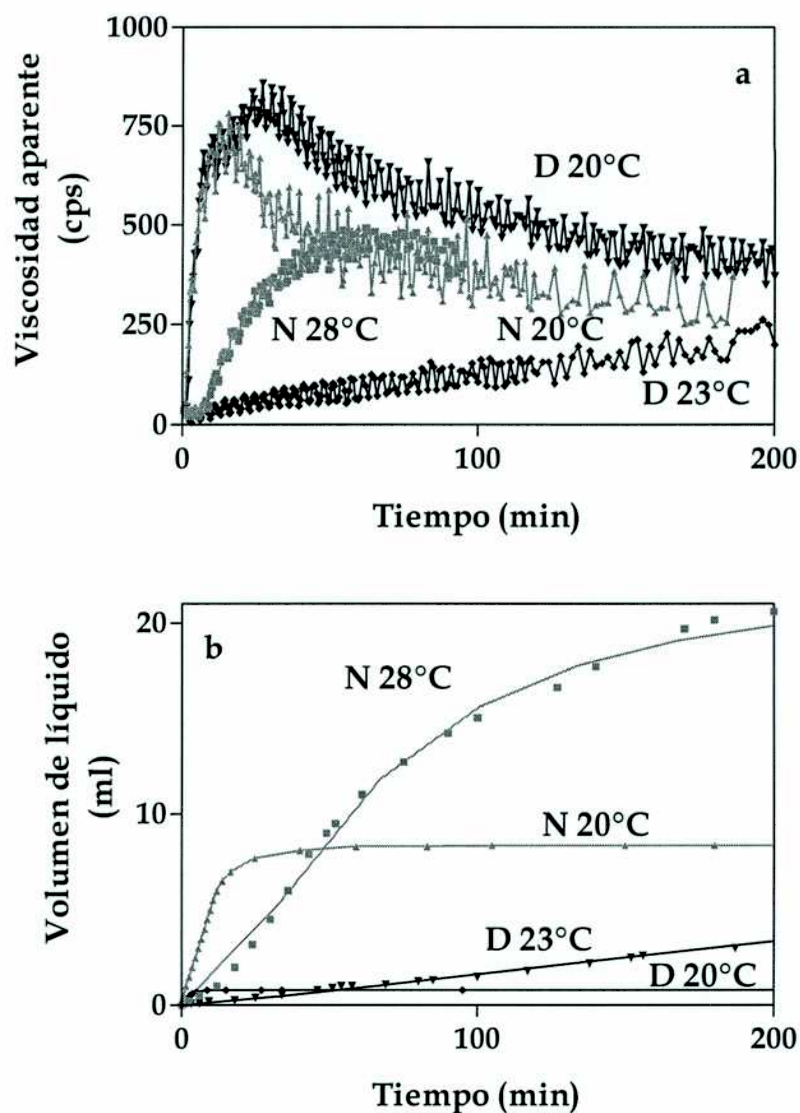


Figura 4.6: Efecto del agregado de κ -carragenano 0,3% en la estabilidad de espumas de NSP y DSP 2% a) Comportamiento reológico; b) Drenaje de líquido.

Así como el aumento de la viscosidad aparente en la Fig. 4.6.a está relacionado con los procesos de drenaje de líquido y gelificación simultáneamente, la fase de disminución de la viscosidad aparente está vinculada con la desproporción de la espuma y con fenómenos reológicos vinculados al comportamiento de la fase gelificada.

Para la proteína desnaturalizada, no se observó drenaje gravitacional de líquido apreciable de la espuma a 20°C (Fig. 4.6.b), por lo tanto la curva reológica correspondiente representa principalmente la formación del gel. Con un pequeño incremento de la temperatura (23°C) el drenado fue muy lento pero no se produjo simultáneamente gelificación, observándose un aumento constante de la viscosidad de la espuma pero con valores muy bajos. Este comportamiento es diferente al observado en presencia de goma xántica a altas concentraciones, donde los sistemas son altamente viscosos y presentan un tiempo lag (Fig. 3.18) luego del cual la viscosidad aparente aumenta lentamente (por ejemplo para GX 0,3% fue de aproximadamente 100 minutos, resultados no mostrados). Esto indicaría que el aumento de la viscosidad en presencia de KC para DSP a 23°C no se debería sólo a un lento drenaje de líquido sino también a un proceso incipiente de gelificación.

Al aumentar la concentración de polisacárido a 0,5% tanto las espumas de NSP como de DSP gelificaron a 20°C, por lo cual no se observó ni drenaje ni colapso de las mismas durante el tiempo de medición de viscosidad aparente (μ_{ap}). En las Figuras 4.7 a y b se muestran las curvas de viscosidad aparente obtenidas para las espumas con KC = 0,5%p/p. Dado que las espumas no drenaron líquido, el aumento de μ_{ap} de las curvas es debido exclusivamente al proceso de gelificación y por lo tanto la velocidad de gelificación se estimó a partir de la pendiente inicial de la curva de aumento de μ_{ap} . En la Tabla 4.2 se observa que tanto la viscosidad máxima como la velocidad de gelificación fueron mucho mayores para las espumas de DSP, indicando una gran influencia de la estructura proteica en las interacciones con el KC en condiciones gelificantes. Esto sería consecuencia de un aumento de la incompatibilidad entre el KC y la proteína al desnaturalizar esta última, lo cual significa una mayor concentración efectiva del KC. Tolstoguzov (1997) ha señalado que la desnaturalización proteica aumenta la incompatibilidad termodinámica entre proteínas y polisacáridos.

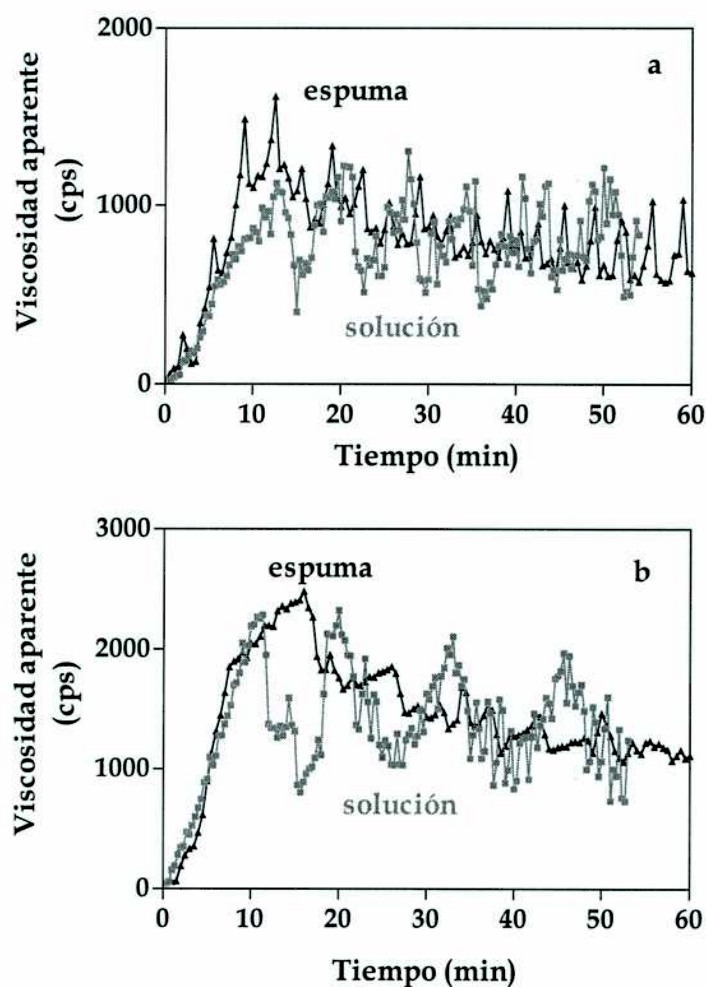


Figura 4.7: Comparación de las viscosidades aparentes de las soluciones mezcla y de las espumas con κ -carragenano 0,5% y aislado proteico de soja 2% nativo (a) y desnaturalizado (b) Temperatura = 20°C.

Tabla 4.2.: Valores máximos ($\mu_{\text{máx}}$) y velocidades de aumento de viscosidad aparente (v_{gel}) para espumas que gelifican, conteniendo NSP o DSP 2% y KC 0,5% (Temperatura 20°C).

Sistema espumado	v_{gel} cps/min	$\mu_{\text{máx}}$ cps
NSP 2% + κ C 0,5%	162±20	1616±50
DSP 2% + κ C 0,5%	278±19	2487±50

En las Figuras 4.7. a y b, se puede además observar que la evolución de la viscosidad aparente de las soluciones sin espumar durante el proceso de gelificación mostró un comportamiento similar al de las espumas (para que los resultados fueran comparables se utilizó el mismo sensor y una geometría semejante). Las similitudes entre las curvas obtenidas para las espumas y las soluciones utilizadas para formarlas, indican que la curva reológica correspondiente a la espuma refleja el proceso de gelificación del líquido de las lamelas.

La disminución gradual de la viscosidad de las espumas, luego de alcanzar un máximo (Fig.4.7. a y b), estaría inicialmente vinculado a un efecto de relajación viscoelástico del gel formado en las lamelas. En una segunda etapa, donde el drenado comenzaría en forma muy lenta, se pudo apreciar visualmente un aumento del tamaño de burbuja, vinculado al proceso de desproporción, que produciría una disminución gradual y lenta de la viscosidad aparente. El aspecto de las espumas con KC 0,5% luego de varios días fue el de una columna de gel con burbujas relativamente grandes.

El estudio de la velocidad de gelificación de las espumas de NSP 2% + KC 0,5% en el rango 20 - 24°C mostró que el comportamiento de las espumas era muy sensible a pequeños cambios de temperatura (Figura 4.8 y Tabla 4.3).

Tabla 4.3.: Velocidad de gelificación en espumas de mezclas de aislado proteico de soja nativo 2% y κ -carragenano 0,5% a distintas temperaturas.

Temperatura °C	Velocidad de gelificación (cps/min)
20	162±20
22	145±5
24	48±1

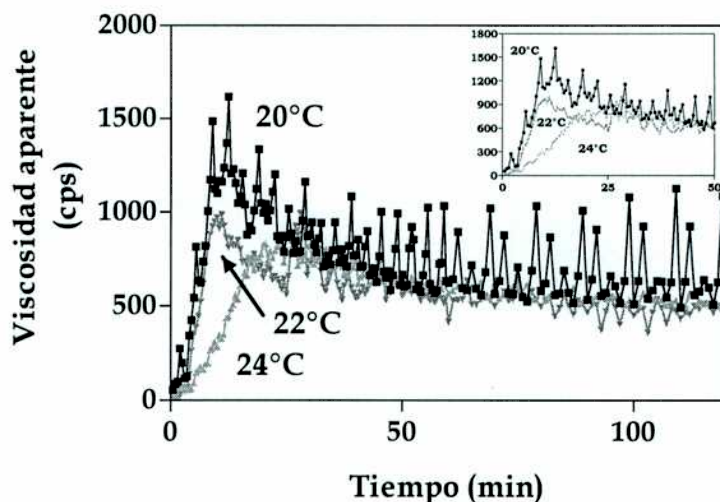


Figura 4.8: Efecto de pequeños cambios de temperatura en el comportamiento reológico de espumas de NSP 2% y κ -carragenano 0,5%; con ampliación de los primeros 50 minutos.

Para evaluar con más detalle el comportamiento de la fase continua (solución no espumada) durante la gelificación, se desarrolló una metodología que permitió determinar la dinámica de gelificación. De acuerdo con Lopes Da Silva y Rao (1999) es posible evaluar la cinética de gelificación mediante la cuantificación del desarrollo de la estructura en el tiempo durante el enfriamiento de dispersiones de biopolímeros en un baño a temperatura constante. Se registraron simultáneamente la evolución de la viscosidad aparente (μ_{ap}) del sistema y la temperatura. La temperatura a partir de la cual se observó un rápido aumento de μ_{ap} se consideró como la temperatura de gelificación (T_{gel}) (Figura 4.9) y la velocidad de gelificación se calculó como la pendiente inicial de la curva de ascenso de μ_{ap} (Figura 4.7).

Las velocidades de gelificación y viscosidades máximas obtenidas para las soluciones mixtas resultaron mucho mayores que los presentados por el κ -carragenano 0,5% en ausencia de proteína, pero menores que los presentados por KC 1% (Tabla 4.4.). El comportamiento de dos o más biopolímeros durante la gelificación difiere del que cada uno tendría en ausencia del otro, interactuando

entre ambos, produciéndose efectos segregativos o asociativos (Morris, 1998). En muy pocos sistemas la gelificación ocurre por asociación de dos biopolímeros diferentes en una conformación cooperativa ordenada con zonas de unión que son análogas a las de un solo componente. Esto se da típicamente entre algunos polisacáridos (Lopes Da Silva y Rao, 1999).

Tabla 4.4.: Valores máximos ($\mu_{\text{máx}}$) y velocidades de aumento de la viscosidad aparente (v_{gel}), para la gelificación de soluciones de KC con o sin NSP o DSP, a 20°C.

Solución	v_{gel} cps/min	$\mu_{\text{máx}}$ cps
$\kappa\text{C } 0,5\%$	12,9±0,7	331±5
NSP 2% + $\kappa\text{C } 0,5\%$	87±2	1304±10
DSP 2% + $\kappa\text{C } 0,5\%$	196±6	2324±15
$\kappa\text{C } 1\%$	231±42	5015±35

La causa principal de efectos sinérgicos parece ser la incompatibilidad termodinámica, debido a una concentración mutua de los biopolímeros, pues las macromoléculas no pueden ocupar el mismo volumen en solución. En presencia de otras proteínas (por ejemplo lácteas) la formación de geles de KC involucró principalmente entrecruzamientos KC - KC y no interacciones del polisacárido con la proteína (Drohan y col., 1997; Tziboula y Horne, 1998a). Los efectos de volumen de exclusión favorecen la gelificación de hidrocoloides, aumentando la velocidad de gelificación y disminuyendo la concentración crítica para gelificar (Tolstoguzov, 1995). Efectos sinérgicos en geles de KC y proteínas de soja también fueron observados por Ipsen (1995).

La mayor viscosidad aparente y las mayores velocidades de gelificación, de las soluciones de DSP con respecto a NSP estarían vinculadas, como ya se vio para las espumas (Tabla 4.2.), a un aumento de la incompatibilidad termodinámica

debido a la desnaturalización térmica. Estas diferencias no se apreciaron en condiciones no gelificantes. Un comportamiento similar por efecto de la desnaturalización térmica fue observado en geles de KC 0,5% con proteínas de suero lácteo (Mleko y col., 1997). Una mayor modificación de las propiedades gelificantes de polisacáridos en presencia de proteína desnaturalizada, por un aumento en las posibilidades de interacciones electrostáticas atractivas proteína - polisacárido entre regiones de los mismos, fue sugerida por Imeson y col. (1977). Los fenómenos de incompatibilidad y formación de complejos interbiopolímeros no son mutuamente excluyentes (Tolstoguzov, 1995). Por lo tanto, el potenciamiento de las características de gelificación del KC por efecto de la desnaturalización de la proteína, podría deberse tanto a un aumento de la incompatibilidad termodinámica por mayor efecto de los volúmenes de exclusión como a una mayor formación de complejos electrostáticos por mayor cantidad de grupos expuestos. En condiciones de incompatibilidad termodinámica, se ha observado la formación de complejos electrostáticos a pH mayores que pI con polisacáridos sulfatados, debido a la formación de pares iónicos entre grupos sulfatados del polisacárido y grupos amino de las proteínas (Grinberg y Tolstoguzov, 1997).

La presencia de proteína produjo también un leve aumento de las temperaturas de gelificación (Figura 4.9 y Tabla 4.5.) y un mayor aumento en las temperaturas de fusión de los geles obtenidas por DSC. En general, por estudios de DSC se observa una única transición para la fusión de geles de KC en presencia de K^+ (en este caso presente en el buffer), la cual se incrementa con la concentración del catión y del hidrocoloide. Las temperaturas de fusión de los geles no coincidieron con las de gelificación, siendo siempre mayores las de fusión (Tabla 4.5.). Se obtuvieron valores similares en mezclas de KC y caseína (Lundin y col., 1998). Mientras que la formación del gel es coincidente con la formación de las hélices, la fusión del gel involucra una energía adicional, vinculada a la ruptura de

enlaces hidrógeno por la agregación de las hélices, dando lugar a los efectos de histéresis (Morris, 1998).

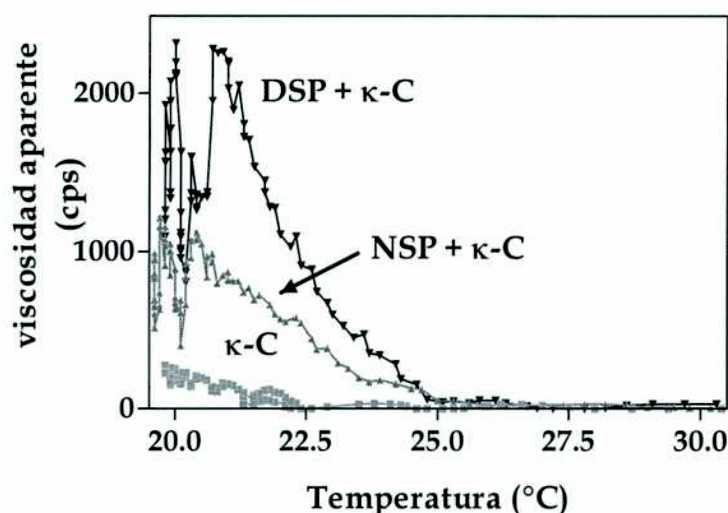


Figura 4.9.: Viscosidad aparente de soluciones de KC 0,5% sólo y con 2% de proteína (NSP o DSP) durante la formación de los geles, variaciones en función de la temperatura.

Tabla 4.5: Temperaturas de gelificación y de fusión de los geles de κ -carragenano 0,5% y aislado proteico de soja 2%.

	T_f (DSC) °C	T_{gel} (gráfico) °C	$\Delta(T_f - T_{gel})$ °C
κ -C	<35	22,5±0,5	<12,5
κ -C/NSP	40±1	25±0,5	15
κ -C/DSP	43±1	24,8±0,5	19,2

T_f : temperatura de fusión; T_{gel} temperatura de gelificación
 KC al 1% presenta $T_f = 49 \pm 1^\circ\text{C}$; $T_{gel} = 34^\circ\text{C}$

La histéresis se incrementó por la presencia de proteínas debido principalmente al gran aumento en las temperaturas de fusión de los geles de KC. Un efecto similar fue observado en presencia de galactomananos, de α y κ -caseína

y de β -lactoglobulina (Fernandes y col., 1995; Lundin y Hermansson, 1998; Ould Eleya y col., 2000). El aumento en T_i fue relacionado con una mayor formación y estabilidad de agregados de hélices de KC y con efectos de volumen de exclusión. La mayor agregación del KC fue confirmada por microscopía de transmisión electrónica por Lundin y col. (1998).

Con el objeto de caracterizar las diferencias en las propiedades de los geles obtenidos se determinó el perfil de textura luego de un almacenamiento por 7 días a 5°C (Figuras 4.10.). Los geles formados por las mezclas presentaron mayor dureza, elasticidad, pegajosidad y cohesividad que los de polisacárido sólo, siendo los incrementos más importantes para DSP que NSP (Figura 4.11.).

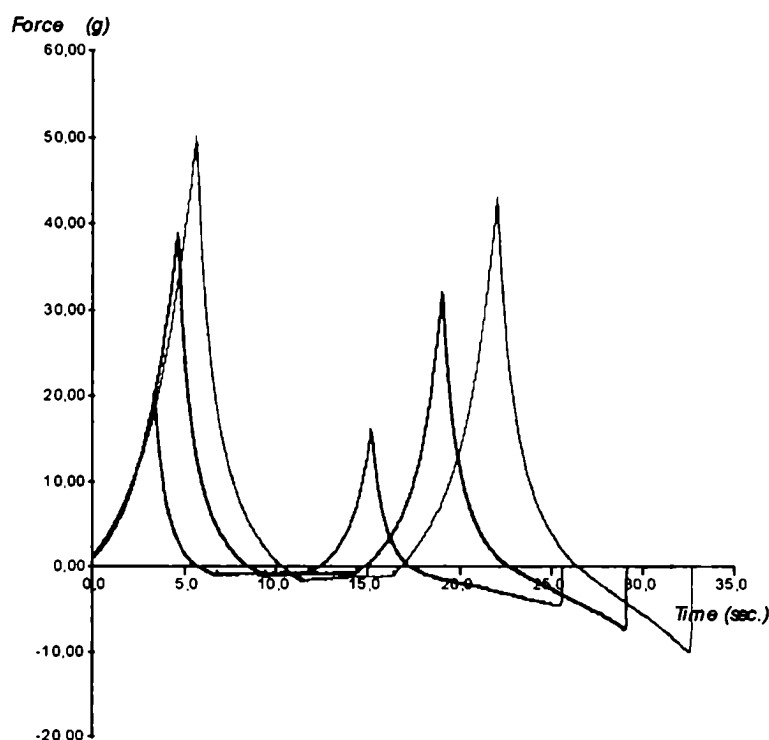


Figura 4.10.: Perfil de textura (TPA) de geles de KC 0,5% sólo --- y con NSP --- o DSP 2% --- .

La incompatibilidad entre ambos biopolímeros aumentaría la concentración efectiva de cada uno de ellos, disminuyendo la cantidad de agua disponible que puede interactuar con cada macromolécula. Al disminuir la interacción del KC con el agua, aumentarían las interacciones inter e intra hélices del polisacárido, aumentando la dureza del gel (Rey y Labuza, 1981).

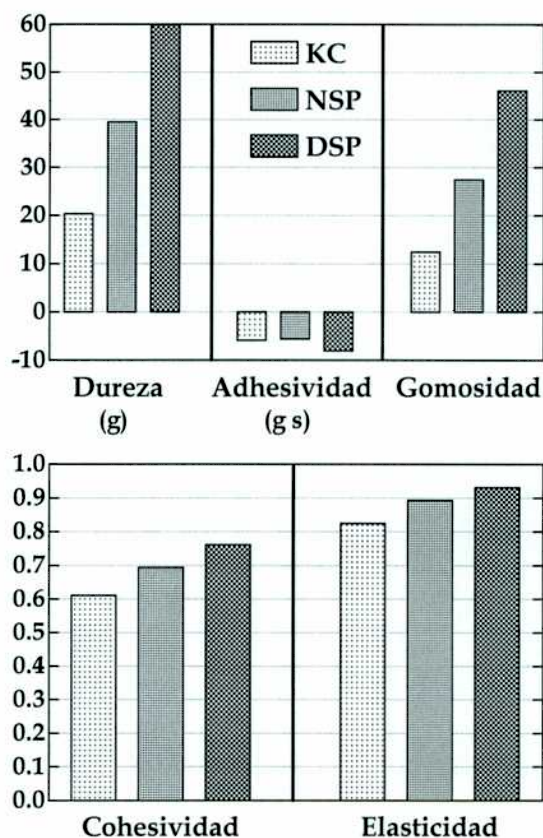
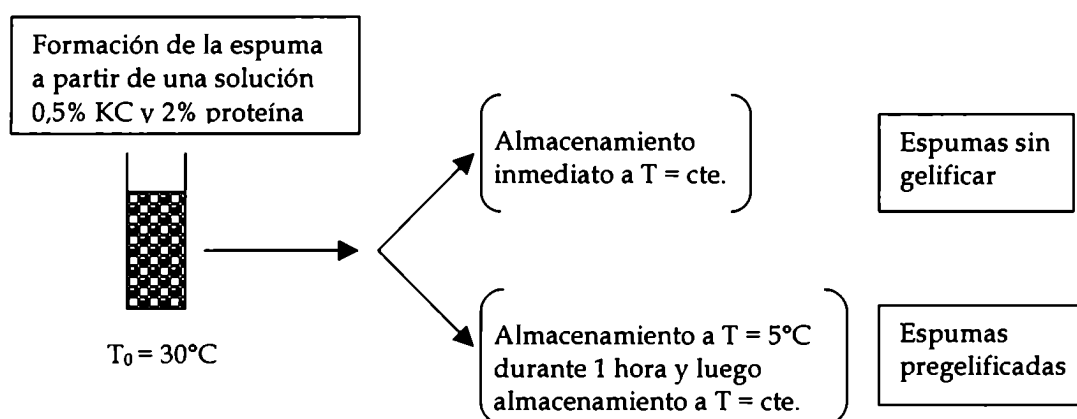


Figura 4.11.: *Propiedades de textura de geles de KC 0,5% y NSP o DSP 2%.*

4.4. Comparación del comportamiento de espumas previamente gelificadas y sin gelificar durante el almacenamiento a distintas temperaturas

La presencia de un efecto de histéresis entre la temperatura de fusión y la de gelificación de los geles de κ -carragenano, potenciada por la presencia de proteína, podría determinar diferencias en la estabilidad de las espumas de acuerdo a si éstas han gelificado o no previamente al almacenamiento. Con el fin de estudiar este efecto y debido a los largos tiempos necesarios para el comienzo del drenaje de líquido, se evaluó la estabilidad de las espumas (KC 0,5% y proteína 2%) por medio de la determinación del líquido drenado a lo largo de 10 días de almacenamiento a diferentes temperaturas (5°C a 45°C). Las espumas se formaron a 30°C y algunas se almacenaron inmediatamente, mientras que otras fueron gelificadas previamente a baja temperatura (Esquema 4.1.). En las espumas en las cuales el KC gelifica en las lamelas, se formaría un sistema de dos fases: una fase dispersa de aire, estabilizada por un film de proteína y una fase continua en las lamelas enriquecida en KC.

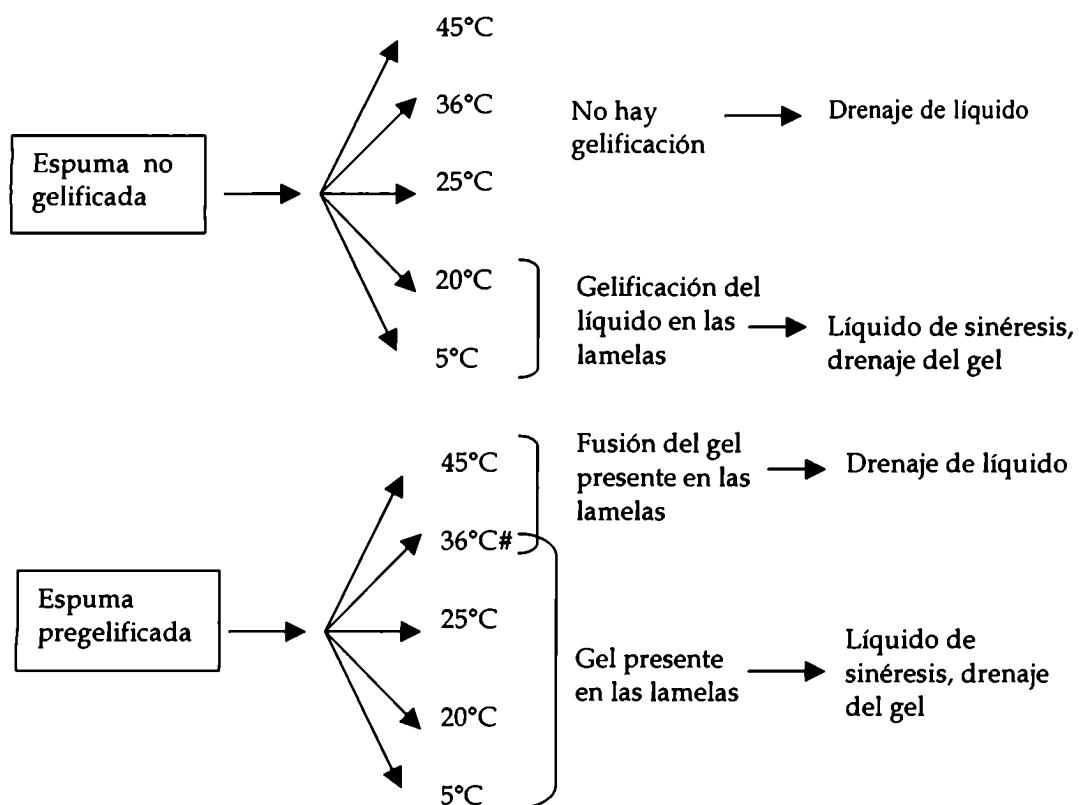


Esquema 4.1.: Condiciones iniciales de las espumas cuya estabilidad se estudió durante el almacenamiento a distintas temperaturas.

En el Esquema 4.2. se muestran los diferentes fenómenos observados dependiendo de la temperatura y la condición inicial de la espuma (pregelificada o no). Las espumas almacenadas a 5°C resultaron muy estables debido a que a esta temperatura la espuma se encuentra gelificada. A temperaturas mayores que las de gelificación (T_{gel}), pero menores que las de fusión (T_f) se observaron diferencias en el drenaje entre las espumas previamente gelificadas y luego almacenadas y las almacenadas sin previa gelificación, especialmente a 25°C (Figura 4.12 y 4.13 a). En las espumas almacenadas a 45° (por encima del punto de fusión) el efecto de la pregelificación fue menor (Figura 4.13 b).

Las espumas previamente gelificadas con DSP resultaron más estables que las de NSP (excepto a 45°C). Sin embargo, las espumas de DSP sin gelificar resultaron más estables para DSP en las condiciones en las cuales gelificaron (5° - 20°C) pero más inestables a altas temperaturas (25° - 45°C). Los tiempos necesarios para el inicio del colapso fueron similares para DSP y NSP, y se observaron diferencias significativas entre las espumas previamente gelificadas y aquellas sin gelificar sólo a 25°C.

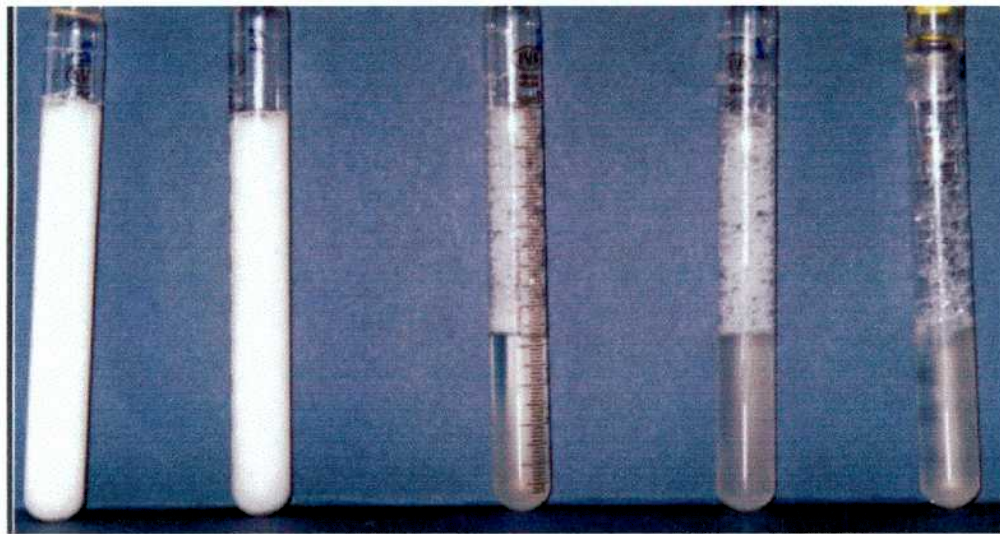
En condiciones donde el KC no gelificó el drenaje de la espuma ocurrió sólo por flujo gravitacional del líquido. Cuando la espuma se encontraba gelificada (5 - 20°C para la espuma no pregelificada o 5 - 36°C para la pregelificada) la desestabilización ocurrió mucho más lentamente. En estos casos se presentaron varios fenómenos: drenaje de líquido inicial hasta que la espuma gelificara (si la misma no estaba previamente gelificada), sinéresis del gel, fusión y flujo de líquido o flujo del gel (Esquema 4.2).



#: el comportamiento difiere para NSP y DSP, debido a distintas temperaturas de fusión.

Esquema 4.2.: Comportamiento de espumas almacenadas a distintas temperaturas luego de su formación a 30°C y luego de su pregelificación a 5°C.

a



5°C

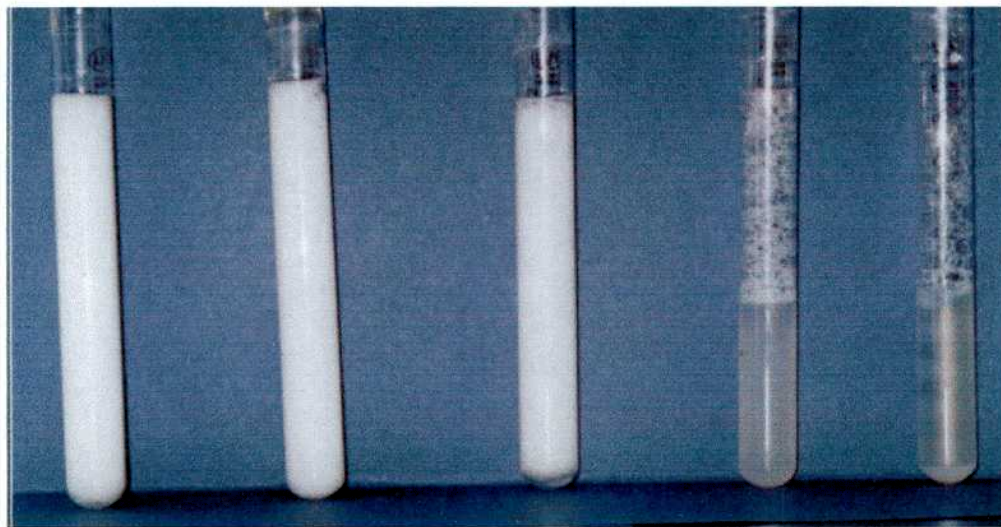
20°C

25°C

36°C

45°C

b



5°C

20°C

25°C

36°C

45°C

Figura 4.12: Líquido drenado para espumas de NSP 2% + κ -carragenano 0,5% almacenadas durante 24 hs a diferentes temperaturas, a) espumas no pre-gelificadas y b) espumas previamente gelificadas.

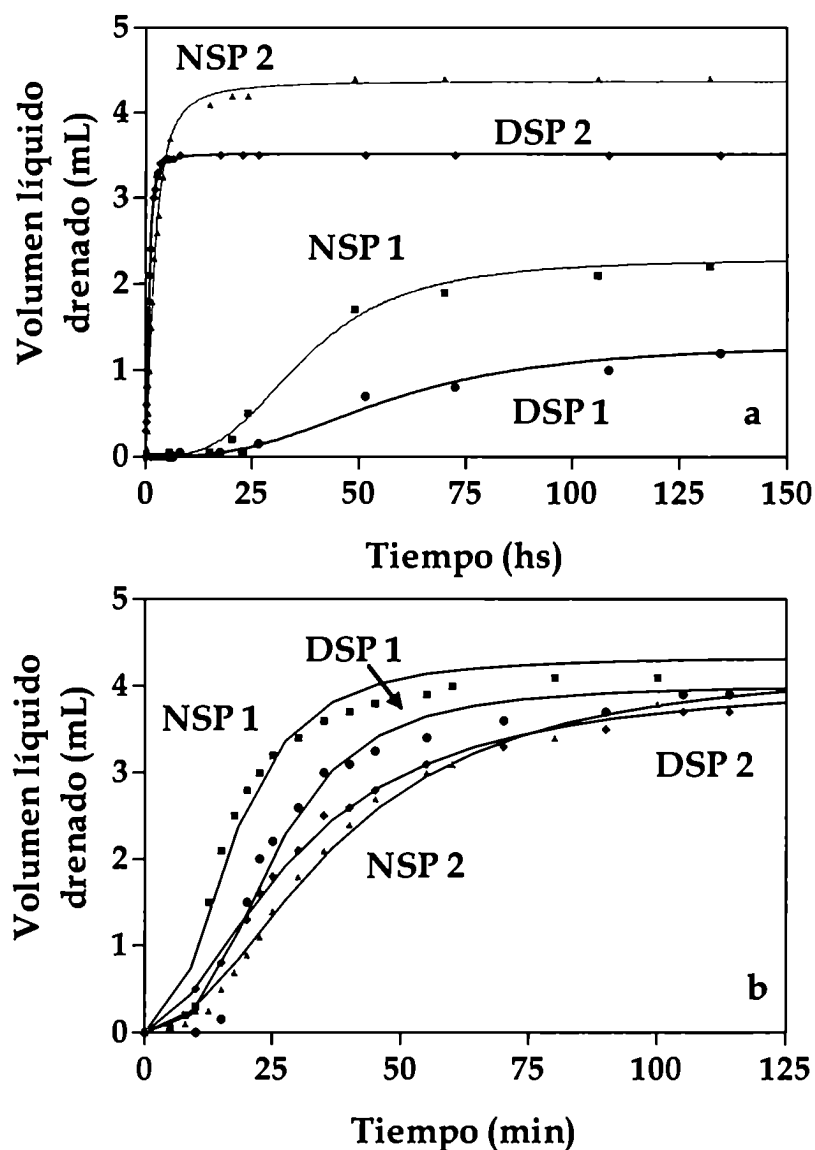


Figura 4.13: Curvas de líquido drenado de espumas de NSP o DSP 2% + KC 0,5% a diferentes temperaturas a) 25°C y b) 45°C, (1) espumas pregelificadas, (2) espumas sin gelificar.

La observación de un flujo de gel coincide con lo descrito por Braudo y Plashchina (1995) en geles termorreversibles. El proceso de gelificación implica el cambio de un estado de líquido viscoelástico a sólido viscoelástico luego del punto de gel y formación de una red tridimensional. Los elementos estructurales presentan una viscosidad local muy alta donde se presenta un proceso de

relajación mecánica a muy baja velocidad. La baja fuerza de los entrecruzamientos, permiten el flujo del gel aún en la región de viscoelasticidad lineal, rompiéndose entrecruzamientos y reestableciéndose un nuevo estado de equilibrio. En geles de cadenas poliméricas flexibles donde la conformación helicoidal de las macromoléculas está estabilizada por las interacciones moleculares, a temperaturas menores que el rango de transición "hélices - cadena desenrollada", la ruptura de los entrecruzamientos está acompañada por la separación de hélices adyacentes (Braudo y Plashchina, 1995).

Se calcularon las velocidades de drenaje a las distintas temperaturas y se evaluaron las energías de activación para las distintas etapas que presentaron los gráficos de Arrhenius (Figuras 4.14 a, b, c y d).

En las espumas sin gelificar previamente que originalmente se encontraban a 30°C (temperatura de formación de las espumas) y que luego fueron almacenadas a distintas temperaturas por encima y por debajo de la T_{gel} se observaron tres zonas, tanto para NSP como para DSP (Fig. 4.14 a y c):

- i) entre 45 y 25°C, donde se observó una disminución gradual de la velocidad de drenado a menores temperaturas, obteniéndose una $E_a = 1,8 - 13,5$ kcal/mol. La energía de activación es baja y es del orden de la obtenida para espumas de aislado proteico (2%) sin polisacárido (resultados no mostrados). La variación en la estabilidad en estas condiciones puede relacionarse con las variaciones de la viscosidad de la solución, del film superficial, y de la tensión superficial con la temperatura. Al disminuir la temperatura el drenaje gravitacional y la difusión del gas entre las burbujas son más lentos (Yu y Damodaran, 1991a).
- ii) entre 25°C y 20°C, donde las temperaturas son cercanas a la T_{gel} (Tabla 4.5.), se observa una gran disminución en las constantes de drenado al disminuir la temperatura, obteniéndose una $E_a = 127 - 175$ kcal/mol. En esta zona ocurre la gelificación de las espumas y por lo tanto el drenaje está

determinado por la velocidad de gelificación que varía enormemente con la temperatura.

- iii) entre 20°C y 5°C, el efecto de la temperatura es mínimo, la espuma ya gelificada presenta un lento drenaje del gel.

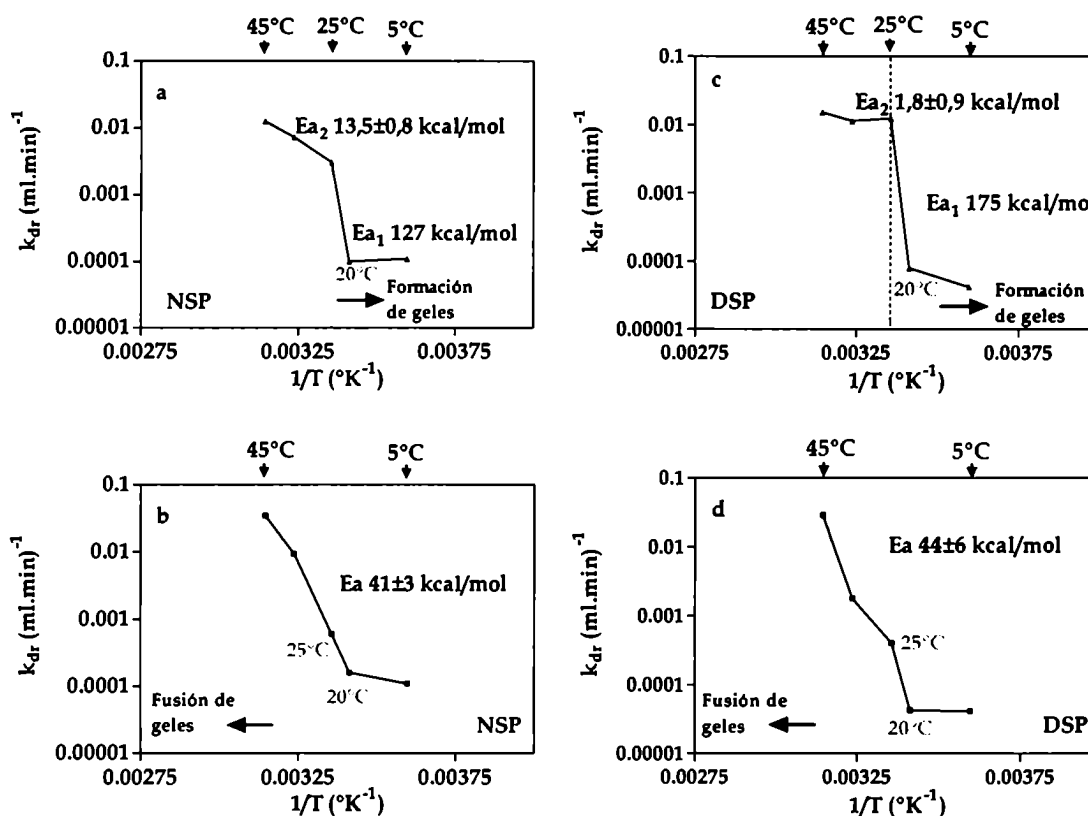


Figura 4.14: Efecto de la temperatura en las constantes de drenado (K_{dr}) de espumas de mezclas de κ -carragenano 0,5% + 2% aislado proteico, a y b: NSP y c y d: DSP, a y c espumas sin gelificar y b y d espumas previamente gelificadas.

En las espumas previamente gelificadas a 5°C (Fig. 4.14 b y d) se observaron dos etapas al almacenarlas a temperaturas crecientes:

- entre 5°C - 20°C el gel formado en las lamelas fluye muy lentamente.
- a temperaturas mayores a 20°C donde los procesos principales fueron el drenado del gel o la fusión parcial y posterior drenado de líquido a las temperaturas más altas, obteniéndose una $E_a = 41 - 44$ kcal/mol. Estos

valores son del orden de los reportados por Braudo y col. (1995) para procesos elementales de relajación de geles termorreversibles, que incluyen la ruptura de numerosas uniones no covalentes.

Para analizar la vinculación de la energía de activación obtenida con el proceso de fusión de geles, se determinó la energía de activación de la fusión de geles por el método de Ozawa (1970). Para NSP 2% + KC 0,5% se obtuvo un valor de $E_{a_{KC/NSP}} = 24,4$ kcal/mol, menor al obtenido para la desestabilización por drenaje de las espumas, lo cual indicaría que otros factores influyen en esta última.

Se observó separación de fases en el líquido drenado de las espumas (NSP o DSP 2% y KC 0,5%): una fase líquida amarillenta más límpida, que probablemente esté enriquecida en proteína, y otra de aspecto más turbio, viscoso y en algunos casos gelificada, probablemente enriquecida en polisacárido. La separación de fases se observó principalmente a altas temperaturas de almacenamiento y en las espumas previamente gelificadas, apareciendo más rápido en las espumas de DSP. La separación de fases de sistemas mixtos no se vincula ni con el proceso de gelificación ni con el de fusión (Tolstoguzov, 1995). La separación observada podría entonces estar relacionada con el proceso de espumado, donde la energía mecánica aplicada a un sistema puede modificar las propiedades reológicas y estructurales de la mezcla (Syrbe y col., 1995). En otros sistemas se ha observado separación de fases (β -lactoglobulina desnaturalizada 1% y KC 0,4%; Ould Eleya y col., 2000) o separación en micro fases sin separación macroscópica (mezclas de β -lactoglobulina y KC; Capron y col., 1999). Podría suponerse entonces que las mezclas consisten en emulsiones agua - agua (con una fase enriquecida en polisacárido y la otra enriquecida en proteína) de cinética de separación muy lenta y que estarían estabilizadas por la formación de complejos proteína - polisacárido, según lo sugerido por Mleko y col. (1997). La formación de la red de gel de polisacárido podría indicar que esta es la fase continua de la emulsión. Durante el proceso mecánico de espumado, la formación de películas proteicas alrededor de las burbujas formando una fase continua, favorecería la separación de fases. En

condiciones de rápida desestabilización de las espumas (altas temperaturas) sería posible la observación de la separación de fases, siendo mayor cuando mayor es la incompatibilidad termodinámica (proteína desnaturalizada).

CONCLUSIONES

Los resultados de tensión y viscosidad superficial muestran que el KC no participa de la interfase, aunque no se puede excluir la formación de complejos electrostáticos débiles con la proteína. El efecto de estabilización del KC está vinculado principalmente con la posibilidad de gelificar en las lamelas.

Pueden observarse diferentes situaciones:

- i) si se almacenan las espumas a temperaturas menores que T_{gel} , la pregelificación no provee una mayor estabilidad adicional.*
- ii) si se almacena a temperaturas mayores que T_f , las espumas se desestabilizan rápidamente, las gelificadas porque funden y las no gelificadas por un mayor drenaje a altas temperaturas. Se observó que las espumas pregelificadas drenaron más rápido, que las no pregelificadas, lo cual podría deberse a una disminución de la movilidad de la proteína en la interfase, impidiéndole reacomodarse y estabilizar el film a medida que drena. La disminución de las velocidades de reacomadamientos conformacionales en sistemas altamente viscosos fue observada en presencia de goma xántica.*
- iii) entre $T_{gel} < T < T_f$ la estabilidad de las espumas pregelificadas es mucho mayor que la de las no gelificadas, pues las primeras no funden y las segundas no gelifican. En este rango de temperaturas se observa la influencia del fenómeno de histéresis.*

Por lo tanto, la pregelificación a 5°C, representa un beneficio ya que permite aumentar enormemente la estabilidad de las espumas, que de otra forma se desestabilizarían rápidamente.

El cambio estructural debido a la desnaturalización térmica de la proteína tiene especial influencia cuando el KC gelifica, induciendo un mayor efecto sinérgico el cual se

traduce en una mayor velocidad de formación del gel, una mayor histéresis y una mayor estabilidad de las espumas. Esta histéresis se puede explotar para definir condiciones que permitan optimizar la estabilidad de las espumas.

CONCLUSIONES

GENERALES

El método de batido - reológico desarrollado resultó eficaz para la caracterización cinética de los mecanismos principales (drenaje de líquido, desproporción y colapso) que conllevan a la desestabilización de espumas a base de proteínas de soja o sus mezclas con polisacáridos, siempre que las espumas no gelifiquen. En el caso de espumas que gelifican (en presencia por ejemplo de κ - carragenano $\geq 0,3\%$ p/p) el método permite caracterizar la velocidad de gelificación, pero no su desestabilización que, por ocurrir en un tiempo prolongado (en el orden de días) debe ser evaluado mediante otras metodologías.

El comportamiento de las espumas no gelificadas (con proteína de soja sola o sus mezclas con goma xántica) se correlacionó con propiedades de la interfase aire - agua como tensión y viscosidad superficial, composición y agregación de las proteínas, así como también con las características viscosas de la fase continua.

En las espumas gelificadas en cambio ($KC \geq 0,3\%$ p/p), la fase continua gelificada (KC conteniendo proteína de soja no adsorbida) fue determinante de la estabilidad de las espumas, la cual fue enormemente superior a la de las espumas sin gelificar.

Más allá de su efecto espesante que conduce a una mayor estabilidad, la goma xántica modifica sustancialmente el grado de agregación de las fracciones proteicas que conforman el aislado proteico de soja tanto en solución como en la interfase aire - agua, debido a una limitada incompatibilidad termodinámica entre la proteína y el polisacárido a pH neutro. Además de este efecto, la goma xántica participaría en la interfase por interacción electrostática con la proteína adsorbida, dominando la reología de la misma. Estas interacciones específicas contribuyen ulteriormente a la estabilización de las espumas.

El κ - carragenano en condiciones no gelificantes ($KC < 0,3\%$ p/p) no presentó interacciones sinérgicas significativas con la proteína a nivel de la interfase. Sin embargo presentó un fuerte sinergismo en las propiedades de gelificación de las espumas ($KC \geq 0,3\%$ p/p).

La modificación de la estructura de las proteínas de soja por desnaturalización térmica controlada, mejoró la formación de espuma y la estabilidad al drenaje en todo el rango de concentraciones, como ha sido reportado en trabajos previos. Sin embargo, la estabilización de las espumas a la desproporción y al colapso se manifestó a concentraciones de proteína superiores al 2 - 4%p/p. La desnaturalización de la proteína tuvo un profundo impacto en la interacción con los polisacáridos, especialmente a nivel de las propiedades de interfase y de gelificación.

En presencia de goma xántica las especies proteicas que estabilizan el film interfacial de la proteína desnaturalizada presentaron menor grado de agregación que los que estabilizan al film de proteína nativa, cumpliendo un rol importante el polipéptido básico e hidrofóbico B de la glicinina. Estas diferencias promovidas por la goma xántica determinan entre otras cosas que las espumas de proteína desnaturalizada colapsen mucho más rápidamente que las de proteína nativa.

Los efectos contrapuestos de la desnaturalización en los diferentes mecanismos de desestabilización de espumas formuladas con goma xántica, señalan la necesidad de evaluar en que caso es conveniente la desnaturalización, de acuerdo a la concentración de proteína y polisacárido utilizada en la formulación del producto final y a los requerimientos de estabilidad de la espuma.

Desde la óptica de las espumas gelificadas con κ - carragenano, la desnaturalización de la proteína de soja potenció el sinergismo existente posibilitando una mayor velocidad de gelificación del KC, una mayor temperatura de fusión de los geles y un aumento de la histéresis entre la temperatura de gelificación y de fusión. Esto permite incrementar el rango de temperaturas de almacenamiento de las espumas gelificadas, sin cambios apreciables en su estabilidad.

Por último, los resultados obtenidos señalan la importancia de profundizar los estudios sobre las interacciones proteína - polisacárido en la estabilización de

coloides alimentarios con el objeto de identificar condiciones de sinergia que puedan tener una aplicación tecnológica.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, M. and Dickinson, E. (1991) "*Foaming of aqueous solutions of protein + propylene glycol alginate*", Food Hydrocolloids, 4(5): 395-402
- Alves, M.M.; Antonov, Y.A. and Gonçalves, M.P. (1999) "*The effect of structural features of gelatin on its thermodynamic compatibility with locust bean gum in aqueous media*", Food Hydrocolloids, 13: 157-166.
- Angarska, J.K.; Tachev, K.D.; Kralchevsky, P.A.; Mehreteab, A. and Broze, G. (1998) "*Effects of counterions and co-ions on the drainage and stability of liquid films and foams*", Journal of Colloids and Interface Science, 200: 31-45.
- Antipova, A.S. and Semenova, M.G. (1997) "*Effect of neutral carbohydrate structure in the set glucose / sucrose / maltodextrin / dextran on protein surface activity at the air / water interface*", Food Hydrocolloids, 11: 71-77
- Arrese, E.L.; Sorgentini, D.A.; Wagner, J.R. and Añón, M.C. (1991) "*Electrophoretic, solubility, and functional properties of commercial soy protein isolates*", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39: 1029-1032.
- Arteaga, G.E. and Nakai, S. (1993b) "*Predicting protein functionality with artificial neural networks: Foaming and emulsifying properties*", Journal of Food Science, 58(5): 1152-1156.
- Arteaga, G.E.; Li-Chan, E.; Nakai, S.; Cofrades, S. and Jiménez-Colmenero, F. (1993a) "*Ingredient interaction effects on protein functionality: mixture design approach*", Journal of Food Science, 58(3): 656-662.
- Babiker, E.E.; Hiroyuki, A.; Matsudomi, N.; Iwata, H.; Ogawa, T.; Bando, N. and Kato, A. (1998) "*Effect of polysaccharide conjugation or transglutaminase treatment on the allergenicity and functional properties of soy protein*", Journal of Agricultural & Food Chemistry, 46 (3): 866-871.
- Badley, R.A. D. Atkinson, H. Hauser, D. Oldani, J. Green and J.M. Stubbs (1975) "*The structure, physical and chemical properties of the soy bean protein glycinin*", Biochimica et Biophysica Acta, 412: 214-228.
- Baniel, A.; Fains, A. and Popineau, Y. (1997) "*Foaming Properties of Egg Albumen with a Bubbling Apparatus Compared with Whipping*", Journal of Food Science, 62(2): 377-381.
- Bergenståhl, B.; Fälldt, P. and Malmsten, M. (1995) "*Surface structures and surface - active components in food emulsions*", in Food Macromolecules and Colloids, ed. by Dickinson, E. and Lorient, D., The Royal Society of Chemistry, 201-214.

Bernardi, Don LS; Pilosof, A.M.R. and Bartholomai, G.B. (1991) "Enzymatic modification of soy protein concentrates by fungal and bacterial proteases" *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68 (2): 102-105.

Bikbov, T.M.; Danilenko, A.N.; Pletenko, M.G.; German, M.L.; Varfolomeeva, E.P.; Grinberg, V.Y.; Leontyev, A.L. and Tolstoguzov, V.R. (1986) "Selective thermal denaturation as a method of preparative isolation of 11S globulins from plant seeds", *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 34: 297-302.

Biliaderis, C.G. (1990) "Thermal analysis of food carbohydrates", in Thermal analysis of foods, ed. by V.R. Harwalkar and C.-Y. Ma, Elsevier Science, p. 168-220.

Bisperink, C.G.J.; Akkerman, J.C.; Prins, A. and Ronteltap, A.D. (1992) "A moving optical fibre technique for structure analysis of heterogeneous products: Application to the determination of the bubble-size distribution in liquid foams", *Food Structure*, 11: 101-108.

Blank, M. (1969) "Intermolecular interactions in newly spread serum albumin monolayers", *Journal of Colloid and Interface Science*, 29(2): 205-209.

Blank, M. and Britten, J.S. (1970) "Determination of yield stress in surface films of lung extract", *Journal of Colloid and Interface Science*, 32(1): 62-66.

Blank, M; Goldstein, A.B. and Lee, B.B. (1969) "The surface properties of lung extract", *Journal of Colloid and Interface Science*, 29(1): 148-154.

Blute, I.; Jansson, M.; Oh, S.G. and Shah, D.O. (1994) "The molecular mechanism for destabilization of foams by organic ions", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71(1): 41-46.

Boye, J.I.; Ma, C.Y. and Harwalkar, V.R. (1997) "Thermal denaturation and coagulation of proteins", Food proteins and their applications, ed. by Damodaran, S. and Paraf, A., Marcel Dekker, Ch.2: 25-56.

Braudo, E.E. and Plashchina, I.G. (1995) "Mechanical properties of thermo-reversible gels in relation to their structure and the conformation of their macromolecules", in Food colloids and macromolecules, ed. by E. Dickinson & D. Lorient, Cambridge, UK, The Royal Society of Chemistry, p. 480-487.

Britten, M. and Giroux, H.J. (1993) "Interfacial properties of milk protein-stabilized emulsions as influenced by protein concentration", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 1187-1191.

- Britten, M. and Lavoie, L. (1992) "Foaming properties of proteins as affected by concentration", *Journal of Food Science*, 57(5): 1219-1222.
- Brook, J.R. and Morr, C.V. (1985) "Current aspects of soy protein fractionation and nomenclature", *Journal of the American Oil Chemists' Society* 62 (9): 1347-1354.
- Bryant, C.M. and McClements, D.J. (2000) "Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denatured whey proteins solutions and gels", *Food Hydrocolloids*, 14: 383-390.
- Burova, T.V.; Grinberg, N.V.; Grinberg, V.Ya. Leontiev, A.L. and Tolstoguzov, V.B. (1992) "Effects of polysaccharides upon the functional properties of 11 S globulin of broad beans", *Carbohydrate Polymers*, 18: 101-108.
- Capron, I.; Nicolai, T. and Durand, D. (1999) "Heat induced aggregation and gelation of β -lactoglobulin in the presence of κ -carrageenan", *Food Hydrocolloids*, 13: 1-5.
- Catsimpoolas, N and Ekenstein, C. (1969) "Isolation of alpha, beta and gamma conglycinins", *Arch. Biochem. Biophys.*, 129: 490.
- Catsimpoolas, N. and Meyer, E.W. (1970) "Gelation phenomena of soybean globulins I. Protein-protein interaction", *Cereal Chemistry*, 47: 559.
- Cheftel, J.C.; Cuq, J.L.; Lorient, D. (1989) Proteínas Alimentarias Ed. Acribia, Zaragoza, España
- Chen, B.H-Y. and Morr, C.V. (1985) "Solubility and foaming properties of phytate-reduced soy protein isolate", *Journal of Food Science*, 50: 1139-1142.
- Cherry, J.P. and McWatters, K.H. (1981) "Whippability and aeration", in Protein Functionality in Foods, ed. by J.P. Cherry, ACS Symposium Series, ch.8: 147-149.
- Clark, D.C.; Coke, M.; Smith, L.J. and Wilson, D.R. (1989) "The formation and stabilization of protein foams", Foams: Physics, Chemistry and Structure, ed. by A.J. Wilson, Basel: Springer-Verlag, Ch.5: 55-68.
- Clark, D.C.; Mackie, A.R.; Wilde, P.J. and Wilson, D.R. (1994) "Differences in the structure and dynamics of the adsorbed layers in protein - stabilized model foams and emulsions", *Faraday Discussions*, 98: 253-262.
- Clark, G.L. and Ross, S. (1940) "Measurement of static and dynamic foams in characteristic units", *Industrial and Engineering Chemistry*, 32: 1594-1598.

Costell, E. and Duran, L. (1979) "*Evaluación y cuantificación de la tixotropía del puré de albaricoque*", *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 18: 4-7.

Cottrel, I.W., Kang, K.S. and Kovacs, P. (1980) "*Xanthan*", Handbook of water soluble gums and resins, ed. by R.L. Davidson, McGraw-Hill, Inc. New York, Ch.24.

Courthaudon, J-L.; Dickinson, E.; Matsumura, Y. and Williams, A. (1991) "*Influence of emulsifier on the competitive adsorption of whey proteins in emulsions*", *Food Structure*, 10: 109-115.

Cuq B., Gontard N. and Guilbert, S. (1998) "*Proteins as agricultural polymers for packaging production*", *Cereal Chemistry*, 75 (1): 1-9.

Damodaran, S. (1988) "*Refolding of thermally unfolded soy proteins during the cooling regime of the gelation process: effect of gelation*", *J. Agric. Food Chem.* 36: 262-269.

Damodaran, S. (1989) "*Film properties of modified proteins*", Food proteins, ed. by J.E. Kinsella and W.G. Soucie. The AOCS - Champaign, IL., Ch.5: 78-99.

Damodaran, S. and Kinsella, J.E. (1982) "*Effect of conglycinin on the thermal aggregation of glycinin*", *J. Agric. Food Chem.* 30: 812-817.

Damodaran, S. and Song, K.B. (1988) "*Kinetics of adsorption of proteins at interfaces: role of protein conformation in diffusional adsorption*", *Biochim. Biophys. Acta*, 954: 253-264.

Damodaran, S. (1997) "*Protein - stabilized foams and emulsions*", Food proteins and their applications, ed. by Damodaran, S. and Paraf, A., Marcel Dekker, Ch.3: 57-110.

Dickinson E. and McClements, D.J. (1995a) "*Protein - Polysaccharide interactions*", in Advances in food colloids, ed. by Dickinson E. and McClements, D.J. , Blakie Academic & Professional, Ch.3: 81-101.

Dickinson E. and McClements, D.J. (1995b) "*Ultrasonic characterization of food colloids*", in Advances in food colloids, ed. by Dickinson E. and McClements, D.J. , Blakie Academic & Professional, Ch.6: 176-210.

Dickinson, E. (1989) "*Protein Adsorption at Liquid Interfaces and the Relationship to foam stability*", Foams: Physics, Chemistry and Structure, ed. by A.J.Wilson, Basel: Springer-Verlag, Ch.4: 39-53.

Dickinson, E. and Matsumura, Y. (1991) "*Emulsifying and surface properties of the 11S and 7S globulins of soybean*", In Food polymers, gels and colloids, The Royal Society of Chemistry, Cambridge p. 498-502.

Dickinson, E. and Stainsby, G. (1982) Colloids in Food, Elsevier Applied Science Publishers, London, p. 123-162.

Dickinson, E., Izgi, E. and Nelson, P.V. (1993) "Determination of protein foam stability from time-dependent pressure monitoring", *Food Hydrocolloids*. 7: 307-318.

Dickinson, E., Murray B.S. and Stainsby, G. (1988) "*Protein adsorption at air-water and oil-water interfaces*", in Advances in Food Emulsions and Foams , ed. by E. Dickinson and G. Stainsby, Ch.4: 123-162.

Dickinson, E.; Ma, J. and Povey, M.J.W. (1994) "*Creaming of concentrated oil-in-water emulsions containing xanthan*", *Food Hydrocolloids*, 8(5): 481-497.

Dickinson, E.; Murray, B.S. and Stainsby, G. (1985) "*Time - dependent surface viscosity of adsorbed films of casein + gelatin at the oil-water interface*", *Journal of Colloid and Interface Science*, 106(1): 259-262.

Doublier, J.L.; Launay, B. and Cuvelier, G. (1992) "*Viscoelastic properties of food gels*", in Viscoelastic properties of foods, ed. by M.A. Rao and J.F. Steffe, Barking, England, Elsevier Science, p. 371-434.

Drohan, D.D.; Tziboula, A.; McNulty, D. and Horne, D.S. 1997 "Milk proteins - carrageenan interactions", *Food Hydrocolloids*, 11(1): 101-107.

Eldrige, A.C.; Hall, P.K. and Wolf, W.J. (1963) "*Stable foams from unhydrolysed soybean protein*", *Food Technology*, 17: 1592

Elizalde, B.E.; Giaccaglia, D.; Pilosof, A.M.R. and Bartholomai G.B. (1991) "*Kinetics of liquid drainage from protein-stabilized foams*", *Journal of Food Science*, 56(1): 24 - 26.

Fernandes, P.B.; Gonçalves, M.P. and Doublier, J-L. (1995) "*Thermal behaviour of kappa-carrageenan + galactomannan mixed systems*", in Food colloids and macromolecules, ed. by E. Dickinson & D. Lorient, Cambridge, UK, The Royal Society of Chemistry, p. 321-327.

Ferreira, M.; Behringer, R. and Jost, R. (1995) "*Instrumental method for characterizing protein foams*", *Journal of Food Science*, 60(1): 90-93.

- Franzen, K.L. and Kinsella, J.E. (1976) "*Functional properties of succinylated and acetylated soy protein*", *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 24: 786-794.
- Fukushima, D. (1991) "*Recent progress of soybean protein foods: chemistry, technology and nutrituion*", *Food Review International*, 7(3):323-351.
- Galazka V.B. and Dickinson, E., (1995) "*Surface properties of protein layers adsorbed from mixtures of gelatin with various caseins*", *Journal of Texture Studies*, 26: 401-409.
- García, M.C.; Torre, M.; Marina, M.L. and Laborda, F. (1997) "*Composition and characterization of soyabean and related products*", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37(4): 361-391.
- Garti, N. and Reichman, D. (1994) "*Surface properties and emulsification activity of galactomannans*", *Food Hydrocolloids*, 8: 155-173.
- Genovese, M.I. and Lajolo, F.M. (1993) "*Composition and structural characteristics of isolated soy proteins from broken and damaged seeds*", *Journal of Food Science*, 58(1): 148-151.
- German, J.B.; Damodaran, S.; Kinsella, J.E. (1982) "*Thermal dissociation and association behavior of soy proteins*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30: 807-811.
- German, J.B.; O'Neill, T.E. and Kinsella, J.E. (1985) "*Film forming and foaming behavior of food proteins*", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62(9):1358-1366.
- Germick, R.J., Rehill, A.S. and Narsimhan, G. (1994) "*Experimental investigations of static drainage of protein satbilized foams - Comparison with model*", *Journal of Food Engineering*, 23, 555-578.
- Glasstone, S. (1979) "*El Estado Líquido*", en Tratado de Química Física Ch.7: 443. Editorial Aguilar, España.
- Glicksman, M. (1983) "*Functional properties of hydrocolloids*", Food Hydrocolloids, ed. by M. Glicksman, CRC press, Vol. I Ch.3: 47-100.
- Goodrich, F.C. and Allen, L.H. (1971) "*The theory of absolute surface shear viscosity*", *Journal of Colloid and Interface Science*, 37(1): 68-73.
- Gonzalez, G. and MacRitchie, F. (1970) "*Equilibrium adsorption of proteins*", *Journal of Colloid and Interface Science*, 32(1): 55-61.

- González, R.J.; Remondetto, G.E.; Coutaz, R.; Santiago, L.G. y Bonaldo, A.G. (1995) "*Efectos de variables del proceso en planta piloto sobre algunas propiedades de aislados proteicos de soja*", Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos, 35(1)
- Graham, D.E. and Phillips, M.C. (1979a) "Proteins at liquid interfaces I. Kinetics of adsorption and surface denaturation", J. Colloid Interface Sci. 70: 403-414.
- Graham, D.E. and Phillips, M.C. (1979b) "Proteins at liquid interfaces II. Adsorption isotherms", J. Colloid Interface Sci. 70: 415-426.
- Graham, D.E. and Phillips, M.C. (1979c) "Proteins at liquid interfaces III. Molecular structures of adsorbed films", J. Colloid Interface Sci. 70: 427-433.
- Grinberg, V. and Tolstoguzov, V.B. (1997) "*Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions*", Food Hydrocolloids, 11(2): 145-158.
- Guillerme, C.; Loisel, W.; Bertrand, D. and Popineau, Y. (1993) "*Study of foam stability by video image analysis: relationship with the quantity of liquid in the foams*", Journal of Texture Studies, 24: 287-302.
- Gunning, A.P.; Wilde, P.J.; Clark, D.C.; Morris, V.J.; Parker, M.L. and Gunning, P.A. (1996) "*Atomic force microscopy of interfacial protein films*", Journal of Colloid and Interface Science, 183(2): 600-602.
- Halling, P.J. (1981) "*Protein-stabilized foams and emulsions*", CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 12: 155-203.
- Hamada, J.S. and Marshall, W.E. (1989) "*Preparation and functional properties of enzymatically deamidated soy proteins*", Journal of Food Science, 54(3): 598-601.
- Hancock, R.I (1984) "*Macromolecular surfactants*", Surfactants, Academic Press. New York, 282
- Hansen. P.M.T. (1982) "*Hydrocolloid-protein interactions: Relationship to stabilization of fluid milk products. A review*", Prog. Fd. Nutr. Sci., 6: 127-138.
- Hashizume, K. and Watanabe, T. (1979) "*Influence of heating temperature on conformational changes of soybean proteins*", Agric. Biol. Chem., 43(4): 683-690.
- Hayakawa, S. and Nakai, S. (1985) "*Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins*", Journal of Food Science, 50: 486

- Heil, J.R.; McCarthy, K.L.; German, J.B.; McCarthy, M.J. and Patino, H. (1990) "*Use of magnetic resonance imaging for evaluation of beer characteristics*", ASBC Journal, 48(4): 119-122.
- Heinzelmann, K.; Hone, T.Z.; Muschiolik, G. and Rawel, H.M. (1994) "*Protein modification by high pressure homogenization*", Nahrung, 38 (5): 478-490.
- Henley, E.C. (1993) "*A brief discussion of soy protein food ingredients*", Korean Society of Food Science and Technology, June 4
- Hennock, M.; Rahalkar, R. R. and Richmond, P. (1984) "*Effect of xanthan gum upon the reology and stability of oil-water emulsions*", Journal of Food Science, 49: 1271-1274.
- Hermansson, A.M. (1973) "*Functional properties of proteins for foods-solubility*", Division of Food Technology, Chemical Centre, LUND.
- Hermansson, A.M. (1978) "*Physico-chemical aspects of soy proteins structure formation*", Journal of Texture Studies, 9: 33-58.
- Hermansson, A.M. (1986) "*Soy protein gelation*", Journal of the American Oil Chemists' Society 63: 658-666.
- Hermansson, A.M. (1995) "*The importance of biopolymers in structure engineering*", in Food colloids and macromolecules, ed. by E. Dickinson & D. Lorient, Cambridge, UK, The Royal Society of Chemistry, p. 363-375.
- Hermansson, A.M.; Sivik, B. and Skjoldebrand, C. (1971) "*Functional properties of protein for foods factors affecting solubility, foaming and swelling of fish protein concentrate*", Lebensmittel Wiss. Technol., 4: 201.
- Hettiarachchy, N. and Kalapathy, U. (1997) "*Soybean protein products*", in Soybeans: chemistry, technology and utilization, ed. by Liu, K., Chapman & Hall, Ch.8: 379-411.
- Horiuchi, T.; Fukushima, D.; Sugimoto, H. and Hattori, T. (1978) "*Studies on enzyme-modified proteins as foaming agents: effect of structure on foam stability*", Food Chemistry, 3: 35-42.
- Huang, X.L., Catignani, G.L. and Swaisgood, H.E. (1997) "*Micro-scale method for determining foaming properties of protein*", Journal of Food Science, 62(5): 1028-1030.

- Huang, Y.T. and Kinsella, J.E. (1987) "*Effects of phosphorylation on emulsifying and foaming properties and digestibility of yeast protein*", *Journal of Food Science*, 52, 1684-1688.
- Hunt, J.A. and Dalgleish, D.G. (1994) "*Adsorption behaviour of whey protein isolate and caseinate in soya oil-in-water emulsions*", *Food Hydrocolloids*, 8: 175-187.
- Hunter, J.R.; Kilpatrick, P.K. and Carbonell, R.G. (1991) " *β -casein adsorption at the air/water interface*", *Journal of Colloid and Interface Science*, 142(2): 429-447.
- Husband, F.A.; Wilde, P.J.; Clark, D.C.; Rawel, H.M. and Muschiolik, G. (1994) "*Foaming properties of modified faba bean protein isolates*", *Food Hydrocolloids*, 8(5): 455-468.
- Imeson, A.P.; Ledward, D.A. and Mitchell, J.R. (1977) "*On the nature of the interaction between some anionic polysaccharides and proteins*", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28: 661-668.
- Ipsen, R. (1995) "*Mixed gels made from protein and kappa - carrageenan*", *Carbohydrate Polymers*, 28: 337-339.
- Iwabuchi, S. and Shibasaki, K. (1981a) "*Immunochemical studies of the effects of ionic strength on thermal denaturation of soybean 7S globulin*", *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(6): 1365-1371.
- Iwabuchi, S. and Shibasaki, K. (1981b) "*Immunochemical studies of the effect of ionic strength on thermal denaturation of soybean 11S globulin*", *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(1): 285-293.
- Iwabuchi, S.; Watanabe, H. and Yamauchi, F. (1991a) "*Thermal denaturation of β -conglycinin. Kinetic resolution of reaction mechanism*", *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 39(1): 27-33.
- Iwabuchi, S.; Watanabe, H. and Yamauchi, F. (1991b) "*Observations in the dissociation of β -conglycinin into subunits by heat treatment*", *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 39(1): 34-40.
- Janicki, A. and Gomoliszek, M. (1993) "*Interactions effect of protein preparations and emulsifier on the foaming process of model solutions*", *Food Technology and Nutrition*, 20: 35-42.
- Kajiyama, N.; Isobe, S.; Uemura, K. and Noguchi, A. (1995) "*Changes of soy protein under ultra-high hydraulic pressure*", *International Journal of Food Science and Technology*, 30: 147-158.

Kato, A.; Mifuru, R.; Matsudomi, N. and Kobayashi, K. (1992) "*Functional casein-polysaccharide conjugates prepared by controlled dry heating*", Biosci. Biotech. Biochem., 56(4): 567-571.

Kato, A.; Murata, K. and Kobayashi, K. (1988) "*Preparation and characterization of ovalbumin-dextran conjugate having excellent emulsifying properties*", J. Agric. Food Chem., 36: 421-425.

Kato, A. and Nakai, S. (1980) "*Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins*", Biochim. Biophys. Acta, 624, 13-20.

Kato, A.; Osako, Y., Matsudomi, N. and Kobayashi, K. (1983a) "*Changes in the emulsifying and foaming properties of proteins during heat denaturation*", Agric. Biol. Chem. 47(1): 33-37.

Kato, A.; Takahashi, A.; Matsudomi, N. and Kobayashi, K. (1983b) "*Determination of foaming properties of proteins by conductivity measurements*", Journal of Food Science, 48:62-65.

Kato, A.; Tsutsui, N.; Matsudomi, N.; Kobayashi, K. and Nakai, S. (1981) "*Effects of partial denaturation on surface properties of ovalbumin and lysozyme*", Agric. Biol. Chem., 45: 2755-2759.

Ker, Y.C. and Chen, R.H. (1998) "*Shear-induced conformational changes and gelation of soy protein isolate suspensions*", Lebensm.-Wiss. u.-Technol., 31: 107-113.

Kilara, A. and Sharkasi, T. Y. (1986) "*Effects of temperature on food proteins and its implications on functional properties*", CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 23(4): 323-394.

Kim, S. H. (1985) Structure, Surface properties and foam stability of native, reduced and succinylated soy 11S globulins, Thesis, Cornell University, EE. UU.

Kim, S.H. and Kinsella, J.E. (1985) "*Surface activity of food proteins: Relationships between surface pressure development, viscoelasticity of interfacial films and foam stability of bovine serum albumin*", Journal of Food Science, 50, 1526-1530.

Kim, S.H. and Kinsella, J.E. (1987a) "*Surface active properties of food proteins: Effects of reduction of disulfide bonds on a film properties and foam stability of glycinin*", Journal of Food Science. 52: 128-131.

Kim, S.H. and Kinsella, J.E. (1987b) "Surface active properties of proteins: Effects of progressive succinylation on film properties and foam stability of glycinin", *Journal of Food Science*, 52: 1341-1343.

Kim, S.Y.; Park, P.S.W. and Rhee, K.C. (1990) "Functional Properties of Proteolytic Enzyme Modified Soy Protein Isolate" *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 38: 651-656.

Kinsella, J.E. (1979) "Functional properties of soy proteins", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56, 242-258.

Kinsella, J.E. (1981a) "Functional properties of proteins: possible relationships between structure and function in foams", *Food Chemistry*, 7: 273-288.

Kinsella, J.E. (1981b) "Relationships between structure and functional properties of food proteins", in *Food Proteins*, ed. by P.E. Fox and J.J. Condon, Applied Science Publishers, Essex, England. Ch.3: 51-103.

Kinsella, J.E. and Phillips L.G. (1989) "Structure: function relationships in food proteins, film and foaming behavior", *Food proteins*, ed. by J.E. Kinsella and W.G. Soucie. The AOCS - Champaign, IL., Ch.4: 52-77.

Kinsella, J.E.; Damodaran, S. and German, B. (1985) "Physicochemistry and function of oilseed proteins", in A.M. Atschul and H.L. Wilke (Eds.), *New Protein in Foods*, Vol.5, Academic Press, New York, Ch.5: 108 - 179.

Kiosseoglou, V. and Doxastakis, G. (1988) "The Emulsification Properties of Soybean Protein in the Presence of Polysaccharides", *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 21: 33-35.

Kitabake, N. and Doi, E. (1982) "Surface tension and foaming of protein solutions", *Journal of Food Science*, 47: 1218-1225.

Kitabake, N. and Doi, E. (1988) "Surface tension and foamability of protein and surfactant solutions", *Journal of Food Science*, 53(5): 1542-1569.

Kobayashi, K.; Kato, A. and Matsudomi, N. (1991) "Developments in new functional food materials by hybridization of soy protein to polysaccharides", *Nutritional Science of Soy Protein*, 11 (1) 23-28.

Lawhon, J.T.; Cater, C.M. and Mattil, K.F. (1972) "A comparative study of the whipping potential of an extract from several oilseed flours", *Cereal Science Today*, 17(9): 240-246, 294.

Leckband, D. and Israelachvili, J. (1993) "Molecular basis of protein function as determined by direct force measurements", *Enzyme Microb. Technol.*, 15: 450-459.

Ledward, D.A. (1994) "Protein – polysaccharide interactions", Protein Functionality in Food Systems, ed. by Hettiarachchy, N. and Ziegler, G.; Marcel Dekker, New York, ch.8: 225-260.

Lee, J.C. and Timasheff, S.N. (1981) "The stabilization of proteins by sucrose", *J. Biol. Chem.* 256: 7193-7201.

Lin, Y., Hsieh, F., Huff, H.E. and Iannotti, E. (1996) "Physical, mechanical and thermal properties of water-blown rigid polyurethane foam containing soy protein isolate", *Cereal Chemistry* 73 (2): 189-196.

Lin, S. and Lakin, A.L. 1990 "Thermal denaturation of soy proteins as related to their dye-binding characteristics and functionality", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67 (1): 872-878.

Lippi, M.S and Taranto, M.V. (1981) "Soy protein - acidic polysaccharide interaction: modification of the emulsification properties of soy protein isolate", *Lebensm.-Wiss. u. - Technol.*, 14(2):55-59.

Loisel, William; Guéguen, Jacques and Popineau, Yves (1993) "A new apparatus for analyzing foaming properties of proteins", Food proteins. Structure and Functionality, ed. by K.D. Schwenke and R. Mothes. VCH, Publishers, New York Germany, 320 - 323.

Lopes Da Silva, J.A. and Rao, M.A. (1999) "Rheological behaviour of food el systems", Rheology of fluid and semisolid foods: principles and applications, ed. by. Rao, M.A., Aspen publication, Ch.6: 319-368.

Lovati, M.R.; Manzoni, C.; Gianazza, E. and Sirtori, .R. (1998) "Soybean protein products as regulators of liver low – density lipoprotein receptors – I Identification of active β -conglycinin subunits" *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 46 (7): 2474-2480.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) "Protein measurement with the folin-phenol reagent", *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

Lucassen-Reynders, E.H. (1993) "Interfacial viscoelasticity in emulsions and foams", *Food Structure*, 12: 1-12.

- Lumen, B. O. de (1990) "Molecular approaches to improving the nutritional and functional properties of plant seeds as food sources: developments and comments", *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 38(9): 1779-1788.
- Lundin, L. and Hermansson, A.-M. (1998) "Multivariate analysis of the influences of locust bean gum, α -casein, κ -casein on viscoelastic properties of Na- κ -carrageenan gels", *Food Hydrocolloids*, 12: 175-187.
- Luyten, H.; Jonkman, M.; Kloek, W. and van Vliet, T. (1993) "Creaming behaviour of dispersed particles in dilute xanthan solutions", in Food colloids and polymers: stability and mechanical properties, ed. By Dickinson, E. and Walstra, P., The Royal Society of Chemistry, 224-234.
- MacRitchie, F. (1978) "Proteins at interfaces", *Advances in Protein Chemistry*, 32: 283-323.
- Mannheimer, R.J. and Schechter, R.S. (1970) "An improved apparatus and analysis for surface rheological measurements", *Journal of Colloid and Interface Science*, 32(2): 195-211.
- McCarthy, K.L. and Heil, J.R. (1990) "Internal liquid flow during foam drainage: A comparison of theory and experiment", *Chemical Engineering Symposium Series*, 86 (277): 71-75.
- McCarthy, K.L.; McCarthy, M.J. and German, J.B. (1989) "Foam and emulsion stability: Measurements by MRI", *Proc. Int. Congr. Eng. Food*, 5th, Cologne, May 28-June 3.
- McClements, D.J. (1999) "Interfacial properties and their characterization", in Food emulsions: principles, practice and techniques, ed. by McClements, D.J., CRC press Ch. 5: 127-159.
- Miller, R.; Krägel, J.; Wüstneck, R.; Wilde, P.J.; Li, J.B.; Fainerman, V.B.; Loglio, G. and Neumann, A.W. (1998) "Adsorption kinetics and rheological properties of food proteins at air/water and oil/water interfaces", *Nahrung*, 42(3/4): 225-228.
- Mita, T., Ishida, E. and Matsumoto, H. (1978) "Physicochemical studies on wheat protein foams: Relationship between bubble size and stability of foams prepared with gluten and gluten components", *Journal of Colloid Interface Science*, 64: 143-153.
- Mita, T.; Nikai, K.; Hiraoka, T.; Matsuo, S. and Matsumoto, H. (1977) "Physicochemical studies on wheat protein foams", *Journal of Colloid Interface Science* 59:172-177.

- Mitchell, J.R. (1986) "Foaming and emulsifying properties of food proteins", in Developments in Food Proteins, ed. by B.Hudson, Applied Science Elsevier, London, Vol. 4. Ch.8: 291-338.
- Mleko, S.; Li-Chan, E.C.Y. and Pikus, S. (1997) "Interactions of κ -carrageenan with whey proteins in gels formed at different pH", Food Research International, 30(6): 427-433.
- Monnereau, C. and Vignes-Adler, M. (1998) "Optical tomography of real three-dimensional foams", Journal of Colloids and Interface Science, 202: 45-53.
- Monsalve, A. and Schechter, R.S. (1984) "The stability of foams: dependence of observation on the bubble size distribution"; Journal of Colloid Interface Science, 97: 327-335.
- Moreira, M.A.; Hermodson, M.A.; Larkins, B.A. and Nielsen, N.C. (1979) "Partial characterization of the acidic and basic polypeptides of glycinin", The Journal of Biological Chemistry, 254(19): 9921-9926.
- Mori T., Nakamura, T. and Utsumi, S. (1982) "Gelation mechanism of soybean 11s globulin: Formation of soluble aggregates as transient intermediates", Journal Food Science, 47: 26-30.
- Morris, V.J. (1998) "Gelation of polysaccharides", in Functional properties of food macromolecules, ed. by Hill, S.E.; Ledward, D.A. and Mitchell, J.R., Aspen Publication, Ch.4: 143-226.
- Mouécoucou, J.; Villaume, C.; Bau, H.M.; Schwertz, A.; Nicolas, J.P. and Méjean, L. (1995) "Decrease of in vitro hydrolysis of soybean protein by sodium carrageenan", in Food colloids and macromolecules ed. by E. Dickinson & D. Lorient, Cambridge, UK, The Royal Society of Chemistry, p. 357-359.
- Nagano, T.; Akasaka, T. and Nishinari, K. (1995) "Study on the heat-induced conformational changes of β -conglycinin by FTIR and CD analysis", Food Hydrocolloids, 9(2): 83-89.
- Narsimhan, G. (1991) "A model for unsteady state drainage of a static foam", J. Food Eng., 14: 139
- Narsimhan, G. and Uraizee, F. (1992) "Kinetics of adsorption of globular proteins at an air-water interface", Biotechnol. Prog., 8(3): 187-196.
- Nielsen, N. C. (1985a) "Structure of soy proteins", New protein foods, Vol.5, Ch.II: 27- 64.

Nielsen, N. C. (1985) "*The structure and complexity of the 11S polypeptides in soybeans*", Journal of the American Oil Chemists' Society, 62(12): 1680-1686.

Nir, I., Feldman, Y., Aserin, A. and Garti, N. (1994) "*Surface properties and emulsification behavior of denatured soy proteins*", Journal of Food Science 59: 606-609.

Nutt, C. W. and Burley, R.W. (1989) "*The influence of foam rheology in enhanced oil recovery operations*", in Foams: Physics, Chemistry and Structure, ed. by A.J. Kilson, Springer-Verlag, London, Ch.8: 105-147.

Ould Eleya, M.M. and Turgeon, S.L. (2000) "*Rheology of κ -carrageenan and β -lactoglobulin mixed gels*", Food Hydrocolloids, 14: 29-40.

Ozawa, T. (1970) "*Kinetic analysis of derivative curves in thermal analysis*", Journal of Thermal Analysis, 2: 301-324.

Parker, A.; Gunning, P.A.; Ng, K. and Robins, M.M. (1995) "*How does xanthan stabilise salad dressing?*", Food Hydrocolloids, 9(4): 333-342.

Pastor, M.V.; Costell, E.; Izquierdo, L. and Durán, L. (1994) "*Effects of concentration, pH and salt content on flow characteristics of xanthan gum solutions*", Food Hydrocolloids, 8(3-4): 265-275.

Patel, P.D.; Stripp, A.M. and Fry, J.C. (1988) "*Whipping test for the determination of foaming capacity of protein: a collaborative study*", International Journal of Food Science and Technology, 23: 57-63.

Pavlovskaya, G.E.; Semenova, M.G.; Thzapkina, E.N. and Tolstoguzov, V.B. (1993) "*The influence of dextran on the interfacial pressure of adsorbing layers of 11S globulin vicia faba at the planar n-decane/aqueous solution interface*", Food Hydrocolloids, 7(1): 1-10.

Petrucelli, S. (1993) Modificaciones estructurales de aislados proteicos de soja producidas por tratamientos reductores y térmicos y su relación con propiedades funcionales. Tesis, Univ. Nac. de La Plata, Argentina.

Petrucelli, S. and Añón, M.C. (1994a) "*Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 1. Structural and hydration properties*", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42(10): 2161-2169.

- Petrucelli, S. and Añón, M.C. (1994b) "Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 2. Surface properties", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(10): 2170-2176.
- Petrucelli, S. and Añón, M.C. (1995) "Soy protein isolate components and their interactions", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(7): 1762-1767.
- Pettitt, D.J.; Wayne, J.E.B.; Renner Nantz, J.J. and Shoemaker, Ch.F. (1995) "Rheological properties of solutions and emulsions stabilized with xanthan gum and propylene glycol alginate", *Journal of Food Science*, 60(3): 528-550.
- Phianmongkhol, A. and Varley, J. (1999) "A multi point conductivity measurement system for characterisation of protein foams", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 12: 247-259.
- Phillips, L.G.; Haque, Z. and Kinsella, J.E. (1987) "A method for the measurement of foam formation and stability", *Journal of Food Science*, 52(4): 1074-1077.
- Phillips, L.G.; Schulman, W. and Kinsella, J.E. (1990) "pH and heat treatment effects on foaming of whey protein isolate", *Journal of Food Science*, 55(4): 1116-1119.
- Phillips, L.G.; Whitehead, D.M. and Kinsella, J. (1994a) "Functional properties of proteins" Structure-Function Properties of Food Proteins, ed. by Phillips, L.G.; Whitehead, D.M. and Kinsella, J. Academic Press, U.K.; 108-110.
- Phillips, L.G.; Whitehead, D.M. and Kinsella, J. (1994b) "Protein films" Structure-Function Properties of Food Proteins, ed. by Phillips, L.G.; Whitehead, D.M. and Kinsella, J. Academic Press, U.K.; Ch.5: 111-130.
- Phillips, L.G.; Whitehead, D.M. and Kinsella, J. (1994c) "Protein- Stabilized foams" Structure-Function Properties of Food Proteins, ed. by Phillips, L.G.; Whitehead, D.M. and Kinsella, J. Academic Press, U.K.; Ch.6: 131-152.
- Phillips, M.C. (1981) "Protein conformation at liquid interfaces and its role in stabilizing emulsions and foams", *Food Technol.*, 35: 50-57.
- Plietz, P.; Damaschum, G.; Müller, J.J.; Schwenke, K.D. (1983) "The structure of 11S globulins from sunflower and rape seed. A small angle X-ray scattering study", *Eur. J. Biochem.*, 130: 315 - 320.
- Pomeranz, Y. (1985) "Proteins specific foods", in Functional properties of food components, ed by Pomeranz, Y. Academic Press, Ch. 6: 189-240.

Poole, S. (1989) Review: "*The foam - enhancing properties of basic biopolymers*", International Journal of Food Science and Technology, 24: 121-127.

Poole, S.; West, S.I. and Walters, C.L. (1984) "*Protein - protein interactions: their importance in the foaming of heterogeneous protein systems*", J. Sci. Food Agric. 35: 701-711.

Prins, A. (1988) "*Principles of Foam Stability*", Advances in Food Emulsions and Foams ed. by E. Dickinson and G. Stainsby, Elsevier Applied Science, London, Ch.3: 91-122.

Prins, A. (1999) "*Stagnant surface behaviour and its effect on foam and film stability*", Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 149: 467-473.

Protein Quality Evaluation (1990) Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Food and Nutrition Paper No.51, Rome, Italy: FAO and WHO, Food and Agriculture Organizations of the United Nations.

Puppo, M.C. (1997) Propiedades gelificantes de las proteínas de soja a pH ácido, Tesis, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Pusky, G. (1975) "*Modification of functional properties of soy proteins by proteolytic enzyme treatment*", Journal of the American Association of Cereal chemistry, 52: 655-664.

Rao, M.A., Damodaran, S., Kinsella, J.E. and Cooley, H.J. (1986) "*Flow properties of 7S and 11S soy protein fractions*", in Food Engineering and Process Applications: Transport Phenomena, ed. by Lemagher, M. and Jelen, P., Basel, Applied Science Publishers, N.Y. pp. 39-48.

Rawel, H.M. and Muschiolik, G. (1994) "*Effect of structural changes on foaming properties of soy proteins*", Food Hydrocolloids. 8: 287-298.

Razafindralambo, H.; Paquot, M.; Baniel, A.; Popineau, Y.; Hbid, C.; Jacques, P. and Thonart, P. (1997) "*Foaming properties of a natural cyclic lipoheptapeptide belonging to a special class of amphiphilic molecules*", Food Hydrocolloids, 11(1): 59-62.

Relkin, P. (1996) "*Thermal unfolding of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach*", Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 36(6): 565-601.

Rey, D.K. and Labuza, T.P. (1981) "*Characterization of the effect of solutes on the water-binding and gel strength properties of carrageenan*", Journal of Food Science, 46: 786-789.

Rhim, J.W.; Wu, Y.; Weller, C.L. and Schnepf, M. (1999) "Physical characteristics of a composite film of soy protein isolate and propyleneglycol alginate", *Journal of Food Science*, 64(1): 149-152.

Rodríguez Niño, M.R.; Carrera Sánchez, C. and Rodríguez Patino, J.M. (1998) "Interfacial characteristics of β -casein spread films at the air-water interface", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, p.1-13.

Rodríguez Patino, J.M.; Naranjo Delgado, M.D. and Linares Fernández, J.A. (1995) "Stability and mechanical strength of aqueous foams containing food proteins", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 99: 65-78.

Ross, S. (1943) "Foam and emulsion stabilities", *Journal of Physical Chemistry*, 47: 266-270.

Samant, S.K.; Singhal, R.S.; Kulkarni, P.R. and Rege, D.V. (1993) "Protein-polysaccharide interactions: a new approach in food formulations", *International Journal of Food Science and Technology*, 28(6): 547-562.

Sanchez, C.; Schmitt, C. ; Babak, V.G. and Hardy, J. (1997) "Rheology of whey protein isolate-xanthan mixed solutions and gels. Effect of pH and xanthan concentration", *Nahrung*, 41(6): 336-343.

Sánchez, V.; Bartholomai, G.B. and Pilosof, A.M.R. "Rheological properties of food gums as related to their water binding capacity and to soy protein interaction", *Lebensm.-Wiss. u. - Technol.*, 28(4): 380-385.

Sand, R.E. (1983) "Nomenclature and structure of carbohydrate hydrocolloids", *Food Hydrocolloids*, ed. by M. Glicksman, CRC press, Vol. I Ch.2: 19-46.

Sarker, D.K.; Bertrand, D; Chtioui, Y. and Popineau, Y. (1998) "Characterization of foam properties using image analysis", *Journal of Texture Studies*, 29: 15-42.

Sathe, S.K. (1991) "Isolation and characterization of the protein that co-purifies with soybean (*Glycine Max* L.) glycinin", *Journal of Food Biochemistry*, 15: 33-49.

Sathe, S.K.; Mason, A.C. and Weaver, C.M. (1989) "Thermal aggregation of soybean (*Glycine max* L.) sulfur-rich protein", *Journal of Food Science*, 54: 319-323, 342.

Scheludko, A. (1967) *Adv. Colloid Interface Sci.* 1: 391

Schmidt, R.H. and Padua, M.R. (1982) "Effects of heat treatment and κ -carrageenan addition on protein solubility and viscosity of milk protein/peanut flour blends in an ionic

environment simulating cow's milk", Journal of Food Processing and Preservation, 6: 243-252.

Schmitt, C.; Sanchez, C.; Desobry – Banon, S. and Hardy, J. (1998) "*Structure and technofunctional properties of protein – polysaccharide complexes: a review*", Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 38(8): 689 – 753.

Schwenke, K.D. (1996) "*Increased anionic charge: conformational and functional properties*", in Surface activity of proteins. Chemical and physicochemical modifications ed. by Magdassi, S., Marcel Dekker, ch.3: 61-90.

Schwenke, K.D.; Mothes, R.; Zirwer, D.; Gueguen, J. and Subirade, M. (1993) "*Modification of the structure of 11S globulins from plant seeds by succinylation*", in Food proteins, structure and functionality ed. by Schwenke, K.D. and Mothes, R. VCH 143-153.

Semenova, M.G. (1996) "*Factors determining the character of biopolymer-biopolymer interactions in multicomponent aqueous solutions modeling food systems*", in *Macromolecular interactions in food technology*, ed. by N. Parris; A. Kato; L.K. Creamer & J. Pearce, Washington, DC: ACS Symposium, Series 650, American Chemical Society, p. 37-49.

Semenova, M.G.; Belyakova, L.E.; Antipova, A.S. and Jubanova, M.A. (1999) "*Influence of maltodextrins with different dextrose equivalent on the thermodynamic properties of legumin in a bulk and at the air-water interface*", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 12: 287-297.

Shih, F.F. (1991) "*Effect of anions on the deamidation of soy protein*", Journal of Food Science, 56 (2): 452-454.

Shih, F.F. (1994) "*Interaction of soy isolate with polysaccharide and its effect on film properties*", Journal of the American Chemists' Society, 71(11): 1281 – 1285.

Shih, F.F. (1998) "*Film – forming properties and edible films of plant proteins*" *Nahrung – Food* 42 (3-4): 254-256.

Shih, F.F. and Campbell, N.F. (1993) "*Enzymic modification of soy proteins to improve their functional properties for food use*" ACS Symp. Ser., 528 (Food Flavor and Safety), 181-191.

Sokal, R. and Rohlf, F.J. (1969) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research, ed. by W.H. Freeman and Co.

- Sorgentini, D.A.; Wagner, J.R. and Añón, M.C. (1995) "*Effects of thermal treatment of soy protein isolates on the characteristics and structure-function relationship of soluble and insoluble fractions*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2471-2479.
- Speers, R.A. and Tung, M.A. (1986) "*Concentration and temperature dependence of flow behaviour of xanthan gum dispersions*", *Journal of Food Science*, 51(1): 96-103.
- Stainsby, G. (1980) "*Proteinaceous gelling systems and their complexes with polysaccharides*", *Food Chemistry*, 6: 3.
- Staub, H.W. and Ali, R. (1983) "*Nutritional and physiological values of gums*", *Food Hydrocolloids*, Ed. M. Glicksman, CRC press, Vol. I Ch. 4, 101-121.
- Subirade, M.; Kelly, I.; Guéguen, J. and Pézolet, M. (1998) "*Molecular basis of film formation from a soybean protein: comparison between the conformation of glycinin in aqueous solution and in films*", *International Journal of Biological Macromolecules*, 23: 241-249.
- Symers, K.C., (1980) "*The relationship between the covalent structure of the xanthomonas polysaccharide (xanthan) and its function as a thickening, suspending and gelling agent*", *Food Chemistry* 6: 63-76.
- Syrbe, A.; Fernandes, P.B.; Dannenberg, F.; Bauer, W. and Klostermeyer, H. (1995) "*Whey protein + polysaccharide mixtures: polymer incompatibility and its application*", in *Food colloids and macromolecules*, ed. by E. Dickinson & D. Lorient, Cambridge, UK, The Royal Society of Chemistry, p. 328-339.
- Tako, M. and Nakamura, S. (1984) "*Rheological properties of deacetylated xanthan in aqueous media*", *Agricultural and Biological Chemistry*, 48(12): 2987-2993.
- Tanaka, M. and Fukuda, H. (1976) "*Studies on the texture of salad dressings containing xanthan gum*", *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment.*, 9(3): 130-134.
- Thanh, V.H. and Shibasaki, K. (1976a) "*Major proteins of soybean seeds: a straightforward fractionation and their characterization*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24: 1117-1121.
- Thanh, V.H. and Shibasaki, K. (1976b) "*Heterogeneity of β -conglycinin*", *Biochim. Biophys. Acta*, 439: 326-338.
- Thanh, V.H. and Shibasaki, K., (1978) "*Major proteins of soybean seeds. Subunit structure of β -conglycinin*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26: 692-695.

Thanh, V.H. and Shibasaki, K. (1979) "*Major proteins of soybean seeds. Reversible and irreversible dissociation of β -conglycinin*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27: 805-809.

Thomas, W.R. (1992) "*Carrageenan*", in Thickening and Gelling Agents for Food. Ed. by A. Imeson, Blackie Academic & Professional, London, Ch.2.

Tolstoguzov, V.B. (1986) "*Functional properties of proteins – polysaccharides mixtures*", in Functional properties of food macromolecules, ed. by Mitchell, J.R. and Ledward, D.A., Elsevier applied science publishers, London, 385

Tolstoguzov, V.B. (1993) "*Thermodynamic incompatibility of food macromolecules*", in Food colloids and polymers: stability and mechanical properties, ed. By Dickinson, E. and Walstra, P., The Royal Society of Chemistry, 94-102.

Tolstoguzov, V.B. (1995) "*Some physico-chemical aspects of protein processing in foods. Multicomponent gels*", *Food Hydrocolloids*, 9(4): 317-332.

Tolstoguzov, V.B. (1997) "*Protein – Polysaccharide Interactions*", in Food Proteins and their Applications, ed. By Damodaran, S. and Paraf, A.; Marcel Dekker, Inc., New York, p. 171 – 198.

Tömösközi, Sándor and Pungor, Andrea (1993) "*A modified conductometric method for the measuring of foaming properties of protein concentrates and isolates*", Food proteins. Structure and Functionality, ed. by K.D. Schwenke and R. Mothes. VCH, Germany, pág. 316 - 319.

Toprakcioglu, C. (1994) "*Surface force measurements*", in Physical techniques for the study of food biopolymers, ed. by Ross-Murphy, S.B., Chapman & Hill, Ch.8: 393-440.

Torikata, Y.; Kato, M.; Kumagai, H. and Yano, T. 1991. "*Estimation of Foam Stability by Parameters in the Capillary Model*", *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(5): 1307-1312.

Tornberg, E. (1978) "*The interfacial behaviour of three food proteins studied by the drop volume technique*", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29: 762-776.

Tornberg, E. (1979) "*The adsorption behaviour of proteins at an interface as related to their emulsifying properties*", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(6): 105-123.

Townsend, A.A. and Nakai, S. (1983) "*Relationships between hydrophobicity and foaming characteristics of food proteins*", *Journal of Food Science*, 588-594.

Tsekov, R. (1999) "*Drainage of foams films*", in *Foams and Emulsions*, ed. by J.F. Sadoc & N. Rivier, Netherlands, Kluwer Academic Publishers, p. 83-90.

Tziboula, A. and Horne, D.S. (1998a) "*Influence of milk proteins on the gel transition temperature and mechanical properties of weak κ -carrageenan gels*", Gums and stabilisers for the food industry 9, ed. by Williams, P.A. and Phillips, G.O., The Royal society of Chemistry, UK, 202-211.

Tziboula, A. and Horne, D.S. (1998b) "*Influence of whey protein denaturation on κ -carrageenan gelation*", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1-10.

Urlacher, B. and Dalbe, B. (1992) "*Xanthan Gum*", in Thickening and Gelling Agents for Food, ed. by A. Imeson, Blackie Academic & Professional, London, Ch.9

Utsumi, S. and Kinsella, J.E. (1984b) "*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: 1278-1282.

Utsumi, S. Damodaran, S. and Kinsella, J.E. (1984a) "*Heat-induced interactions between soybean proteins: preferential association of 11S basic subunits and β -subunits of 7S*", *J. Agric. Food Chem.*, 32: 1406-1412.

Utsumi, S. J.E. Kinsella. J.E. (1985) "*Structure – function relationships in food proteins: subunit interactions in heat – induced gelation of 7S, 11S and soy isolate proteins*", *J. Agric. Food Chem.* 33: 297-303.

Utsumi, S.; Matsumura, Y. And Mori, T. (1997) "*Structure – Function relationships of soy proteins* ", Food proteins and their applications, ed. by Damodaran, S. and Paraf, A., Marcel Dekker, Ch.9: 257-292.

Vani, B. and Zayas, J.F. (1995) "*Foaming properties of selected plant and animal proteins*", *Journal of Food Science*, 60(5): 1025-1028.

Wagner, J.R. (1994) curso "*Funcionalidad y Tecnología de las Proteínas de Soja*", Dpto. de Industrias, F.C.E.y N. - U.B.A.

Wagner, J.R. (2000) "*Propiedades superficiales*", en Caracterización funcional y estructural de proteínas, ed. por A.M.R. Pilosof y G.B. Bartholomai, cap. 3: 41-74.

Wagner, J.R. and Añón, M.C. (1990) "*Influence of denaturation, hydrophobicity and sulfhydryl content on solubility and water absorbing capacity of soy protein isolates*", *Journal of Food Science*, 55(3): 765-770.

- Wagner, J.R. and Guéguen, J. (1995) "Effects of dissociation, deamidation and reducing treatment on structural and surface active properties of soy glycinin", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 1993-2000.
- Wagner, J.R. and Guéguen, J. (1999a) "Surface functional properties of native, acid-treated, and reduced soy glycinin. 1. Foaming properties", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(6): 2173-2180.
- Wagner, J.R. and Guéguen, J. (1999b) "Surface functional properties of native, acid-treated, and reduced soy glycinin. 2. Emulsifying properties", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(6): 2181-2187.
- Wagner, J.R.; Sorgentini, D.A. and Añón, M.C. (1996) "Thermal and electrophoretic behaviour, hydrophobicity, and some functional properties of acid-treated soy isolates", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(7): 1881-1889.
- Walstra, P. (1988) "Overview of emulsion and foam stability", in Food Emulsions and foams, ed. by E. Dickinson, 242-257.
- Walstra, P. (1989) "Principles of foam formation and stability", Foams : Physics, chemistry and structure, ed. by A.J.Wilson, Basel: Springer-Verlag, Ch.1: 1-15.
- Walter, R.H. and Talomie, T.G. (1990) "Quantitative definition of polysaccharide hydrophilicity", *Food Hydrocolloids*, 4(3): 197-203.
- Walton, A.G. and Maenpa, F.C. (1979) "Application of fluorescence spectroscopy to the study of proteins at interfaces", *Journal of Colloid and Interface Science*, 72(2): 265-277.
- Wang, C.H. and Damodaran, S. (1990) "Thermal gelation of globular proteins: weight - average molecular weight dependence on gel strength", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(5): 1157-1164.
- Wang, J.C. and Kinsella, J.F. (1976) "Functional properties of alfalfa leaf protein: foaming", *J. Food Sci.* 41: 498-501.
- Waniska, R.D. and Kinsella, J.E. (1979) "Foaming properties of proteins: evaluation of a foaming column aeration apparatus using ovalbumin", *Journal of Food Science*, 44, 1398-1401.
- Ward-Smith, R.S., Hey, M.J. and Mitchell, J.R. (1994) "Protein-polysaccharide interactions at the oil-water interface", *Food Hydrocolloids*, 3-4: 309-315.

Were, L.; Hettiarachchy, N.S. and Kalapathy, U. (1997) "*Modified soy proteins with improved foaming and water hydration properties*", *Journal of Food Science*, 62(4): 821-850.

Whistler, R.L.; Daniel, J.R. (1993) "*Carbohidratos*", *Química de los Alimentos*, ed. por Fennema, Ed. Acribia, Zaragoza, España, cap. 3.

Wilde, P.J. and Clark, D.C. (1996) "*Foam formation and stability*", in *Methods of testing protein functionality*, ed. by G.M. Hall, Blakie Academic & Professional, ch.5: 110-148.

Wilson, A.J. (1989) "*Cryo - microscopical methods for the investigation of foam structure*", in *Foams : Physics, chemistry and structure*, ed. by WILSON, A.J., Basel: Springer-Verlag, Ch.6: 69-88.

Wolf, W. J. (1970) "*Soybean proteins: Their functional, chemical and physical properties*", *J. Agric. Food Chem.*, 18(6): 969-976.

Wolf, W. J. (1972) "*Purification and properties of the proteins*" in *Soybeans: Chemistry and Technology*, ed. by Smith, A.K. and Circle, Ch.4 : 93-143.

Wolf, W.J. (1993) "*Sulfhydryl content of glycinin: effect of reducing agents*", *J. Agric. Food Chem.* 41: 168-176.

Wright, D.J. (1982) "*Application of scanning calorimetry to the study of protein behaviour in foods*", in *Developments in food proteins 1*, ed. by Hudson, B.J.F. Ch.2 : 76.

Wright, D.J. and Hemmant, W. (1987) "*Foaming of protein solutions: Comparison of large-scale whipping and conductimetric methods*", *J. Sci. Food Agric.* 41: 361 - 371.

Wüstneck, R.; Krägel, J.; Miller, R.; Fainerman, V.B.; Wilde, P.J.; Sarker, D.K. and Clark, D.C. (1996) "*Dynamic surface tension and adsorption properties of β -casein and β -lactoglobulin*", *Food Hydrocolloids*, 10(4): 395-405.

Xie, Y.R. and Hettiarachchy, N.S. (1997) "*Xanthan gum effects on solubility and emulsification properties of soy protein isolate*", *Journal of Food Science*, 62(6): 1101-1104.

Xie, Y.R. and Hettiarachchy, N.S. (1998) "*Effect of xanthan gum on enhancing the foaming properties of soy protein isolate*", *JAOCS*, 75(6): 729-732.

Xu, S. and Damodaran, S. (1993) "*Comparative adsorption of native and denatured egg-white, human, and T₄ phage lysozymes at the air-water interface*", Journal of Colloid and Interface Science, 159: 124-133.

Yamagishi, T.; Ebina F. and Yamauchi, F. (1982) "*Analysis of the state of aromatic amino acid residues in heated soybean 7S globulin by absorption derivative spectrophotometry and spectrofluorimetry*", Agricultural and Biological Chemistry, 46(10): 2441-2448.

Yamagishi, T.; Miyakawa, A.; Noda, N. and Yamauchi, F. (1983) "*Isolation and electrophoretic analysis of heat - induced products of mixed soybean 7S and 11S globulins*", Agricultural and Biological Chemistry, 47(6): 1229-1237.

Yamagishi, T.; Yamauchi, F. and Shibasaki, K. (1980) "*Isolation and partial characterization of heat-denatured products of soybean 11S globulin and their analysis by electrophoresis*", Agricultural and Biological Chemistry, 44(7): 1575-1582.

Yamagishi, T.; Yamauchi, F. and Shibasaki, K. (1981a) "*State of aromatic amino acid residues in soybean 11S globulin heated in the presence of N-ethylmaleimide by derivative spectrophotometry*", Agricultural and Biological Chemistry, 45(2): 459-467.

Yamagishi, T.; Yamauchi, F. and Shibasaki, K. (1981b) "*Electrophoretic and differential thermal analysis of soybean 11S globulin heated in the presence of N-ethylmaleimide*", Agricultural and Biological Chemistry, 45(7): 1661-1668.

Yamauchi, F.; Sato, M.; Sato, W., Katamata, Y. and Shibasaki, K. (1981) "*Isolation and purification of a new type of β -conglycinin in soybean globulins*", Agric. Biol. Chem. 45: 2863

Yamauchi, F.; Yamagishi, T. And Iwabuchi, S. (1991) "*Molecular understanding of heat-induced phenomena of soybean protein*", Food Reviews International, 7(3): 283-322.

Yao, J.J.; Tanteeratarm, K. and Wei, L.S. (1990) "*Effects of maturation and storage on solubility, emulsion stability and gelation properties of isolated soy proteins*", Journal of the American Oil Chemists' Society, 67 (12): 974-979. Journal of the American Oil Chemists' Society, 68 (2): 102-105.

Yao, J.J.; Wei, L.S. and Steinberg, M.P. (1988) "*Water-imbibing capacity and rheological properties of isolated soy proteins*" Journal of Food Science, 53: 464-467.

Yilmazer, G.; Carrillo, A. R. and Kokini, J. L. (1991) "*Effect of propylene glycol alginate and xanthan gum on stability of O/W emulsions*", Journal of Food Science, 56(2): 513-517.

Yu, Myeong-Ae and Damodaran, Srinivasan (1991a) "*Kinetics of protein foam destabilization: Evaluation of a method using bovine serum albumin*", J. Agric. Food Chem. 39: 1555-1562

Yu, Myeong-Ae and Damodaran, Srinivasan (1991b) "*Kinetics of destabilization of soy protein foams*", J. Agric. Food Chem., 39: 1563-1567 .

Zasyarkin, D.V.; Dumay, E. and Cheftel, J.-C. (1996), "*Pressure and heat induced gelation of mixed β -lactoglobulin / xanthan solutions*", Food Hydrocolloids, 10: 203-211.

Zhu, H. and Damodaran, S. (1994) "*Heat-induced conformational changes in whey protein isolate and its relation to foaming properties*", Journal of Agricultural & Food Chemistry, 42(4): 846-855.