

Tesis de Posgrado

Interacciones entre β -lactoglobulina y polisacáridos en coloides alimentarios

Baeza, Rosa Isabel

Tesis presentada para obtener el grado de 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:

Baeza, Rosa Isabel. (). Interacciones entre β -lactoglobulina y polisacáridos en coloides alimentarios. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3665_Baeza.pdf

Cita tipo Chicago:

Baeza, Rosa Isabel. "Interacciones entre β -lactoglobulina y polisacáridos en coloides alimentarios". Tesis de . Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. . http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3665_Baeza.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**INTERACCIONES ENTRE β -LACTOGLOBULINA
Y POLISACÁRIDOS EN COLOIDES ALIMENTARIOS**

Rosa Isabel Baeza

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
Departamento de Industrias

3665

Buenos Aires
2003

**INTERACCIONES ENTRE β -LACTOGLOBULINA
Y POLISACÁRIDOS EN COLOIDES ALIMENTARIOS**

Tesis para optar al título de Dr. de la Universidad de Buenos Aires

Autor: Ing. Rosa Isabel Baeza
Director: Dra. Ana Maria R. Pilosof

Buenos Aires
2003

Agradecimientos

A la Dra. Ana M. Pilosof, por dirigirme en la realización del doctorado, por su constante apoyo, afecto y preocupación en la formación científica y en brindar las mejores condiciones de trabajo a su grupo de investigación

Al CONICET por haberme otorgado las becas que hicieron posible la realización de este trabajo.

A la Universidad de Buenos Aires, por brindar el espacio físico en donde día a día realizamos las investigaciones y por la formación académica que me brindó durante la carrera de grado y a través de la docencia que llevo a cabo .

A Diego, por ser mi compañero constante, por quererme y haberme ayudado con mucha paciencia en la realización de gráficos y pósters y en los “problemas” de las computadoras.

A Mati, porque nos iluminó la vida con su llegada, y porque motiva nuestros proyectos y planes a futuro.

A toda mi familia, porque durante estos años me brindaron apoyo constante para la realización de la tesis.

A Marisa y Delia, por brindarme un gran cariño y por su inmensa ayuda en el cuidado de Mati .

A todos mis compañeros de laboratorio (también el de Pilar y Micro) con quienes durante estos años compartimos mediciones, cumpleaños, almuerzos, despedidas. A quienes siguen compartiendo el trabajo cotidiano en el laboratorio, y los que están más lejos pero que por sus valiosos consejos y su afecto seguirán siempre presentes en nuestro recuerdo.

En especial a Oscar y Carolina, por ser excelentes amigos, y estar siempre presentes más allá de las distancias o las licencias. A Dina, por haberme enseñado tantas cosas, a nivel científico y humano, y porque nuestra amistad sigue vigente a pesar de las distancias. A todos mis otros compañeros, quienes hicieron agradable el trabajo cotidiano en el laboratorio: Victoria, Paulita, Florencia, Luis, Nuria, Luciana.

A Marcelo, por ser mi eterno amigo y a Mariana, con quien sigo compartiendo vivencias y me cuenta sus viajes por el mundo.

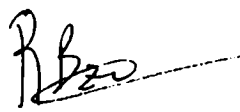
Al Dr. Luis Guglitta y la gente del INTEC, por haberme recibido cordialmente en su laboratorio y permitido el uso del "Light scattering", que fue indispensable para la obtención de valiosos resultados.

Al Dr. Rodríguez Patino, por haberme permitido la realización de los estudios de interfase con la Balanza Wilhelmy y el tensiómetro de gota, y por su colaboración en el análisis de los resultados. A los integrantes del grupo de interfaces y a todos los del departamento de Ing. Química, de quienes guardo gratos recuerdos de mi estancia en Sevilla.

A Cecilio Carrera Sánchez, por su amistad e invaluable ayuda durante mi estancia en Sevilla en el uso de los equipos.

A los profesores y docentes del Departamento de Industrias, con quienes comparto mis actividades docentes y que colaboraron de alguna forma en mi formación académica.

Y a todos los que me quieren y me ayudaron de alguna forma en la realización del doctorado !!



28/11/2003

Resumen

Se estudió el efecto de diferentes polisacáridos en las propiedades de gelificación y espumado de la β -lg en condiciones de limitada compatibilidad termodinámica ($\text{pH} > \text{pI}$). En presencia de polisacáridos no gelificantes (λ -C, XAN y PGA) se observó una disminución en la concentración mínima de proteína necesaria para gelificar y una modificación en la dinámica de gelificación (tiempo de gelificación y velocidad de desarrollo del gel). La presencia de polisacáridos afectó principalmente la etapa de agregación de la proteína, limitante del proceso de gelificación, obteniéndose en presencia de los PS grandes agregados que permitieron la formación de un gel. Se observó en general un aumento en la estabilidad térmica de los sistemas mixtos β -lg/PS (6%/0,5%) en relación a la β -lg sola. Esto se manifestó en un aumento de las temperaturas de inicio de desnaturalización y del cambio de entalpía total. Las propiedades de los geles mixtos fueron muy diferentes de acuerdo al polisacárido utilizado. En los geles mixtos β -lg/PGA se observó la mayor variación en las propiedades micro y macroestructurales con el pH, T, concentración de sólidos totales y relación PS/proteína.

Las propiedades de las interfases y espumas en sistemas mixtos estarían controladas por la proteína, debido a su mayor actividad interfacial. El efecto de los polisacáridos en las propiedades interfaciales de una proteína es complejo debido a la existencia de por lo menos tres fenómenos: (a) Incompatibilidad entre los biopolímeros (b) fenómenos competitivos o cooperativos (c) interacciones específicas de complejamiento a través de ciertas regiones de la molécula del PS y de la proteína. Al estudiar el efecto de los polisacáridos en monocapas esparcidas de β -lg se observó en general un aumento de la presión superficial y una disminución de la elasticidad y módulo dilatacional elástico. El Manucol ester mostró una mayor actividad superficial que los otros PGA (K-0 y K-LVF) dado que produjo el mayor aumento de la presión superficial. En los estudios de adsorción dinámica (tensiómetro de gota) se observó que el Manucol ester debido a su mayor adsorción entre los PGA es el que produce películas con menor estructuración. Esto se observó en los ensayos dinámicos (G'_{max} más bajo), como en los estudios de monocapas esparcidas donde el Manucol dió los menores valores de módulo dilatacional elástico y de elasticidad.

En presencia de la goma xántica los resultados muestran que aún sin penetrar en la interfase, este polisacárido tiene una enorme influencia en la misma, derivada principalmente de un posible complejamiento sobre la proteína en la monocapa y de fenómenos de limitada incompatibilidad tanto en el seno de la solución como en la interfase. Las características reológicas de la película interfacial tienen una profunda influencia en la estabilidad de las espumas

Abstract

In the present work, the effect of polysaccharides on the properties of β -lg gels and foams was studied in conditions of limited thermodynamic compatibility ($\text{pH} > \text{pI}$).

In the presence of non-gelling polysaccharides (λ -C, XAN and PGA) it was observed a decrease in the critical concentrations for β -lg gelation and a modification in the dynamic of protein gelation (gel time, rate of development of the gel structure). The presence of polysaccharides greatly affected the aggregation of β -lg, that constituted the limiting step in the rate of gelation process. In the presence of PS large aggregates were formed during heat treatment, that allowed gel formation at low β -lg concentration. In general, the presence of PS increased the thermal stability of β -lg, as we observed an increase in the onset temperature and enthalpy change of the denaturation process in the mixed systems. The properties of mixed gels were totally different according to the polysaccharide present in the mixed gel. In the presence of PGA it were observed the greatest variations in macro and microstructural properties of gels with pH, T, solids content and PS/ β -lg ratio.

The properties of β -lg interfaces and foams would be controlled by protein, due to its highest surface activity. The effect of polysaccharide on β -lg interfacial properties is complex due to the existence of the following phenomena: (a) incompatibility between biopolymers, (b) cooperative or competitive adsorption (c) complexation through specific interactions between polar regions on the protein and polysaccharide molecules. In the study of spread monolayers, it was observed an increase in surface pressure and a decrease in elastic dilatational modulus and elasticity. MAN showed the highest increase in surface elasticity, as a consequence of its high surface activity. In the dynamic adsorption experiments (drop tensiometer) MAN was the polysaccharide that produced the less structured films in the presence of β -lg due to its higher adsorption at the interface in comparison with K-0 and K-LVF. This was manifested by low G'_{max} and the lowest G' and elasticity obtained in spread monolayers.

The presence of XAN produced a large effect in the film properties, even without presenting surface activity by itself. This effect would be due to complexation with protein adsorbed at the interface and limited incompatibility in the bulk solution and in the interface. Rheological characteristics of the film have a large influence on foam stability.

INDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Propiedades funcionales de proteínas y polisacáridos	1
2. Proteínas del lactosuero	4
2.1 Composición y utilización	4
2.2 Características estructurales, conformación y propiedades físico-químicas de la β -lactoglobulina.....	8
2.2.1 Estructura primaria de la β -lactoglobulina.....	9
2.2.2 Estructura secundaria de la β -lg.....	9
2.2.3 Conformación de la β -lactoglobulina.....	9
2.2.4 Asociación entre moléculas de β -lg.....	11
3. Características de los polisacáridos	11
3.1 Goma guar.....	11
3.2 Alginato de propilenglicol (PGA).....	12
3.3 Carragenanos.....	12
3.4 Goma xántica.....	13
4. Interacciones proteína-polisacáridos	14
4.1 Principios básicos.....	15
4.2 Algunas consideraciones teóricas en el comportamiento de mezclas proteína/polisacárido.....	16
4.2.1 Entropía combinatorial de mezclado (ΔS_M).....	17
4.2.2 Contribución interaccional (ΔH_M).....	17
4.2.3 Efecto de volumen libre.....	18
4.3 Fenómeno de coacervación compleja.....	18
4.3.1 Factores que afectan la formación y características de los complejos.....	19
Relación entre composición, estructura y propiedades.....	19
Efecto de condiciones de no-equilibrio.....	20
Efecto de la densidad de carga de los biopolímeros y del peso molecular.....	20
4.3.2 Aplicaciones industriales de los complejos.....	20
Purificación de macromoléculas.....	20
Utilización en microencapsulación.....	21
Ingredientes de alimentos y biomateriales.....	21
4.4 Incompatibilidad termodinámica.....	21
4.4.1 Diagramas de fase.....	22

PRIMERA PARTE: Interacciones entre β -lactoglobulina y polisacáridos en sistemas gelificados

I.1 INTRODUCCIÓN	25
I.1.1 Mecanismo de gelificación de proteínas globulares	25
I.1.2. Comportamiento térmico de la β-lactoglobulina	29
I.1.2.1. Características generales.....	29
I.1.2.2. Parámetros calorimétricos.....	30
I.1.2.3. Cinética del proceso de desnaturalización térmica de la β -lg.....	31
I.1.3. Gelificación de la β-lactoglobulina	31
I.1.3.1 Mecanismo de gelificación.....	31

1.1.3.2 Factores que afectan la gelificación de la β -lactoglobulina.....	34
<i>Efecto de la variedad genética.....</i>	34
<i>Efecto de la concentración de proteína.....</i>	35
<i>Efecto del pH.....</i>	35
<i>Velocidad y temperatura de calentamiento.....</i>	37
<i>Presencia de sales y otros solutos.....</i>	37
1.1.4. Gelificación de sistemas mixtos β-lg/polisacáridos.....	38
1.1.4.1 Formación de geles mixtos en condiciones de incompatibilidad.....	38
1.1.4.2 Geles mixtos de WPI o β -lg y polisacáridos.....	40
1.2 OBJETIVOS.....	43
1.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
1.3.1 Materiales.....	44
1.3.2. Preparación de soluciones de proteína y polisacáridos.....	44
Obtención de los sistemas de deshidratados.....	45
1.3.3. Métodos.....	45
1.3.3.1 Calorimetría diferencial de barrido.....	45
<i>Parámetros calorimétricos.....</i>	46
<i>Parámetros cinéticos.....</i>	46
1.3.3.2 Electroforesis.....	47
1.3.3.3 Dispersión dinámica de luz (DLS).....	48
1.3.3.4 Determinación de la viscosidad de soluciones.....	49
1.3.3.5 Reometría dinámica.....	49
<i>Determinación del punto gel y evolución de parámetros viscoelásticos.....</i>	50
<i>Dependencia de los parámetros con la frecuencia de oscilación.....</i>	51
1.3.3.6 Ensayo de “tilting”.....	51
1.3.3.7 Formación de geles.....	52
1.3.3.8 Ensayos de grandes deformaciones: Textura y viscoelasticidad.....	52
<i>Textura.....</i>	52
<i>Viscoelasticidad.....</i>	54
1.3.3.9 Pérdida de agua.....	55
1.3.3.10 Microscopía electrónica de transmisión y barrido.....	55
<i>Microscopía electrónica de barrido.....</i>	56
<i>Microscopía electrónica de transmisión.....</i>	57
1.4 RESULTADOS	
1.4.1 PRIMERA SECCIÓN: Estabilidad térmica de β-lg en presencia de polisacáridos.....	58
1.4.1.1 Parámetros calorimétricos.....	58
1.4.1.2 Parámetros cinéticos.....	69
1.4.2 SEGUNDA SECCIÓN: Estudio de la gelificación de β-lg + polisacáridos.....	72
1.4.2.1 Ensayos preliminares.....	72
1.4.2.2 Caracterización de la gelificación por el ensayo de “tilting”.....	73
1.4.2.3 Caracterización de la gelificación por reometría dinámica.....	75
1.4.2.3.1 Caracterización dinámica de la gelificación.....	75
1.4.2.3.2 Cinética de gelificación.....	80
1.4.2.3.3 Evolución de la viscoelasticidad durante la gelificación.....	81
1.4.2.4 Caracterización de viscoelasticidad, textura y retención de agua.....	84

1.4.2.4.1 Barrido de frecuencia.....	83
1.4.2.4.2 Textura y pérdida de agua de los geles.....	87
I.4.2.5 Microestructura de los geles.....	90
I.4.2.6 Efecto de los polisacáridos en geles con mayores porcentajes de proteína.....	95
I.4.2.7 Discusión: Factores intrínsecos de los polisacáridos que afectan su comportamiento en los sistemas mixtos.....	97
 I.4.3 TERCERA SECCIÓN : Efecto combinado de variables que afectan las características de geles mixtos de β-lg + PGA.....	 101
I.4.3.1 Estudios por DLS del efecto del PGA en la agregación de β-lg.....	101
1.4.3.1.1 Efecto del pH	101
1.4.3.1.2 Efecto de la concentración de proteína y PGA.....	104
I.4.3.2 Estudio del efecto combinado de relación β-lg/PGA, pH y sólidos totales en las características de geles mixtos mediante la metodología de superficies de respuesta.....	109
 I.4.4 CUARTA SECCIÓN : Estudio del rol del PGA en la gelificación térmica de la β-lactoglobulina.....	 118
I.4.4.1 Cinética de gelificación de geles mixtos β-lg + PGA	118
I.4.4.2 Cinética de desnaturalización	121
I.4.4.3 Cinética de agregación.....	123
I.4.4.4 Análisis de las energías de activación.....	128
I.4.4.5 Propiedades de los geles.....	129
 I.5 CONCLUSIONES.....	 135
 SEGUNDA PARTE: Interacciones entre β-lactoglobulina y polisacáridos en interfases y espumas	
 II.1 INTRODUCCIÓN.....	 137
II.1.1 Propiedades interfaciales de proteínas.....	137
II.1.1.1 Propiedades moleculares de proteínas que afectan sus propiedades interfaciales.....	137
II.1.1.2 Termodinámica de adsorción de proteínas.....	138
II.1.1.3 Cinética de adsorción de las proteínas en la interfase.....	139
II.1.1.4 Caracterización de las monocapas.....	142
II.1.1.4.1 Tipos de monocapas.....	142
II.1.1.4.2 Estructura molecular de las monocapas.....	143
II.1.1.4.3 Propiedades viscoelásticas.....	145
II.1.2. Espumas estabilizadas por proteínas.....	146
II.1.2.1 Estructura de espumas.....	147
II.1.2.2 Formación de espumas.....	148
II.1.2.3 Estabilidad de las espumas.....	148
II.1.2.4 Procesos de desestabilización.....	149
Cremado.....	150
Drenaje de líquido.....	150
Desproporción o maduración de Ostwald.....	151
Colapso.....	151

II.1.3 Interacciones proteína-polisacáridos en interfases y espumas.....	152
II.2 OBJETIVOS.....	156
II.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	157
II.3.1. Materiales.....	157
II.3.2 Preparación de las soluciones de proteína y polisacáridos.....	158
II.3.3 Métodos.....	158
II.3.3.1 Balanza de superficie tipo Wilhelmy.....	159
II.3.3.1.1 Principio de funcionamiento.....	159
II.3.3.1.2 Descripción del equipo.....	160
II.3.3.1.3 Procedimiento experimental.....	161
Obtención de las isothermas.....	162
Elasticidad de la película.....	163
Obtención de parámetros reológicos dilatacionales.....	163
II.3.3.1.4 Limpieza del equipo.....	167
II.3.3.2 Tensiómetro de gota.....	167
II.3.3.2.1 Principio de funcionamiento.....	167
II.3.3.2.2. Descripción del equipo.....	168
II.3.3.2.3 Procedimiento experimental.....	168
II.3.3.2.4 Limpieza del equipo.....	170
II.3.3.3 Determinación de la viscosidad de las soluciones y comportamiento reológico.....	170
II.3.3.4 Propiedades de espumas de β -lg y β -lg/PS formadas por el método de batido.....	170
II.3.3.4.1 Capacidad de espumado.....	170
II.3.3.4.2 Método para la determinación simultánea de velocidades de drenado, desproporción y colapso.....	171
II.3.3.5 Propiedades de espumado de polisacáridos.....	174
II.4 RESULTADOS	
II.4.1 PRIMERA SECCION: Efecto de los polisacáridos en monocapas de β -lactoglobulina esparcidas sobre la interfase aire-agua.....	175
II.4.1.1 Características estructurales de las monocapas	175
II.4.1.2 Características superficiales dilatacionales.....	186
II.4.1.3 Discusión.....	191
Films de β -lg esparcida en soluciones acuosas de polisacáridos sin actividad superficial.....	192
Films de β -lg esparcida sobre soluciones de polisacáridos con actividad superficial.....	193
II.4.2.SEGUNDA SECCIÓN :Propiedades interfaciales de β -lg y polisacáridos estudiadas por tensiometría de gota y su relación a las propiedades de espumado.....	196
II.4.2.1 Propiedades interfaciales de la β -lactoglobulina sola.....	196
II.4.2.1.1 Dinámica de adsorción de la β -lg en la interfase aire-agua.....	196
II.4.2.1.2 Propiedades reológicas de películas de β -lg.....	197
II.4.2.2 Propiedades interfaciales y de espumado de polisacáridos solos.....	198
II.4.2.2.1 Alginato de Propilenglicol (PGA).....	198
Dinámica de adsorción de PGA en la interfase aire-agua.....	198
Propiedades reológicas de las interfases de PGA.....	202

<i>Medición de la viscosidad de las soluciones de PGA.....</i>	205
<i>Características de las espumas de PGA formadas a partir de soluciones al 0,5%.....</i>	205
II.4.2.2.2 Goma xántica y λ -carragenano.....	209
<i>Características interfaciales.....</i>	209
<i>Viscosidad de las soluciones.....</i>	211
II.4.3 TERCERA SECCIÓN: Propiedades interfaciales y de espumado de sistemas mixtos β-lg + polisacáridos estudiadas por tensiometría de gota y su relación con propiedades de espumado.....	212
II.4.3.1 Propiedades interfaciales de sistemas mixtos β-lg/polisacáridos.....	212
II.4.3.1.1 Dinámica de adsorción de sistemas mixtos de β -lg/ polisacáridos en la interfase aire-agua.....	212
II.4.3.1.2 Cinética de adsorción.....	215
II.4.3.1.3 Propiedades reológicas de las películas mixtas adsorbidas.....	218
II.4.3.1.4. Discusión.....	222
II.4.3.2. Propiedades de espumado de sistemas mixtos de β-lg y polisacáridos.....	224
II.4.3.2.1 Medición de la viscosidad de las soluciones.....	224
II.4.3.2.2 Capacidad de espumado.....	225
II.4.3.2.3 Drenado de líquido de las espumas.....	227
II.4.3.2.4 Método para la evaluación simultánea de drenado, colapso y desproporción de las espumas.....	228
<i>Viscosidad aparente de las espumas.....</i>	228
<i>Modelo cinético para describir la evolución de la viscosidad aparente con el tiempo.....</i>	230
II.4.3.2.5 Colapso de las espumas.....	231
II.4.3.2.6 Correlación entre las características de las interfases y las propiedades de las espumas en los sistemas mixtos β -lg + polisacáridos.....	234
II.5 CONCLUSIONES.....	236
REFERENCIAS.....	238

Introducción General

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. PROPIEDADES FUNCIONALES DE PROTEÍNAS Y POLISACÁRIDOS

Las proteínas y polisacáridos son biopolímeros complejos que desempeñan un rol fundamental en las características organolépticas y estructurales de los alimentos, las cuales inciden en la aceptabilidad por parte de los consumidores. Ambos son componentes muy versátiles que cumplen funciones como espesantes, gelificantes, emulsionantes y espumantes en los alimentos.

Se definen como propiedades funcionales a las propiedades físico-químicas de polisacáridos y proteínas que afectan su comportamiento en los productos alimentarios ya sea durante la preparación, el procesado, almacenamiento o consumo de los mismos, es decir; cualquier propiedad (excepto las nutricionales) que afecta su utilización (Hall, 1996).

Las proteínas son las más susceptibles a cambios en su funcionalidad de acuerdo a las condiciones del medio o procesamiento, debido a su compleja estructura molecular.

Las propiedades funcionales pueden categorizarse en tres grandes grupos (Cheftel et al., 1989b):

➤ *Propiedades de hidratación*: Son las dependientes de las interacciones de la proteína o del polisacáridos con el agua. Entre ellas se encuentran la absorción y retención de agua, dispersibilidad, solubilidad y viscosidad.

➤ *Propiedades dependientes de las interacciones intermoleculares*: precipitación, floculación y gelificación.

➤ *Propiedades superficiales*: emulsificación y espumado.

Las diferentes aplicaciones en las que pueden utilizarse las proteínas requieren de distintas propiedades funcionales o una combinación de varias para obtener las características deseadas en un determinado producto. En la **Tabla 1** se ejemplifican las propiedades funcionales de proteínas que intervienen en la formulación de alimentos (Cheftel et al., 1989b). Muchas de estas propiedades funcionales son compartidas por polisacáridos, aunque las de mayor importancia en el caso de los polisacáridos son las de retención de agua, efecto espesante y gelificante.

Tabla 1 Propiedades funcionales que intervienen en la obtención de diversos alimentos (Cheftel et al., 1989b)

Alimento	Propiedades funcionales
Bebidas	Solubilidad a pH diferentes, estabilidad al calor, viscosidad

Aderezos, salsas	Viscosidad, emulsificación, retención de agua
Productos de panadería y de pastelería (pan, bizcochuelos, tortas)	Absorción de agua, emulsificación, espumado, formación de una matriz viscoelástica, cohesión, gelificación
Productos lácteos (queso fundido, helados, postres)	Emulsificación, retención de grasa, viscosidad, espumado, gelificación, coagulación.
Reemplazantes de huevo (o clara de huevo)	Espumado, gelificación
Productos cárnicos (salchichas, hamburguesas)	Emulsificación, gelificación, cohesión, absorción y retención de agua y de grasa.
Productos similares a la carne (proteínas vegetales extrudadas)	Absorción y retención de agua y de grasa, firmeza, masticabilidad, cohesión
Recubrimientos alimenticios	Cohesión, adhesión
Productos de confitería y chocolatería (Chocolate con leche)	Dispersabilidad, emulsificación

Los factores que afectan la funcionalidad de proteínas pueden ser agrupados en aquellos relacionados a características intrínsecas de la molécula, los relacionados al procesamiento (extracción y purificación de proteínas, deshidratación, tratamientos térmicos, agitación, batido, centrifugación, etc) y los factores que afectan su aplicación (Hall, 1996).

Los factores intrínsecos están relacionados con las características estructurales de la molécula de proteína, es decir, con la clase y proporción de los diferentes aminoácidos, su secuencia y las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria que determinan el tipo y número de grupos expuestos y los ocultos dentro de la estructura interna. Dentro de las características intrínsecas de las proteínas, una de las más importantes es la hidrofobicidad superficial, ya que presenta una correlación positiva con las propiedades de interfase y de gelificación (Nakai et al., 1996).

Estos diferentes y complejos niveles de estructuración de las proteínas les confieren diferentes funciones, y la pérdida de la estructura nativa determinará una modificación en su funcionalidad (Hall, 1996).

En la **Tabla 2** se resumen los principales factores que afectan la funcionalidad. Cabe remarcar que el efecto de los factores extrínsecos en las propiedades funcionales de las proteínas es una simple manifestación de las alteraciones de la conformación de la proteína y de otras propiedades fisicoquímicas (Damodaran, 1996).

Tabla 2 Factores que afectan las propiedades funcionales de las proteínas en alimentos (Damodaran, 1996)

Intrínsecos	Factores del medio	Factores de procesamiento
Composición de las proteínas	pH	Calentamiento
Conformación de la proteína	Estado de oxido-reducción	Secado
	Sales	pH
	Agua	Fuerza iónica
	Carbohidratos	Agentes reductores
	Lípidos	Condic. de almacenamiento
	Surfactantes	Modificaciones físicas
	Aromas	Modificaciones químicas

La evaluación de la funcionalidad de una proteína o un polisacárido se realiza mediante la determinación de propiedades fisicoquímicas bien definidas como la viscosidad o tensión superficial o mediante ensayos sobre su aplicación, como son la medida de la pérdida de agua de un producto, el volumen de espuma formado a partir de una solución de proteína o el volumen de pan después de la cocción.

Las propiedades funcionales se pueden evaluar en principio en sistemas modelo que contienen a única proteína o polisacárido. A partir del conocimiento del comportamiento y propiedades de los sistemas modelo se puede avanzar hacia el estudio de sistemas más complejos, y finalmente lograr la formulación de productos que sean viables para su producción industrial.

En cuanto a la proteína utilizada en el presente trabajo, la β -lactoglobulina, es la proteína mayoritaria del suero lácteo y la que determina sus propiedades funcionales. Las proteínas del suero son ingredientes de enorme potencial en la formulación de alimentos funcionales y por ser un producto natural y de alto valor nutricional, el desarrollo de alimentos basados en este producto debe considerarse como una meta a lograr en corto tiempo.

En las secciones siguientes se describirá brevemente el proceso de obtención, características fisicoquímicas y propiedades funcionales de la β -lactoglobulina y de los polisacáridos utilizados, como base para el tratamiento posterior de los sistemas mixtos formulados en base a estos biopolímeros.

2. PROTEÍNAS DEL SUERO LÁCTEO

2.1 Composición y utilización

En una leche normal el contenido de proteínas es de 30-40 g/L, lo que representa el 95% del nitrógeno total de la leche. Alrededor del 80 % de las proteínas son caseínas que se encuentran en forma micelar y contienen hasta un 8% de constituyentes minerales. Las caseínas, por su estructura macromolecular particular son fácilmente aislables por centrifugación o precipitación isoeléctrica a pH 4,6 (Cheftel et al., 1989a). La fracción no sedimentable, denominada “proteínas solubles” o “proteínas del lactosuero” está constituida por proteínas globulares tales como la seroalbúmina bovina (BSA), la β -lactoglobulina (β -lg), la α -lactoalbúmina (α -la), inmunoglobulinas (I-g), etc.

La composición teórica del suero lácteo, es decir la solución acuosa remanente luego de remover principalmente las grasas y las micelas de caseína se muestra en la **Tabla 3**. Esta composición teórica se asemeja a la composición del suero obtenido como subproducto en la industria quesera.

Tabla 3. Composición teórica del suero y sólidos del suero (Morr et al., 1993)

Componente	Suero lácteo (g/kg)	Sólidos del suero (% p/p)
Agua	870	-
Lactosa	46	76,0
Cationes		
Calcio	0,37	0,61
Magnesio	0,08	0,12
Potasio	1,44	2,22
Sodio	0,46	0,76
Total	2,24	3,70
Aniones		
Clorhídrico	1,06	1,75
Fosfato	1,08	1,78
Sulfato	0,10	0,17
Bicarbonato	0,10	0,17
Total	2,34	3,87
Acidos Orgánicos		
Acido Cítrico	1,60	2,65
Otros	0,14	0,23
Total	1,74	2,88

Lípidos		
Neutros	0,04	0,07
Fosfolípidos	0,11	0,18
Total	0,15	0,25
Proteínas		
β -lactoglobulina	3,2	5,29
α -lactalbúmina	1,2	1,98
Seroalbúmina bovina	0,4	0,66
Inmunoglobulinas	0,75	1,25
Total	6,15	10,16

La industria quesera utiliza principalmente las caseínas y materia grasa para la elaboración de diferentes clases de quesos. La fracción que se separa contiene principalmente lactosa, sales minerales y proteínas solubles. En el suero, la fracción proteica es de aproximadamente 8 g/L y está constituida principalmente por β -lactoglobulina (50%) y por α -lactalbúmina (19%) y por otras proteínas en menor proporción como se muestra en la **Figura 1**.

Proteínas del suero

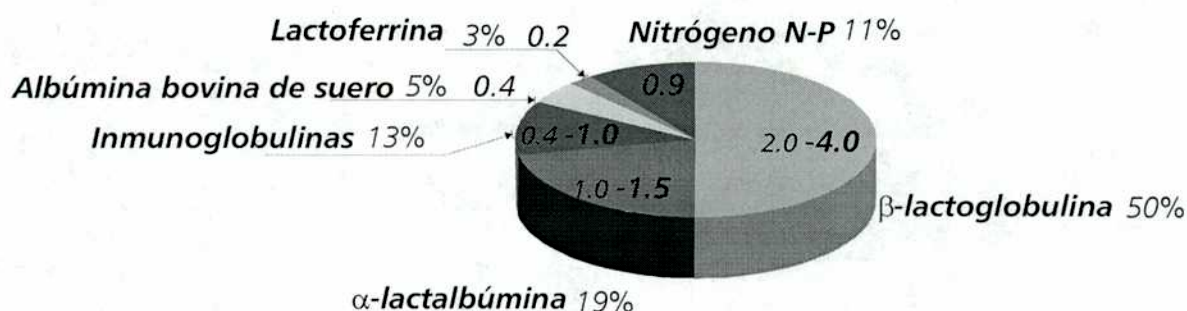


Figura 1. Fracción de sólidos del suero y porcentaje de las distintas proteínas que lo constituyen (Cayot & Lorient, 1996)

En nuestro país, las principales industrias lácteas (Mastellone Hnos, SANCOR) tienen plantas especialmente destinadas a la producción de suero en polvo, y otras utilizan la capacidad ociosa para la obtención de este producto (Molfino, Milkaut, Verónica). En cuanto a la comercialización

de este producto, considerado como una "comoditie", se han incrementado notablemente las exportaciones, acompañado de una suba gradual del volumen de este producto en el mercado.

El suero derivado de la obtención de queso, ha sido considerado como producto de descarte por mucho tiempo o como alimento para animales, principalmente ganado porcino. En alimentos se lo utiliza como suero en polvo o para la recuperación de lactosa y proteínas, y parte es tratado como efluente industrial. El tratamiento de este producto resulta antieconómico, ya que por un lado la instalación de una planta de tratamiento demanda un costo energético muy alto, y por otro, la composición del suero de quesería al poseer un alto valor de DBO (demanda biológica de oxígeno), requiere de un tratamiento más intenso comparado con otros efluentes líquidos provenientes de la misma planta elaboradora.

Los concentrados de proteínas del suero (WPC) (35-50% de proteína) se obtienen industrialmente por medio de ultrafiltración. Una concentración posterior del retentato mediante diafiltración resulta en la obtención de un concentrado con más de un 75% de proteína. El aislado de proteínas del suero (WPI) se obtiene mediante procesos de intercambio iónico (Morr y Ha, 1993). El producto resultante contiene más de un 90 % de proteína.

Los productos proteicos que pueden obtenerse a partir del suero lácteo poseen un alto valor agregado por sus características funcionales y nutricionales, que justifican el costo del proceso de recuperación de las proteínas. Generalmente, para ser utilizadas como ingredientes funcionales, se requiere que las proteínas cubran un amplio rango de propiedades funcionales. En este sentido, las proteínas de la leche (tanto caseínas como proteínas del suero) son consideradas como proteínas de "amplio rango" de funcionalidad (Hall, 1996). En la **Tabla 4** se muestran las aplicaciones de proteínas derivadas del suero en alimentos de consumo humano (Cayot y Lorient, 1996).

Tabla 4. Uso de proteínas del suero en alimentación humana.

Aplicación industrial	Propiedad funcional esperada	Proteína utilizada
Panificados	Retención de agua, dispersibilidad de grasas,	WPC ^a o WPC + caseinatos
Galletitas	estabilización de emulsiones, overrun de	WPI ^b
Cereales para desayuno	espumas, gelificación, pardeamiento,	Suero deshidratado
	realzamiento de aromas	
Pastas	Efecto de textura y ligazón, pardeamiento	WPC
Productos de confitería	Formación de emulsiones, espumado,	WPC + caseinatos hidrolizados,
Chocolates	pardeamiento, aroma, efecto antioxidante	WPC, suero
Helados	Estabilidad de emulsiones, espumado,	WPC + caseinatos y proteínas
	gelificación.	de la leche
Carne y productos cárnicos	Formación de emulsiones, retención de agua	WPC, WPI solo o en mezcla

	(textura cremosa y suave), propiedades de ligazón y adhesividad.	con caseinatos
Salsas, sopas, comidas listas para consumir	Estabilidad de emulsiones, retención de agua	WPC + caseinatos + yema de huevo, WPC + caseinatos + huevo entero
Productos lácteos (leche, yogur, mantecas ligeras)	Estabilidad de emulsiones, retención de agua, gelificación.	Caseinatos, WPC + caseinatos, WPI
Bebidas alcohólicas	Estabilización de cremas, aspecto turbio	WPC + caseinatos, WPC o WPI
Nutraceúticos	Ingestión de proteínas, función intestinal	Suero, WPC o WPI WPC hidrolizado

^aWPC: siglas inglesas de concentrado de proteínas del suero (Whey proteins concentrate)

^bWPI: siglas inglesas de aislado de proteínas del suero (% proteína > 90%) (Whey proteins isolate)

Las propiedades fisicoquímicas más importantes de las cuatro proteínas mayoritarias del lactosuero se muestran en la **Tabla 5**. Las dos proteínas más importantes desde el punto de vista de manufactura y funcionalidad son la α -lactoalbúmina (α -la) y la β -lactoglobulina (β -lg). Las proteínas del suero en su estado nativo, por su forma globular compacta, se mantienen solubles cerca del punto isoelectrico (4, 2 o 5) a temperatura ambiente.

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de las proteínas mayoritarias del lactosuero (Morr et al., 1993)

Propiedad	β -lg	α -la	BSA	I-g
Punto isoelectrico	5,2	4,2-4,5	4,7-4,9	5,5-8,3
Concentración en el suero (g/l)	2-4	0,6-1,7	0,4	0,4-1
Concentración en el las proteínas del suero (%)	56-60	18-24	6-12	6-12
Peso molecular (daltons)	18000	14000	66000	>146000
Hidrofob. promedio (Kcal/res)	1075	1020	995	NA
Residuos de aminoác. tot /mol	162	123	582	NA
Residuos apolares/mol	54	44	163	NA
Residuos Cisteína/mol	5	8	35	NA
Residuos disulfuro/mol	2	4	17	NA
Res. Sulfhidrilo/mol	1	0	1	NA
Residuos lisina/mol	15	12	59	NA
Res. Ácido glutámico/mol	16	8	59	NA
Res. Ácido aspártico/mol	10	9	39	NA

Cada una de las proteínas del suero poseen propiedades funcionales características relacionadas a su peso molecular, características fisicoquímicas, composición y secuencia de aminoácidos. Un factor muy importante al considerar la funcionalidad de estas proteínas es su abundancia en residuos de aminoácidos con grupos sulfhidrilo que permiten formar uniones covalentes intermoleculares durante el procesamiento a alta temperatura, por ejemplo en la formación de productos gelificados.

2.2 Características estructurales, conformación y propiedades fisico-químicas de la β -lactoglobulina

El polimorfismo genético es una característica de la β -lactoglobulina, pudiéndose identificar siete variantes genéticas denominadas A, B, C, D, E, F y G, siendo las que prevalecen las formas A y B (Eigel et al., 1984). Todas las variantes de la β -lactoglobulina poseen 162 residuos de aminoácidos, sin embargo cada variante puede diferir en una a tres posiciones de los residuos, causadas por mutaciones en el código genético de la proteína.

En la **Tabla 6** se muestran algunas propiedades químicas y físicas de las variantes de la β -lactoglobulina (Eigel et al., 1984).

Tabla 6. Propiedades de los polimorfismos genéticos de la β -lactoglobulina (Eigel et al., 1984)

Variante	Peso molecular del monómero	Punto isoiónico	Punto isoeléctrico	Hr* (J/res)
A	18363	5.35	5.13	4.53
B	18277	5.41	5.13	4.49
C	18286	5.39	-	4.58
D	18276	-	-	4.58
E	18205	-	-	4.49
F	18243	-	-	-
G	18223	-	-	-

*Dato de hidrofobicidad

La β -lactoglobulina ha sido aislada y purificada del suero lácteo de diferentes especies animales, tales como vaca, caballo, oveja, búfalo, cerdo, burro, ciervo, canguro y delfín y ha sido determinada la secuencia de aminoácidos de la proteína para cada especie. La β -lg parece no estar

presente o contener una concentración a nivel de trazas en la leche de primates y roedores (Phillips et al., 1994d)

2.2.1 Estructura primaria de la β -lactoglobulina

Una reciente comparación de las secuencias de aminoácidos en la familia de la β -lg ha revelado un promedio de homología en 33 aminoácidos, lo que indica que esos residuos son decisivos en la estructura y conformación de la proteína. La secuencia de aminoácidos en bovinos, ovinos, porcinos, cabra y caballo revela que el más alto grado de homología entre las proteínas ocurre en la región amino-terminal de cada molécula de proteína, siendo consistente las posiciones de las uniones disulfuro formadas entre Cys160-Cys66 y Cys119-Cys106 y un grupo tiol libre en Cys121.

A pesar de que puede obtenerse mucha información acerca de la naturaleza química de la β -lg mediante estudios de secuencias de aminoácidos homólogos lo que verdaderamente le imparte sus características biológicas y propiedades funcionales es su conformación. El estudio de la estructura y características conformacionales es fundamental para una interpretación molecular de las propiedades fisicoquímicas y la relación existente entre estructura y actividad de la proteína.

2.2.2 Estructura secundaria de la β -lg

Los primeros estudios acerca de la estructura secundaria de la β -lg fueron realizados por técnicas de discoisismo circular y espectroscopía infrarroja, los que permitieron asignar porcentajes de estructuras tipo α -hélice, plana y estructuras desordenadas en la molécula (Timasheff et al., 1966). La información actualmente existente acerca de la estructura secundaria de la β -lg describe al monómero de proteína como esférico (diámetro aprox. 36 Å) (Verheul et al., 1999) y conteniendo una región de estructura tipo α -hélice de aproximadamente 20 Å de longitud y una región de estructura plana β . Se ha reportado que la molécula contiene un 10-15% de estructura α -hélice, 43% de regiones planas β y 47% de estructura desordenada (Timasheff et al., 1966)

2.2.3 Conformación de la β -lactoglobulina

La estructura nativa de una proteína resulta de un balance de fuerzas atractivas y repulsivas entre las cadenas de polipéptidos y entre las cadenas de éstos y el solvente (Relkin, 1996). La conformación nativa de la β -lg se representa en la **Figura 2** (Phillips et al., 1994d).

En ella se muestra que la molécula esta formada por 9 cadenas planas β antiparalelas, envueltas juntas de forma tal que forman una especie de cono alisado. Las vueltas ocurren entre los residuos 44 a 47, 59 a 62, 78 a 81 y 84 a 88.

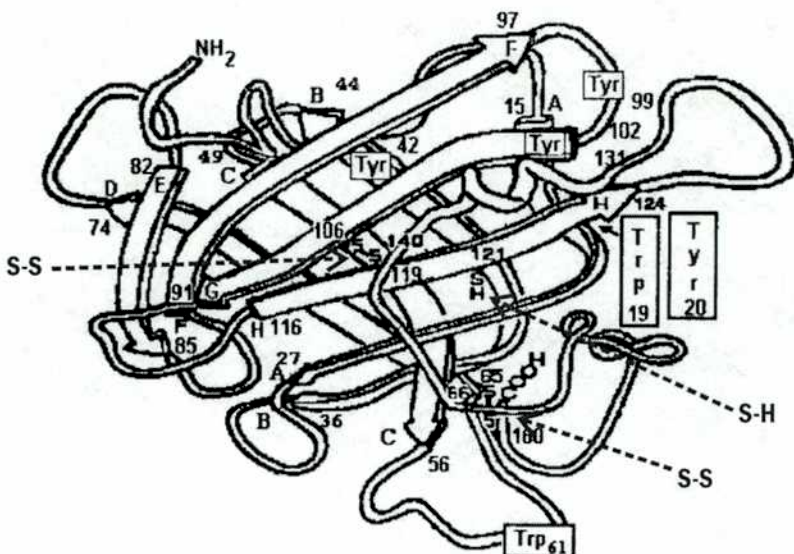


Figura 2. Estructura terciaria del monómero de β -lactoglobulina. Las flechas indican las zonas planas β , nominadas con las letras A-I. También se indica la ubicación de las uniones disulfuro y el grupo tiol libre (Phillips et al., 1994d)

La presencia simultánea de dos uniones disulfuro y de un grupo tiol libre impone una estructura espacial rígida. Sin embargo, la posición del grupo tiol libre es imprecisa, ya que parece estar repartida entre los residuos 119 y 121; sólo estaría localizado con exactitud un enlace disulfuro entre los residuos Cis 66 y Cis 160, estando el otro situado entre Cis106 y Cis 119 o bien entre Cis 106 y Cis 121. Según la conformación, el grupo tiol estaría más o menos accesible y podría participar en los intercambios de uniones disulfuro, que condicionan numerosas características y en particular la solubilidad .

El grupo tiol libre de Cis 121 está localizado en la superficie de una región plana β del monómero de β -lg y está normalmente oculto debido a la asociación de monómeros. La disociación del dímero en monómeros de β -lg a pH mayor a 7 coincide con un aumento de actividad en el grupo tiol. Por lo tanto, los reactivos que estabilizan la conformación nativa o asociada en dímeros de β -lg podrían reducir la actividad del grupo tiol libre al quedar ocultos en el interior de las moléculas asociadas.

La unión disulfuro en las posiciones 106-119 no muestra intercambio con la Cys121. La distancia entre los grupos en las posiciones 119 y 121 es de 10,5 Å y cualquier intercambio entre estos grupos llevaría a un significativo reacomodamiento de la molécula. La ubicación de la otra unión disulfuro en la posición 66-160 parece hallarse en la superficie externa uniendo la cadena D a la región terminal de la cadena C (Phillips et al, 1994d).

2.2.4 Asociación entre moléculas de β -lg

La β -lg bovina existe generalmente como dímero a 25 °C entre pH 5,0 y 7,5 (Mc Kenzie, 1971). Esta asociación entre monómeros de β -lg se debe a interacciones electrostáticas entre los residuos Asp130 y Glu134 con los residuos de lisina en la molécula vecina.

Cuando el pH se aumenta por encima de 7, ocurren cambios conformacionales caracterizados por un aumento en la reactividad del grupo carboxilo oculto, el grupo tiol libre en Cys 121 y en el residuo Tyr. A pH cercanos a 5 se produce una transición mediante la cual la proteína se asocia en octámeros, en esta forma está presente en un rango de pH de 3 a 5 aproximadamente (Relkin, 1996). Cuando el pH es menor a 3,5 la proteína se encuentra principalmente como monómeros en solución. La asociación que se da entre las moléculas de proteína en diferentes condiciones del medio afecta la estabilidad de la misma frente a la desnaturalización irreversible ya que limita la exposición de grupos ocultos (disulfuro y tiol) en las zonas de unión de las moléculas y la consiguiente formación de enlaces covalentes entre las moléculas parcialmente desplegadas.

En condiciones de pH neutro, el equilibrio entre las formas monomérica y dimérica de la proteína se desplaza hacia la primera con un aumento en la temperatura. Aymard et al. (1996) estudiaron el efecto de la temperatura en el equilibrio entre la forma monomérica y dimérica de la proteína, observando que la forma asociada predomina a menores temperaturas y concentraciones altas de proteína.

3. CARACTERÍSTICAS DE LOS POLISACÁRIDOS

Los polisacáridos son biopolímeros compuestos por unidades de azúcar de un solo tipo (homopolisacáridos) o de diferente tipo de azúcar (heteropolisacáridos) cuya funcionalidad es principalmente la de aumentar la viscosidad, formar geles y retener agua (Syrbe et al, 1998).

En la realización de este trabajo se utilizaron principalmente polisacáridos no gelificantes: goma xántica, carragenano lambda, goma guar y alginato de propilenglicol, y un polisacárido gelificante, kappa carragenano.

Se detallan a continuación las principales características de cada uno de los polisacáridos utilizados:

3.1 Goma guar

La goma guar se extrae de las semillas de *Cyamopsis tetragonobulus*, una planta de la familia de las leguminosas cultivada principalmente en India y Pakistán.

La cadena principal del polisacárido está formada por unidades de manosa, y partes de la cadena se encuentran sustituidas con residuos de galactosa. La cadena contiene un residuo de galactosa cada dos unidades de manosa.

Por su alto grado de sustitución (que previene la asociación entre moléculas), la goma guar se disuelve en frío.

3.2 Alginato de propilenglicol (PGA)

Los alginatos se extraen de algas verdes (costas del atlántico norte: EEUU, Gran Bretaña, Francia y Noruega). El ácido alginico está formado por una secuencia de dos residuos de ácidos hexurónicos: β -D-manurónico y α -L-gulurónico.

Estos dos residuos no adoptan una distribución al azar en la formación de la cadena macromolecular. Esta cadena está formada por bloques que contienen aproximadamente 20 unidades:

Bloques homogéneos de ácido manurónico M-M-M-M

Bloques homogéneos de residuos de ácido gulurónico G-G-G-G

Bloques en los que se alternan los dos residuos: M-G-M-G

Las macromoléculas se forman por asociación de estos bloques en varios grados, dependiendo de la especie de alga y de la zona donde se recoge.

El PGA es un derivado del ácido alginico, en el cual parte de los grupos carboxilo se encuentran esterificados por medio de una reacción de oxidación con óxido de propileno. De acuerdo a la cantidad de grupos carboxilo que se encuentran esterificados, se obtienen PGA de diferente grado de esterificación, que varía generalmente entre 50 y 80 %. El alginato de propilenglicol, aún a altos grados de esterificación, posee grupos carboxilo ionizados, los cuales hacen que existan fuertes repulsiones entre cadenas del polisacárido y posibilita su solubilidad en frío. El comportamiento de este biopolímero en solución es el de un material levemente pseudoplástico (dependiendo de su concentración en la solución) sin umbral de fluencia. Es usado como espesante, ya que la alta ionización en solución hace que sea afín a moléculas de agua. Los diferentes PGA que son producidos industrialmente son clasificados de acuerdo al grado de esterificación y a su comportamiento viscosidad/esfuerzo de corte.

3.3 Carragenanos

Son polisacáridos extraídos de algas rojas, en costas de Francia, Irlanda y Gran Bretaña.

Los carragenanos son polímeros sulfatados constituidos por unidades de galactosa. Se han determinado varias fracciones, con diferente número y posición de los grupos sulfato y la posible

presencia de un puente anhidro 3-6 en la galactosa a través de las posiciones 1- y 4- (Oakenfull, 1998).

Las fracciones principales que se han determinado son carragenano iota (ι), kappa (κ), lambda (λ), mu (μ), nu (ν).

La proporción de las diferentes fracciones varía con la especie y zona de colecta del alga. A mayor grado de sulfatación, mayor es su solubilidad en frío y presentan o no propiedades gelificantes. El lambda carragenano posee 3 grupos sulfato por cada dos residuos de galactosa, lo que le brinda un fuerte carácter aniónico y crea una fuerte repulsión electrostática entre las cadenas. Esto hace que sea muy soluble en frío y no presente propiedades gelificantes, por lo que se lo utiliza como agente espesante. El κ -carragenano posee un solo grupo sulfato cada dos residuos de galactosa y tiene muy buenas propiedades gelificantes. Es soluble en caliente (aprox. 70 °C) y gelifica en frío. El κ -carragenano varía sus propiedades gelificantes de acuerdo a la presencia de ciertos iones, siendo particularmente sensible a la presencia de iones potasio. El carragenano iota presenta un comportamiento intermedio, ya que posee 2 grupos sulfato cada dos residuos de galactosa. Es parcialmente soluble en frío, requiriendo un calentamiento a 40 – 50 ° para su total solubilización, Forma geles más débiles que los de κ -carragenano a igual concentración.

Los carragenanos son los polisacáridos usados más comúnmente en productos lácteos. En productos gelificados, el efecto de este polisacárido se debe a que es un polisacárido sulfatado, que tiene la capacidad de formar complejos con la caseína de la leche (Schorsch et al, 2000, Lagendorff et al, 2000).

3.4 Goma xántica

Es un heteropolisacárido de alto peso molecular ($PM = 2,5 \cdot 10^6$ Da), que es segregado extracelularmente por la bacteria *Xanthomonas campestris*. Por hidrólisis de este polisacárido se obtienen monómeros de D-glucosa, D-manosa y ácido D-glucurónico. La cadena principal de la goma xántica contiene unidades de β -D-glucosa unidas a través de posiciones 1- y 4-, por lo que su estructura general es muy parecida a la de la celulosa.

Posee cadenas laterales en residuos alternados de glucosa, consistentes en trisacáridos compuestos por unidades de α -D-manosa, β -D-ácido glucurónico y una β -D-manosa terminal (Lapasin y Pricl, 1995).

Su estructura es repetitiva y regular, aunque presenta cierta irregularidad en el contenido de ácido pirúvico y grupos acetilo. La presencia de grupos piruvato y de ácido glucurónico le imparte carácter aniónico, aunque en el producto comercial, generalmente esos grupos se hallan neutralizados con cationes Na^+ , K^+ y Ca^{++} .

La presencia de cadenas laterales en las moléculas de goma xántica y su carácter aniónico ayudan a su hidratación, siendo soluble en frío.

Las moléculas de este polisacárido adoptan una conformación rígida en forma de hélices, las cuales no presentan tendencia a asociarse. Esta característica hace que no posea propiedades gelificantes.

La goma xántica es usada como espesante, con la característica que posee estabilidad en un amplio rango de temperaturas y pH. Además presenta un comportamiento pseudoplástico con umbral de fluencia, lo que la hace apropiada para aplicaciones específicas en alimentos.

En el siguiente cuadro se resumen algunas propiedades de los polisacáridos mencionados, y sus aplicaciones más importantes en alimentos:

POLISACÁRIDO	EFEECTO	COMPORTAMIENTO REOLÓGICO	APLICACIONES
Goma Guar	Espesante	Pseudoplástico	Helados y productos relacionados, salsas, aderezos, comida de mascotas.
PGA	Espesante	Pseudoplástico	Helados, productos para pasteles, pasta dentífrica, salsas y aderezos, mejorador de propiedades espumantes de cerveza.
Carragenano kappa	Gelificante	Geles elásticos con sinéresis	Productos lácteos, leche chocolatada, cremas heladas y productos relacionados, conservas de carne, comida de mascotas.
Carragenano lambda	Espesante	Pseudoplástico, gel suave en presencia de proteínas lácteas	Postres lácteos, salsas y aderezos, pastas dentífricas, comida de mascotas.
Goma xántica	Espesante	Pseudoplástico, con un alto umbral de fluencia.	Aderezos y salsas, leche chocolatada, helados, pasta dentífrica, cosméticos, suplementos dietarios líquidos

4. INTERACCIONES PROTEÍNA-POLISACÁRIDOS

Se ha avanzado mucho en el estudio de las características que afectan a nivel molecular las propiedades funcionales de biopolímeros individuales (proteínas o polisacáridos). Sin embargo, el conocimiento del rol de las interacciones proteína-polisacárido en relación a su funcionalidad en sistemas más complejos es aún limitado. Un manejo adecuado del efecto de estas interacciones es

un factor clave en el desarrollo de procesos y en la formulación de nuevos alimentos de funcionalidad específica (Tolstoguzov, 1997a; Dickinson, 1993).

4.1 Principios básicos

La interacción entre proteínas y polisacáridos en solución lleva a fenómenos tales como incompatibilidad o coacervación compleja, mientras que la miscibilidad en soluciones mixtas es un comportamiento casi excepcional (Syrbe et al, 1998).

Las investigaciones en el campo de las interacciones proteína-polisacárido comenzaron aproximadamente hace 100 años. Los primeros estudios realizados se concentraron en la preparación de mezclas de diferentes biopolímeros, observándose la imposibilidad para obtener una mezcla homogénea, por ejemplo en soluciones acuosas de gelatina con agar-agar o almidón. Se observaban partículas de gelatina disueltas en la masa líquida de almidón. En los 1950' y 1960' se llevaron a cabo las primeras investigaciones sistemáticas en fenómenos de incompatibilidad entre biopolímeros, al mismo tiempo que Flory desarrollaba su teoría de incompatibilidad (Tolstoguzov, 1997a). Sin embargo, en la última década el carácter general del fenómeno ha sido demostrado mediante el estudio de numerosos sistemas multicomponentes (Fernández, 1994, Syrbe et al., 1998, Tolstoguzov, 1995, 1997a, Samant et al, 1993, Grinberg et al., 1997).

Al mezclar soluciones de proteínas y polisacáridos, se pueden obtener sistemas con diferentes características, que se encuentran representados en la **Figura 3** (Tolstoguzov, 1986).

En soluciones muy diluidas la mezcla es estable debido al efecto predominante de la entropía de mezclado, y la proteína y polisacárido son cosolubles (Sistema (c)).

A medida que se aumenta la concentración de los biopolímeros, pueden ocurrir fenómenos de asociación o segregación.

En condiciones en las que existe atracción entre las moléculas de los diferentes biopolímeros (los biopolímeros poseen carga neta opuesta), puede producirse la formación de complejos no solubles que precipitan, obteniéndose dos fases separadas: una fase "coacervada" que contiene a los complejos y otra fase diluida, con baja concentración en ambos biopolímeros (Sistema (b)). En ciertos casos, las atracciones electrostáticas existentes entre las moléculas de los diferentes biopolímeros pueden llevar a la formación de complejos solubles, obteniéndose un sistema de una sola fase (Sistema (a)).

En condiciones en donde predominan las fuerzas de repulsión entre los biopolímeros (cuando ambos poseen la misma carga neta), puede obtenerse un sistema de dos fases (emulsión agua en agua) en el cual ambos componentes macromoleculares están concentrados en diferentes fases. Esto se debe a la limitada incompatibilidad entre proteínas y polisacáridos en medio líquido

(Sistema (d)). La diferencia entre los sistemas líquidos de dos fases (b) y (d) reside en que en los distintos sistemas los biopolímeros están concentrados juntos en una fase inferior (sistema (c)) o en diferentes fases en el sistema (d).

Esto implica que las soluciones mixtas de biopolímeros pueden existir en estados estables o de fases separadas. Todos los sistemas descritos difieren considerablemente en estructura y propiedades. Por lo tanto, también variarán las propiedades funcionales de los sistemas macromoleculares en los que formen parte.

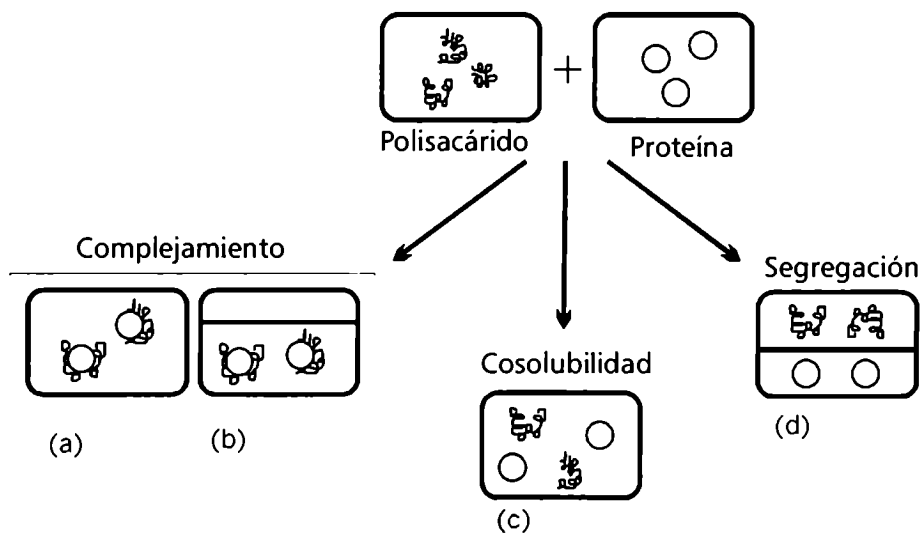


Figura 3. Representación esquemática de los 4 posibles sistemas obtenidos al mezclar soluciones de proteínas y polisacáridos.

4.2 Algunas consideraciones teóricas en el comportamiento de mezclas proteína/polisacárido

A diferencia de la termodinámica de mezclado de líquidos con moléculas pequeñas, donde los efectos entrópicos tienen un rol predominante, el comportamiento de sistemas mixtos de biopolímeros está controlado principalmente por las contribuciones entálpicas entre los segmentos de las diferentes moléculas (Flory, 1942).

De acuerdo al segundo principio de la termodinámica, la mezcla de uno o más biopolímeros con un solvente será posible si la energía libre de mezclado, ΔG_M es negativa:

$$\Delta G_M = \Delta H_M - T \Delta S_M < 0$$

Donde ΔH_M y ΔS_M son las entalpías y entropía de mezclado respectivamente y T es la temperatura absoluta (K). La estabilidad de este sistema está gobernada por tres efectos termodinámicos: entropía combinatorial de mezclado, las interacciones intermoleculares

provenientes de las diferentes fuerzas que rodean a la molécula y el efecto de volumen libre (Schmitt et al., 1998).

4.2.1 Entropía combinacional de mezclado (ΔS_M)

ΔS_M representa las posibles permutaciones de moléculas presentes en el sistema que se comporta como cuasiestático. Este término es directamente proporcional a la fracción en volumen del componente e inversamente proporcional al volumen molar. ΔS_M es siempre positivo, con lo que contribuye negativamente a ΔG_M . De acuerdo a esto, la estabilidad de mezclado decrece con macromoléculas más grandes, por un aumento en el volumen molar de los componentes que lleva a una disminución en la entropía de mezclado (Olabisi et al., 1979).

4.2.2 Contribución interaccional (ΔH_M)

La contribución interaccional o calor de mezclado está basada en la existencia de fuerzas repulsivas (hidratación, estéricas) o atractivas (electrostáticas, hidrofóbicas, Van der Waals, London) que rodean a cada átomo y molécula. Estas fuerzas dependen de factores como la energía de vaporización del gas, volumen molar del componente, solubilidad, etc. Este término (ΔH_M) generalmente es positivo, con lo que no contribuye a la compatibilidad de los biopolímeros en solución, ya que lleva a un aumento en ΔG_M . En casos muy raros, las interacciones específicas débiles contribuyen negativamente a ΔG_M (Schmitt et al., 1998).

El parámetro interaccional fue definido por Huggins (1942) y Flory (1942) para una mezcla del solvente con el biopolímero como:

$$\chi_{12} = (z \Delta \omega_{12} r_1) / kT,$$

Donde z es el número de coordinación, $\Delta \omega_{12}$ es la energía de interacción asociada a la creación de un nuevo contacto del tipo 1-2, r_1 es el número de segmentos contenidos por la molécula del tipo 1, k es la constante de Boltzman y T la temperatura absoluta.

En soluciones de biopolímeros de alto peso molecular, la energía libre de mezclado puede expresarse como:

$$\Delta G_M = (\chi_{12} / V_1) \gamma_1 \gamma_2,$$

donde V_1 es el volumen molar del componente 1 y γ_1 y γ_2 las fracciones volumétricas de los componentes 1 y 2 en la mezcla. En la expresión de ΔG_M se observa que el parámetro de Flory-Huggins gobierna la estabilidad del sistema.

Debido a que χ_{12} / V_1 es función de $1/T$, este parámetro aumenta con un descenso en la temperatura, causando un descenso en la estabilidad. Al subir la temperatura, las interacciones

específicas favorables se vuelven más negativas, causando una mayor estabilidad (Schmitt et al., 1998).

4.2.3 Efecto de volumen libre

Es el resultado del cambio de volumen luego del mezclado de macromoléculas.

En una solución ternaria de dos biopolímeros y el solvente, el coeficiente de Flory-Huggins se define como:

$-\chi_{12}$ y χ_{13} , para las interacciones entre el solvente (1) y ambos biopolímeros (2 y 3)

$-\chi_{23}$ para las interacciones entre los dos biopolímeros

Debido al gran tamaño de las moléculas de los biopolímeros comparados con la del solvente, χ_{23} es el factor controlante de la estabilidad de la mezcla. Este factor determina principalmente las condiciones para la separación de fases (Dickinson, 1994).

En muchas mezclas de biopolímeros, las fuerzas desestabilizantes son de mayor magnitud que las estabilizantes. Por lo tanto, la separación de fases es lo más común. En estas condiciones pueden llevarse a cabo dos tipos de separación de fases, de acuerdo a la afinidad de cada uno de los biopolímeros por el solvente y entre ellos. La incompatibilidad termodinámica, o separación de fases segregativa se da cuando χ_{23} es positivo, indicando una repulsión neta entre los biopolímeros. En este caso se ven favorecidas las interacciones biopolímero-solvente, en detrimento de la biopolímero-biopolímero y solvente-solvente, con lo que el sistema finalmente se separa en dos fases cada una concentrada en uno de los biopolímeros. Estas dos fases estarán en equilibrio termodinámico.

El segundo fenómeno es el de coacervación compleja o separación de fases asociativa, que se da cuando se ven favorecidas las interacciones entre los dos biopolímeros ($\chi_{23} < 0$). Las dos fases coexistentes consisten en una fase rica en solvente con poca cantidad de biopolímeros y una rica en los biopolímeros formando los complejos.

4.3 Fenómeno de coacervación compleja

La formación de complejos entre proteínas y polisacáridos ocurre en condiciones donde se favorece la atracción entre los dos tipos de macromoléculas. Esto es, a pH por debajo del pI de la proteína y a bajas fuerzas iónicas. La formación de estos complejos es usualmente reversible, dependiendo de las condiciones del medio. La interacción entre los biopolímeros aumenta con la carga neta opuesta entre ambas macromoléculas y cuando la relación entre estas cargas opuestas es cercana a la unidad. Existen tres tipos de interacciones entre macromoléculas en solución: i) entre

macroiones, ii) entre grupos laterales con cargas opuestas (grupos ácidos y básicos), iii) entre otros grupos laterales disponibles. En el primer caso los factores importantes son la carga neta opuesta, forma, tamaño y flexibilidad. En los demás casos importa la reactividad de las cadenas laterales de residuos de aminoácidos disponibles en la superficie exterior de las moléculas de proteína y en las del polisacárido (Dickinson, 1993).

Las interacciones covalentes entre los biopolímeros son específicas, fuertes y permanentes. Las interacciones atractivas no específicas se dan como resultado de múltiples interacciones químicas entre grupos laterales de los biopolímeros: iónicos, dipolares, van del Waals, puente hidrógeno, hidrofóbicas. Las atracciones más fuertes pueden ocurrir entre los grupos positivamente cargados de la proteína ($\text{pH} < \text{pI}$) y polisacáridos aniónicos, especialmente a bajas fuerzas iónicas, y las atracciones débiles se dan entre grupos no cargados o negativamente cargados de las proteínas ($\text{pH} > \text{pI}$) y polisacáridos (Dickinson, 1993).

Durante la formación de complejos electrostáticos, la carga neta de los polisacáridos aniónicos va disminuyendo a medida que estos se complejan a los grupos polares de las proteínas. Esta disminución de carga neta opuesta en los reactivos macromoleculares reduce la hidrofiliidad y la solubilidad del complejo resultante. La formación de complejos solubles se da generalmente cuando la relación entre los reactivos está lejos de la necesaria para que las cargas opuestas sean equivalentes.

Las partículas dispersas de complejos no solubles se agregan y precipitan. La agregación de estos complejos en solución se da mediante uniones puente hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, interacciones dipolo-dipolo.

4.3.1 Factores que afectan la formación y características de los complejos

Relación entre composición, estructura y propiedades.

La formación de zonas de unión entre complejos, que llevan a la formación de agregados, depende de factores tales como la estructura química, tamaño y forma de las cadenas interactuantes.

El área de contacto en las proteínas globulares está limitada por su topografía (Tolstoguzov, 1997a).

La estructura rígida y compacta de proteínas globulares restringe el número de grupos cargados capaces de interactuar con los de otras macromoléculas. El número de posibles zonas de unión en proteínas globulares es menor que para otras proteínas con estructuras más desordenadas y flexibles. Las proteínas con estructura desplegada como la gelatina y caseína son capaces de formar

un máximo número de zonas de contacto con las cargas opuestas de los polisacáridos, a diferencia de otras proteínas de conformación más compacta como las globulares.

Efecto de condiciones de no-equilibrio

La composición y propiedades de complejos electrostáticos dependen del pH, fuerza iónica y la naturaleza y relación entre los biopolímeros y también del método de preparación. La solución mixta formada mezclando las soluciones de proteína y polisacárido con un pH menor que pI se separa en dos fases. El complejo insoluble forma una fase coacervada denominada de complejos. La disociación de este complejo puede ser lograda mediante el ajuste hacia pH alcalino, resultando en un sistema estable que no contiene complejos electrostáticos. También pueden obtenerse los complejos mezclando las soluciones a pH alcalino y luego bajando el pH por debajo del pI. En esta condición se obtienen complejos solubles (Tolstoguzov, 1997a).

La estabilidad de los complejos formados entre proteínas y polisacáridos aniónicos aumenta con la desnaturalización térmica de la proteína y por adición de cationes divalentes (Ca^{++} , Fe^{++} , Cu^{++} , etc). Esta estabilidad se debe a la habilidad de los cationes de actuar como intermediarios para la formación de uniones entre proteínas y polisacáridos aniónicos. La desnaturalización aumenta el número de interacciones hidrofóbicas, puente hidrógeno y uniones de coordinación entre complejos.

Efecto de la densidad de carga de los biopolímeros y del peso molecular

La densidad de carga de los biopolímeros puede ser definida como el número de cargas presentes por unidad de longitud. Este factor es muy importante en el fenómeno de complejamiento, debido a que la coacervación se inhibe a valores críticos de densidad de carga. Pueden observarse casos de formación de complejos a $\text{pH} > \text{al pI}$ de la proteína, en donde ambos biopolímeros tienen carga neta negativa. Esto es posible debido a que en la molécula de proteína existen regiones locales cargadas positivamente (Schmitt et al., 1998).

4.3.2 Aplicaciones industriales de los complejos

Purificación de macromoléculas

El proceso puede ser descripto como la adición de polisacárido a una solución proteica, seguido del ajuste de pH y otras condiciones del medio para obtener el máximo grado de complejamiento. Luego de la precipitación de los complejos, las macromoléculas son centrifugadas y filtradas. Los polisacáridos pueden ser reutilizados en estos procesos.

El complejamiento entre proteínas del suero y polisacáridos aniónicos ha sido explotada a pH entre 3-4 para la recuperación de proteínas, utilizando CMC o pectina de bajo a medio metoxilo (Syrbe et al, 1998).

Utilización en microencapsulación

Se basa en la habilidad de los complejos para formar un film sólido alrededor de las partículas de la emulsión que contienen las sustancias a ser encapsuladas. Las partículas dispersas que contienen la sustancia a encapsular (aromas, drogas, células) están estabilizadas por proteína. Al agregar el polisacárido se forma una coacervación interfacial, y luego el producto es deshidratado mediante secado spray. Este proceso se realiza para la protección de materiales sensibles (volátiles, enzimas, drogas, colorantes, etc) contra la hidrólisis enzimática, variaciones en el pH, interacción con otras sustancias, y para controlar el nivel de liberación de las mismas. Se utiliza para encapsulación de pesticidas, con el objetivo de controlar su liberación y evitar problemas toxicológicos. En la industria farmacéutica y medicina, se utiliza la encapsulación de drogas para mejorar la absorción gastrointestinal respecto de las mismas drogas administradas en polvo, gránulos o en solución.

Ingredientes de alimentos y biomateriales

Los principales usos son como reemplazantes de grasa, debido a las propiedades nutricionales y funcionales de los complejos. Además se utilizan los complejos texturizados en forma de fibra para la obtención de análogos de carne bajos en grasa.

Los complejos se utilizan en la producción de films comestibles, que poseen ventajas respecto de films formados con un solo biopolímero.

Los complejos con colágeno y polisacáridos (goma xántica, alginato, CMC) pueden ser utilizados para vendajes, suturas, injertos, órganos artificiales, implantes suaves de piel y prótesis. Otro potencial de utilización es como sustitutos de sangre.

4.4 Incompatibilidad termodinámica

La incompatibilidad termodinámica es una de las características más comunes de mezclas de biopolímeros. Sólo unos pocos pares de estos sistemas exhiben compatibilidad o miscibilidad en soluciones acuosas (Tolstoguzov, 1997a). Esto implica que bajo ciertas condiciones, cualquier sistema proteína-polisacárido se separa espontáneamente en dos fases líquidas concentradas en los diferentes biopolímeros.

Generalmente, esta separación ocurre cuando la concentración total de los componentes macromoleculares excede el 4% (Tolstoguzov, 1986). Incluso a concentraciones totales del 1%, se han observado fenómenos segregativos en algunas soluciones mixtas de polisacáridos y proteínas (Doublier et al., 2000).

Las condiciones de separación de los diferentes biopolímeros son diferentes de acuerdo a sus características moleculares, como por ejemplo, el tipo de polisacárido presente (neutro, sulfatado, carboxilado). Los fenómenos de exclusión son más importantes para polisacáridos con cadenas rígidas y extendidas (por ejemplo la goma xántica) que para macromoléculas ramificadas o estructuras más compactas (Syrbe et al, 1998). Una reducción en el peso molecular de los polisacáridos resulta generalmente en un aumento de la concentración necesaria para obtener una separación de fases del sistema (Doublier et al., 2000).

Los fenómenos de separación de fases se dan bajo condiciones que inhiben las interacciones entre macromoléculas de diferente tipo, y promueven la asociación entre moléculas del mismo tipo.

La incompatibilidad termodinámica entre proteínas y polisacáridos carboxilados se da generalmente a pHs superiores al pI de la proteína, donde ambos biopolímeros poseen una carga neta negativa. Para los polisacáridos sulfatados se observa compatibilidad en un mayor rango de pH, mientras que la fuerza iónica tiene mucho efecto (Samant et al., 1993, Syrbe et al, 1998). En general, para los sistemas con polisacáridos aniónicos, la incompatibilidad está afectada fuertemente por el pH y la fuerza iónica (Doublier et al, 2000).

4.4.1 Diagramas de fase

El fenómeno de incompatibilidad termodinámica entre proteínas y polisacáridos se representa mediante la construcción del diagrama de fases para cada sistema particular. En la **Figura 4** se muestra un diagrama de fases típico para un sistema ternario proteína-polisacárido-agua en coordenadas rectangulares (Tolstoguzov, 1995).

La curva de línea llena es la curva binodal. La curva binodal muestra el perfil de cosolubilidad de los biopolímeros en un medio dado. La región que queda delimitada bajo la curva binodal representa el área de miscibilidad o de una fase, mientras que la región superior representa el área de inmiscibilidad o separación de fases.

Al mezclar una solución de proteína de concentración A, puede obtenerse un sistema estable de una fase al mezclarlo con una solución con un porcentaje B_1 de polisacárido, o un sistema separado en dos fases al mezclarlo con una solución de PS de concentración B. Por ejemplo, al mezclar las soluciones de concentraciones A y B, en una proporción de volúmenes BC/AC

(proteína/polisacárido) se obtiene una mezcla de concentración C. Esta solución C se separa en dos soluciones líquidas D y E. Los puntos D y E son puntos binodales. La relación entre la longitud de los segmentos EC/CD representa la relación de volúmenes de las fases de composición D y E.

Esto implica que los biopolímeros tienen una muy limitada cosolubilidad en el solvente común, y que cada uno se encuentra concentrado en fases diferentes. Las composiciones de D y E pueden ser obtenidas por sedimentación y análisis posterior del contenido de polisacárido y proteína.

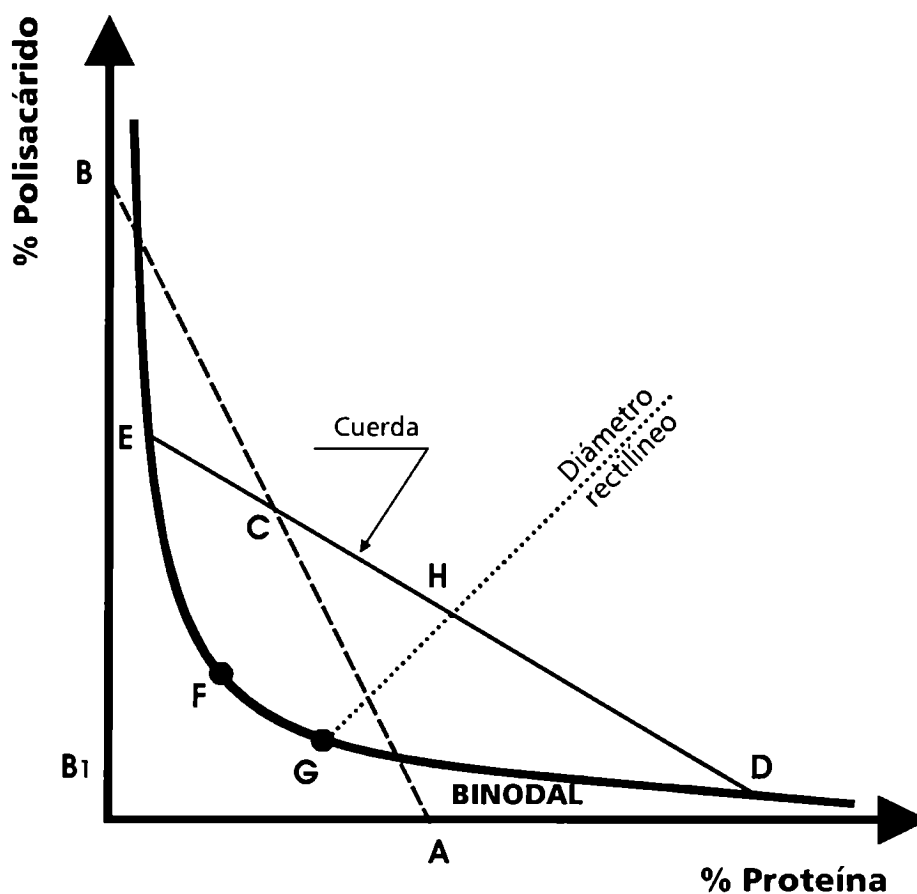


Figura 4. Diagrama de fases típico para un sistema mixto proteína-polisacárido en agua

Las líneas binodales concluyen en el punto crítico F, en el cual las fases coexistentes poseen la misma composición y volumen. En el punto crítico (G), la composición de las fases es la misma que la de los sistemas iniciales. El punto G representa el umbral de separación de fases para un dado par de biopolímeros, es la concentración total mínima para que haya separación de fases.

La línea G-H (diámetro rectilíneo) conecta el punto crítico con el punto medio de cada cuerda. Una mezcla en esos puntos se separará en fases de igual volumen. El fenómeno de inversión de fases tendrá lugar cuando una solución pasa de una composición de uno lado del diámetro rectilíneo al otro (Tolostoguzov, 1995).

Se han reportado un gran cantidad de diagramas de fases para sistemas mixtos de proteínas y polisacáridos (Tolstoguzov, 1997a, Grinberg y Tolstoguzov, 1997). Las diferencias en volúmenes de exclusión entre los biopolímeros incompatibles afecta el resultado de la competencia entre los biopolímeros en el seno de la fase. Esta competencia entre los biopolímeros o un fenómeno de exclusión mutua entre las macromoléculas contribuye a la asimetría de los diagramas de fase en sistemas proteína polisacárido (Tolstoguzov, 1997a). El grado de asimetría de los diagramas de fase refleja una mayor hidrofiliidad y un volumen efectivo superior de los polisacáridos (especialmente para los lineales) comparado con las moléculas compactas de proteínas globulares. De acuerdo a esto, una fase menos concentrada rica en polisacárido se encuentra en equilibrio con una fase más concentrada rica en proteína. En muchos casos, la concentración de proteína se ve aumentada de modo que esta gelifica.

Primera Parte

**Interacciones entre β -lactoglobulina
y polisacáridos en sistemas gelificados**

I.1

Introducción

1.1 INTRODUCCIÓN

1.1.1 MECANISMO DE GELIFICACIÓN DE PROTEÍNAS GLOBULARES

La gelificación constituye una de las propiedades funcionales más importantes de las proteínas, en cuanto determina la estructura y textura de una amplia gama de alimentos. Entre ellos las gelatinas, embutidos cárnicos, surimi, yogur, postres lácteos, productos de panadería, etc. Las proteínas globulares de la leche, suero, huevo, soja o músculo pueden formar geles por acción del calor.

La gelificación puede ser definida como un fenómeno de agregación ordenada en el cual fuerzas atractivas y repulsivas están balanceadas de modo de obtener una matriz o red proteica capaz de retener una gran cantidad de agua (Hermansson, 1979).

Un requisito para la agregación de las proteínas globulares es que se produzca un cambio en la conformación de las moléculas de proteína (Matsumura y Mori, 1996). Este cambio en la conformación es inducido generalmente por calentamiento, lo que lleva a una desnaturalización parcial de las moléculas de proteína. Este paso es seguido por una asociación o agregación de las moléculas desplegadas, en el cual se forman agregados cuyo tamaño va aumentando progresivamente. Finalmente, la asociación de agregados lleva a la formación de una matriz tridimensional, que continúa estructurándose y estabilizándose mientras dura el calentamiento. Este proceso puede ser visto desde el punto de vista reológico como el pasaje de una solución (sol) que va aumentando su viscosidad mientras se forman los agregados proteicos, a la formación de un sólido viscoelástico (gel).

En la **Figura 1.1.1** se representa esquemáticamente el proceso de gelificación en el cual la proteína sufre una desnaturalización parcial (P_D), luego se agrega con otras moléculas desnaturalizadas ($(P_D)_n$) y finalmente se forma la estructura gelificada primaria, al llegar al punto de gel. Varias técnicas permiten evaluar las características del sistema aún líquido en el que van creciendo agregados proteicos, determinar el punto gel y evaluar las propiedades del sistema gelificado, es decir realizar un seguimiento de la dinámica de la gelificación.

Previamente al punto gel se utilizan técnicas como dispersión dinámica de luz (DLS), cromatografía líquida (HPLC) o electroforesis que permiten medir la evolución del tamaño de agregados (Van Mil & Roefs, 1993; Hofmann et al, 1996).

La transición de una estructura viscosa (sol) a una viscoelástica (gel) durante el calentamiento puede ser monitoreada por reometría dinámica oscilatoria como el punto de cruce entre el módulo viscoso (G'') y el elástico (G'), momento en el cual el ángulo de desfase es de 45° y la tangente del ángulo de pérdida ($\tan\delta = G''/G'$) es igual a 1. Según las condiciones de calentamiento, puede

determinarse el tiempo de gelificación a una temperatura constante de calentamiento (usualmente por arriba de la temperatura de desnaturalización de la proteína) o la temperatura de transición, si se registra la variación de los parámetros durante por ejemplo una rampa de calentamiento a una baja velocidad de calentamiento.

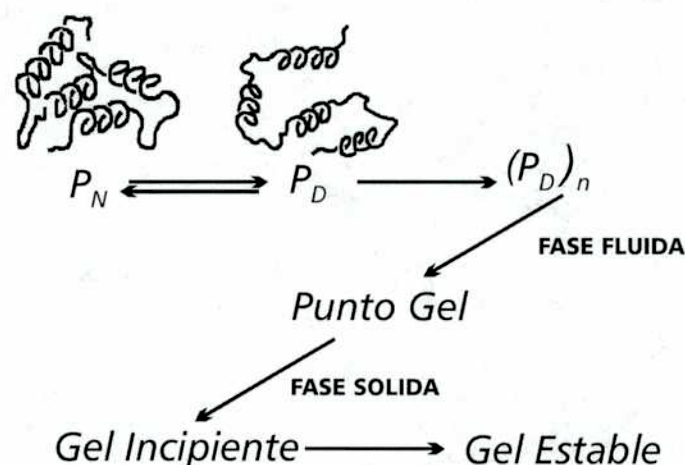


Figura I.1.1 Esquema del proceso de gelificación térmica de proteínas globulares

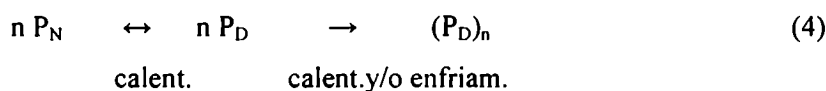
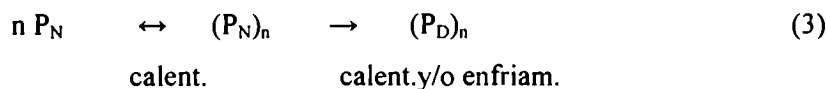
Las proteínas globulares forman geles irreversibles, a diferencia de los geles térmicamente reversibles como los de gelatina o de algunos polisacáridos en los cuales se logra la estructura gelificada luego del enfriamiento. Estas diferencias se deben a que las proteínas globulares forman geles por medio de uniones covalentes (por ej. disulfuro), mientras que la gelatina y polisacáridos por uniones no covalentes (asociación física).

El mecanismo aceptado clásicamente para la desnaturalización y agregación de proteínas globulares puede describirse mediante las siguientes reacciones (Morr y Ha, 1993) :



donde P_N es la proteína nativa, P_D es la proteína desnaturalizada y n un número pequeño de subunidades o monómeros de proteína. Las reacciones iniciales en el proceso de gelificación implican un debilitamiento y rompimiento de uniones disulfuro e hidrógeno, de modo de alterar la conformación nativa de la proteína y disociar agregados proteicos. La segunda etapa es una polimerización de moléculas de proteína disociadas y desplegadas para producir una estructura tridimensional mediante la formación de enlaces intermoleculares de tipo disulfuro, hidrofóbicos o electrostáticos (Mangino, 1992, Morr y Ha, 1993).

Si bien el estado gelificado final está formado por agregados de proteína parcialmente desnaturalizada, $(P_D)_n$, no se sabe ciertamente cuál de los siguientes esquemas está implicado:



Según se produzca una u otra reacción, el tipo de gel obtenido tendrá características diferentes por el tipo de uniones que forman los agregados y el tamaño y forma de los mismos. La reacción (3) se da en condiciones que favorecen las interacciones proteína-proteína en solución. Estas condiciones pueden ser pH cercano al pI de la proteína, presencia de una considerable concentración de sales o a bajas temperaturas de calentamiento (Verheul et al., 1999). Este tipo de reacción puede dar lugar a la formación de agregados de proteína previamente a la desnaturalización (Stading y Hermansson, 1990). Luego se dará la desnaturalización de los agregados formados, aunque en el momento de gelificación puede variar la cantidad de proteína desnaturalizada contenida en el gel. Un extremo de esta reacción sería la agregación grosera y desnaturalización de proteína formando un coágulo, pero sin obtención de una red tridimensional con capacidad de retención de agua.

La reacción (4) se da por calentamiento en condiciones más favorables a la desnaturalización o desdoblamiento de la proteína que a la agregación de la misma (pH por encima del pI de la proteína, fuerzas iónicas débiles, presencia de ciertos iones, presencia de agentes disociantes como la urea o detergentes, altas temperaturas de calentamiento). En estas condiciones, durante el calentamiento se liberan los grupos SH internos y se promueve la formación o intercambio de uniones disulfuro entre moléculas vecinas, lo que lleva a la formación de agregados lineales. El calentamiento además favorece las interacciones hidrofóbicas ya que también se activan grupos hidrófobos antes ocultos en el interior de la molécula proteica. La formación de la red tridimensional final implica también enlaces puente hidrógeno que se favorecen durante el enfriamiento.

Stading y Hermansson (1992) sugirieron que las velocidades relativas de los procesos de desnaturalización y agregación durante el calentamiento juegan un papel determinante en la estructura del gel. A medida que la etapa de agregación sea más lenta con respecto a la de

desnaturalización, los polipéptidos desdoblados se podrán orientar más fácilmente antes de la agregación, favoreciendo la formación de un gel más ordenado y homogéneo, muy elástico, transparente y estable a la sinéresis. Los geles formados por partículas proteicas agregadas groseramente, serán opacos, poco elásticos e inestables y propensos a la sinéresis. Estos geles estarían formados mayoritariamente por enlaces hidrófobos entre moléculas proteicas, expuestos durante el calentamiento y formados antes que pudiera darse un ordenamiento de los polipéptidos para formar los enlaces disulfuro entre moléculas vecinas. De este modo se formarían los agregados por medio de enlaces covalente en sitios menos específicos, y daría lugar a agregados más grandes que luego formarán la red tridimensional (Cheftel et al., 1989 b).

Los geles proteicos se clasifican generalmente en particulados o de filamentos finos, “fine-stranded”, según posean características más similares a los formados por las reacciones (4) o (3) respectivamente.

Según lo descripto anteriormente, en ciertas condiciones del medio se favorece la agregación de proteínas en forma lineal y ordenada, que lleva finalmente a la formación de geles fine-stranded. En condiciones que favorecen la interacción proteína-proteína y cuando la velocidad de agregación es considerablemente alta, pueden formarse grandes agregados que llevan a la formación de geles particulados. Ambos mecanismos se esquematizan en la **Figura I.1.2**.

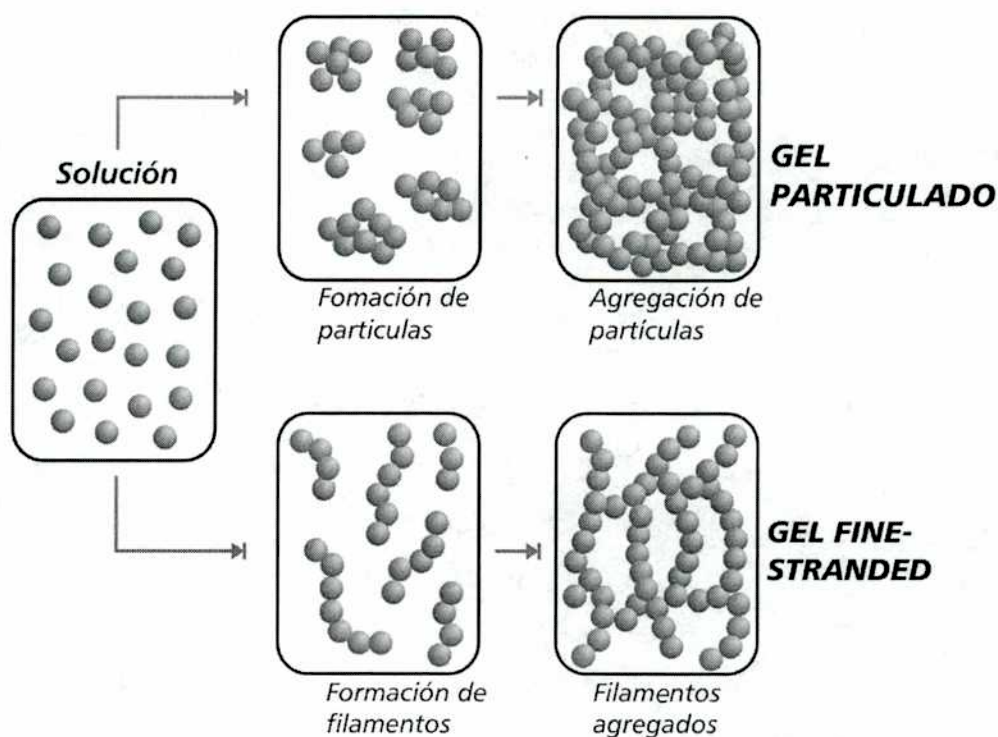


Figura I.1.2 Formación de geles de tipo particulado o “fine-stranded” por calentamiento de soluciones de proteínas globulares

1.1.2. COMPORTAMIENTO TÉRMICO DE LA β -LACTOGLOBULINA

1.1.2.1. Características generales

La estabilidad térmica de una proteína refiere a la temperatura a la cual la proteína se despliega y está relacionado a la estabilidad termodinámica (Myers, 1990). El concepto de desnaturalización puede ser definido como una alteración en la estructura nativa original sin hidrólisis de las uniones covalentes primarias, por lo tanto los cambios que se producen en este proceso están relacionados a modificaciones en la estructura secundaria o superiores de la proteína (Mulvihill et al., 1987). Las proteínas globulares con estructura cuaternaria generalmente se disocian antes de que se produzca el desplegamiento o desnaturalización (Relkin, 1996).

A temperatura ambiente (20 °C), la β -lg se encuentra en solución en un equilibrio dinámico entre su forma dimérica y monomérica. En un rango de pH entre 6 a 9 se lleva a cabo un cambio conformacional reversible hacia una conformación parcialmente desplegada de la proteína, la cual ha sido denominada como transición de Tanford, debido a los estudios realizados varias décadas atrás por dicho autor (Tanford et al., 1959). Un aumento en la disociación de los dímeros se produce a temperaturas por encima de los 30 °C, lo cual ha sido demostrado por mediciones de rotación óptica (Mc Kenzie y Sawyer, 1967). La transición hacia el estado parcialmente desplegado procede vía monómeros de la proteína e incluye una ionización de grupos carboxilo previamente ocultos en el interior de la molécula plegada (Tanford et al., 1959). Esta transición lleva a la exposición de grupos polares, así como a un aumento en la reactividad de los grupos tiol (Mulvihill y Donovan, 1987). El proceso de desnaturalización *per se* se lleva a cabo con un mayor aumento en la temperatura, en el cual se exponen grupos apolares al solvente y se rompen uniones hidrógeno e hidrofóbicas con pérdida en las estructuras secundaria y terciaria de la proteína.

Sawyer et al., (1971) estudiaron la desnaturalización de la β -lg mediante técnicas de dispersión óptica rotatoria (ORD) y discoísmo circular (CD) en la región ultravioleta del espectro para determinar los cambios en las estructura secundaria y terciaria de la proteína durante el proceso. Además, en los mismos estudios se determinó el grado de agregación por medio de la velocidad de sedimentación, confirmando que en el proceso de desnaturalización de la proteína ocurren una serie de pasos de desplegamiento y asociación de las subunidades (Sawyer et al., 1971). Nishinari et al (2000) observaron una pérdida en estructura α -hélice y un aumento en estructuras planas β . En forma similar, Qi et al.(1997) observaron la destrucción casi total de la estructura hélice a temperaturas entre 60 y 70 °C por técnicas de espectroscopía. También determinaron una importante reducción en las cadenas planas β entre los 40 y 60 °C.

La calorimetría diferencial de barrido ha sido ampliamente utilizada para el estudio de las transiciones térmicas de la β -lg (Hiller et al., 1979, de Wit et al., 1980, Mulvihill et al., 1987, Relkin, 1994, Relkin, 1996, Donovan et al., 1987, Qi et al., 1997). Las mediciones calorimétricas proveen de datos termodinámicos durante el desplegamiento de la proteína, mediante una medida directa del cambio en la capacidad térmica durante el calentamiento (Relkin, 1996). Los parámetros usualmente determinados son las temperaturas de transición y el cambio de entalpía específico, ya que se relacionan con la estabilidad térmica de la proteína.

1.1.2.2. Parámetros calorimétricos

Se han determinado estos parámetros bajo diferentes condiciones de concentración de β -lg, pH y fuerza iónica. Los valores de temperaturas de desnaturalización oscilan entre 60-85 °C según las condiciones de pH estudiadas. Se ha observado una mayor estabilidad térmica de la β -lg en condiciones de pH < pI, determinándose temperaturas de transición de alrededor de 80-85 °C. A pH ácido el grupo tiol libre es no reactivo, pero los residuos hidrofóbicos del estado plegado, inicialmente ocultos, entran en contacto con el medio acuoso y por lo tanto deben romperse uniones hidrógeno adicionales del agua estructural. Se cree que este fenómeno es el responsable del aumento en la estabilidad térmica de la proteína a pH ácido (Relkin, 1996). La mayor susceptibilidad de la proteína a la desnaturalización a valores altos de pH sugiere que la conformación a pH alcalino es más flexible y abierta (Kella y Kinsella, 1988). La estructura compacta de la proteína a valores bajos de pH es probablemente la causa de su mayor estabilidad térmica en este rango de pH.

El valor del cambio de entalpía (ΔH) también es mayor a pH ácido (<3,5) que a pH por encima de 4. Se han reportado valores de ΔH muy variados respecto a las condiciones de estudio, que van desde 120- 400 kJ/mol. A pH básico, la disminución en la estabilidad térmica de la β -lg es producida por la oxidación de grupos tiol libres mediante reacciones de intercambio tiol/disulfuro (SH/S-S) intra o intermoleculares, que ocurren paralelamente al desplegamiento y agregación de la proteína.

El estudio de la estabilidad térmica de proteínas del lactosuero tiene fundamental importancia en el rango de pH de 6-7, ya que son las condiciones existentes en varios productos lácteos. Se ha reportado un importante cambio en la estabilidad térmica en este rango de pH, observándose un cambio en el comportamiento térmico entre 6,4 y 6,7 (de Wit et al., 1980, Hoffmann et al., 1999)

El agregado de sales o azúcares parece estabilizar las moléculas de proteína según el aumento en la temperatura de desnaturalización observado en presencia de estos solutos (Nishinari et al,

2000). A pH neutro, la temperatura de pico aumenta con la concentración de sales. La entalpía de desnaturalización disminuye con la presencia de iones, siendo este efecto mayor para iones divalentes como el Ca^{++} . Relkin (1996) ha reportado un aumento en la estabilidad térmica de la β -lg a pH neutro en presencia de iones mono y divalentes (Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++}), y el efecto contrario a pH ácido con el agregado de los mismos iones.

1.1.2.3 Cinética del proceso de desnaturalización térmica de la β -lg

La bibliografía reporta resultados muy disímiles en cuanto al orden de la reacción de desnaturalización de la β -lg y las energías de activación correspondientes a dicho proceso. Los valores reportados más comunes (pH neutro) son 2 (Nielsen et al., 1996), 1,5 (Roefs and de Kruif, 1994, Hoffmann et al, 1996) o 1 (de Wit et al., 1980, Harwalkar et al., 1985, Liu et al., 1994). Las discrepancias que existen en los resultados obtenidos en estos estudios reflejan diferencias en el método obtención de la proteína, estimación de proteína no-desnaturalizada residual, diferencias en las metodologías y condiciones experimentales (Jaskulka et al., 2000).

Se observó un máximo en el valor de energía de activación para el proceso a pH cercano al pl de la proteína, de 774 kJ/mol (Liu et al., 1994). Este valor disminuye a ambos lados del punto isoeléctrico de la proteína. A pH neutro, los valores reportados oscilan entre 250 kJ/mol y 350 kJ/mol.

1.1.3. GELIFICACIÓN DE LA β -LACTOGLOBULINA

1.1.3.1 Mecanismo de gelificación

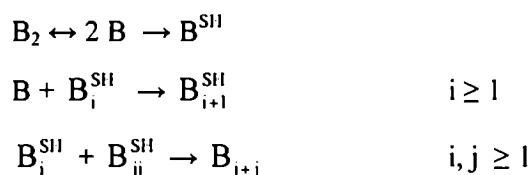
Se han propuesto varios mecanismos para describir la gelificación térmica de la β -lactoglobulina (Elofsson et al., 1996, Iametti et al., 1996, Jaskulka et al., 2000, Mc Kenzie, 1971, Qi et al., 1995, 1997, Roefs y De Kruif, 1994, Schokker et al., 1999).

En las primeras etapas del proceso de calentamiento se da una disociación reversible de la forma dimérica en la cual se encuentra la β -lg a pH entre 5,5 y 7. Luego ocurre una desnaturalización irreversible de la proteína.

El mecanismo descrito en las ecuaciones (1) - (4) es el clásicamente propuesto para el proceso de gelificación de la β -lg. Sin embargo en los últimos años, varios autores han propuesto mecanismos alternativos que permiten explicar el comportamiento observado por diferentes

técnicas de estudio del proceso de agregación (cromatografía de tamaño de exclusión, dispersión estática y dinámica de luz).

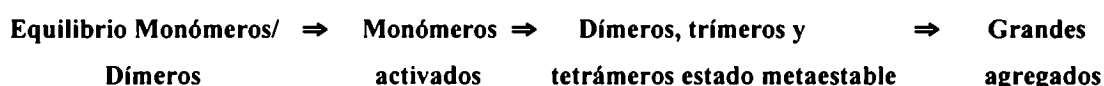
Roefs y De Kruif (1994) propusieron un modelo con un orden global de reacción de 1,5. El modelo propone, por analogía con los procesos químicos de polimerización, etapas de iniciación, propagación y terminación:



El paso de iniciación consiste en un número de reacciones reversibles seguidas por una reacción irreversible. En la reacción reversible, los dímeros de β -lactoglobulina se separan en dos monómeros. Esto es seguido por la exposición del grupo sulfhidrilo libre de la β -lg nativa, lo que causa un aumento en la reactividad de la β -lg. La reacción de propagación corresponde a la formación de agregados por medio de reacciones de intercambio tiol/disulfuro entre el intermediario activado con un grupo libre tiol reactivo y la β -lg nativa o no reactiva. En el paso de terminación, dos intermediarios activos reaccionan para formar un polímero unido por enlaces disulfuro de mayor tamaño, sin grupos tiol reactivos expuestos. Este modelo se ajusta a la agregación de β -lactoglobulina a pH cercanos a 7 y calentada a temperaturas relativamente bajas (65 °C), incluso por debajo de la temperatura de pico de desnaturalización. En estas condiciones, este modelo da una descripción correcta de la reducción en la concentración de β -lactoglobulina nativa y en el aumento en la intensidad de luz difractada, que está involucrada en la formación de agregados (Hoffmann et al., 1996). Estudios posteriores, llevados a cabo utilizando cromatografía de exclusión bajo similares condiciones (Hoffmann et al., 1997c) mostraron que la distribución de pesos moleculares de los intermediarios producidos por calentamiento varían fuertemente con las condiciones de calentamiento. Por técnicas de cromatografía de exclusión se observó la formación de varios intermediarios de relativamente bajo peso molecular en las primeras etapas de calentamiento. Al aumentar el tiempo de calentamiento, se convierte más proteína nativa en nuevos agregados o formando parte de los ya existentes. Una variación en las condiciones del proceso tales como concentración de la proteína, pH o temperatura de calentamiento, produce grandes variaciones en el tipo de agregados formados y las uniones involucradas en la formación de los mismos.

Bajo condiciones similares de calentamiento (67,5 °C), Bauer et al. (1998) estudiaron la formación y tipo de intermediarios involucrados en la agregación de la β -lactoglobulina. En este

estudio se determinó que durante el calentamiento, el porcentaje de monómeros de β -lg en la solución era siempre inferior al 5%. De acuerdo a estos resultados, un importante paso en la agregación de la β -lg sería la formación de oligómeros pequeños, formados por tres a cinco unidades de β -lg. En estudios posteriores se observó que los oligómeros alcanzan un máximo de concentración cerca del tiempo al cual comienzan a aparecer los agregados de mayor tamaño, luego del cual éstos disminuyen su concentración (Bauer et al., 2000). En este proceso, se formaría inicialmente un núcleo central de cuatro unidades de β -lg, por medio de uniones disulfuro, que luego se uniría a otros oligómeros por uniones no covalentes para la formación de agregados de mayor tamaño. Por lo tanto, el mecanismo propuesto por estos autores podría resumirse en el siguiente esquema:



Este mecanismo involucra una disociación de dímeros y desplegamiento de los monómeros (monómeros activados), seguido de la formación de agregados de bajo peso molecular, que se asocian entre sí, dando lugar a la formación de grandes agregados proteicos.

Este mecanismo difiere del modelo propuesto por Roefs y de Kruif (1994) en el cual los agregados crecerían por adición de monómeros por medio de uniones disulfuro intermoleculares.

Sin embargo, en condiciones de calentamiento por encima de la temperatura de desnaturalización de la β -lg ($> 80\text{ }^{\circ}\text{C}$) los intermediarios producidos en la agregación serán diferentes a los observados a bajas temperaturas. Qi et al., (1995) y Schokker et al. (1999) estudiaron las primeras etapas de la agregación de la β -lactoglobulina a temperaturas altas de calentamiento y observaron una rápida formación de dímeros y trímeros, además de la rápida formación de monómeros activados. A estas temperaturas, se produce la formación de agregados de gran tamaño por unión de monómeros, trímeros y dímeros activados. Además, algunos agregados se unirían entre sí para formar partículas de tamaño aún mayor. El mecanismo propuesto a altas temperaturas sería similar al desarrollado por Roefs y de Kruif (1994). Sin embargo, al producirse un gran aumento en la velocidad de iniciación o formación de monómeros reactivos, el paso de terminación sería también más rápido, y solo se formarían agregados de tamaño relativamente pequeño. Este mecanismo sería válido a temperaturas suficientemente altas para llevar a cabo la disociación y desplegamiento de moléculas de β -lg rápidamente, de modo que la etapa de agregación sería la limitante. Otros estudios de los agregados formados durante el calentamiento a pH 7, reportan una amplia distribución de tamaños de los agregados formados.

Haque et al. (1997) estudió el cambio en la distribución de tamaños de los agregados a partir de los 35 °C, muy por debajo de la temperatura de pico de desnaturalización. El tamaño promedio de estos agregados presentaba un brusco aumento a partir de los 70 °C (> 1000 nm).

En base a los resultados obtenidos por difracción dinámica de luz Le Bon et al. (1999), propuso un modelo de dos etapas para describir la agregación térmica de la β -lg a pH neutro. Inicialmente, la desnaturalización de proteína causada por el tratamiento térmico lleva a la formación de agregados pequeños (clusters) que poseen un tamaño independiente de la concentración, temperatura y fuerza iónica. En una etapa secundaria, se agregarían estos intermediarios para formar estructuras de mayor tamaño, con una amplia distribución de tamaños de partícula. El crecimiento de los agregados es mayor con el tiempo de calentamiento, debido a que permanece en solución β -lg nativa aún después de relativamente largos tiempos de calentamiento.

La contribución de diferentes tipos de uniones en la formación de agregados no ha sido completamente comprendida hasta el momento. Se ha propuesto la formación de agregados primarios unidos por uniones disulfuro, que luego se agregarían para formar otros de mayor tamaño vía uniones no-covalentes (Hoffmann et al., 1997c),

Sin embargo, según estos autores, la mayor parte de las uniones involucradas en la agregación de la β -lg serían de tipo covalentes. Resultados similares fueron obtenidos por otros autores que confirman la importancia del grupo tiol libre en este proceso, ya que actúa como iniciador en las reacciones de intercambio tiol/disulfuro.

Si bien varios estudios proponen la agregación catalizada por las reacciones de intercambio tiol/disulfuro, las uniones no covalentes juegan un papel importante en el proceso de agregación (McSweeney et al, 1994, Qi et al, 1995, Schokker et al., 1999). Varios autores sostienen la hipótesis de que el proceso que se lleva a cabo durante el calentamiento involucra un cierto número de etapas consecutivas y paralelas, algunos de los cuales se dan por medio de reacciones de intercambio tiol/disulfuro y otras por medio de reacciones hidrofóbicas de asociación entre moléculas de β -lg.

1.1.3.2 Factores que afectan la gelificación de la β -lactoglobulina

Efecto de la variedad genética

Las variantes de la β -lg A, B y C presentan diferente susceptibilidad a la desnaturalización térmica y agregación, siendo el orden de termoestabilidad a pH 6,7 C>A>B (Manderson et al., 1998). Nielsen et al. (1996) estudiaron el comportamiento térmico de las variantes genéticas A y B a 75 °C encontrando que por debajo de una concentración del 5% la variante B se agregaba más

rápido que la A, pero por arriba del 5% la variante A parecía ser más sensible a la desnaturalización. Se atribuyó esta diferencia a la importancia relativa de las reacciones sulfhidrilo/tiol y a las interacciones no covalentes en las diferentes concentraciones. A bajas concentraciones la variante A forma agregados de tamaño intermedio, mientras que la B forma agregados de mayor peso molecular al calentar por encima de 75 °C (Manderson et al, 1998). Bauer (1998) et al. observaron que la presencia de pentámeros era característica durante el calentamiento de mezclas de la variante A, mientras que en presencia de la B se formaban tetrámeros. Las pequeñas diferencias estructurales entre las variantes puede modificar las propiedades fisico-químicas (estabilidad térmica, carga y reactividad de ciertos grupos) y por lo tanto afectar la agregación inducida por calentamiento. El cambio en el comportamiento entre las variantes A y B es consistente con una pérdida de dos grupos metilo, que perturban el equilibrio monómero-dímero y hacen a la variante B menos estable que la A. Además, como el cambio entre las variantes se encuentra cerca del grupo tiol libre en Cys 121, es razonable también pensar en una diferencia en la reactividad del grupo tiol.

Efecto de la concentración de proteína

Varios autores han estudiado las características de geles de WPI o β -lg de acuerdo a la concentración utilizada (Iametti et al., 1995, Verheul et al., 1998b). En general se observa la formación del gel en tiempos más cortos, y un aumento en la dureza y módulo elástico con la concentración. En estudios en donde se determina la temperatura de gelificación por métodos reológicos, se observa una importante reducción en la misma con la concentración (Puyol et al., 2001). Shimada et al. (1988) observaron un aumento en la firmeza de geles de WPI con la concentración a pH neutro, aunque la elasticidad de los mismos se ve levemente modificada. En estudios reológicos realizados en soluciones con concentraciones crecientes de proteína se observa un aumento gradual del módulo elástico y una menor dependencia del módulo con la frecuencia de oscilación (Fernandes, 1994).

Efecto del pH

La agregación de la β -lg es muy sensible al pH del medio, debido a que la reactividad y accesibilidad del grupo tiol depende marcadamente de este factor. Entre pH 6 y 9, la β -lg lleva a cabo un cambio y replegamiento de las cadenas, conocido como la transición de Tanford, resultando en una mayor reactividad del grupo tiol. Este comportamiento sería a causa del

aminoácido Glu89, que se encuentra oculto a pH 6,2 y se expone a pH entre 7,1 y 8,2 (Hill, 1988, Qin et al., 1998). A pH 8, el grupo tiol de la β -lg es más accesible para participar en reacciones, y aumenta la velocidad de polimerización vía uniones covalentes, mientras que a pH por debajo de 7 la molécula debe ser calentada o desplegada de otro modo para producir la exposición de los grupos tiol (Hoffmann et al., 1997a, McSwiney et al., 1994).

Hoffmann y van Mil (1997a, 1999) estudiaron la agregación de β -lactoglobulina a 65°C en un rango de pH entre 6 y 8. A todos los valores de pH en el rango de 6,4-8, las uniones intermoleculares disulfuro juegan un rol importante en la formación de los agregados. Incluso a pH 6, en el cual se forman grandes agregados vía uniones no-covalentes, las reacciones de intercambio tiol/disulfuro estarían presentes aunque en menor grado que a pH más altos. La velocidad de conversión de β -lg nativa en agregados aumenta con el pH, pero la masa molecular de los agregados disminuye notablemente (de la Fuente et al., 2002). Los agregados formados durante el calentamiento en un rango de pH 6,4-6,8 poseen un mayor peso molecular, una conformación más compacta y una carga negativa neta menor comparados con los agregados formados a mayor pH. Altos valores de pH facilitan la disociación del dímero y su consecuente desplegamiento. La disminución en el tamaño de partícula fue atribuido a que en las primeras etapas de agregación se forman una gran cantidad de intermediarios reactivos, aumentando la probabilidad de las reacciones de terminación según la teoría propuesta por Roefs & De Kruif (1994). Esto lleva a la formación de un mayor número de agregados pero de menor tamaño. El gran tamaño de los agregados formados a pH 6 es atribuido a la formación de uniones no covalentes entre los agregados primarios unidos por uniones disulfuro.

El proceso de agregación a pH ácido difiere totalmente del que se produce por encima del pI de la proteína. El intercambio tiol/disulfuro, involucrado en las reacciones de agregación a pH neutro, no ocurre a estos valores de pH, debido a que los grupos tiol son muy estables a pH ácido. A valores de pH entre 2-3 la proteína posee carga neta positiva y las interacciones entre monómeros son puramente repulsivas. Sin embargo, la intensidad de dichas repulsiones puede ser reducida con el agregado de sales, que neutralizan cargas superficiales en las moléculas de proteína. Un característica interesante de los agregados formados a pH ácido es que en presencia de agentes disociantes como el SDS, los agregados se dispersan totalmente, lo que indica que éstos se formarían por medio de uniones no covalentes. Varios estudios han reportado la formación de geles opacos en una rango de pH de 4-6, mientras que por encima y por debajo de ese rango se forman geles translúcidos (Stading & Hermansson, 1991, Langton & Hermansson, 1992, 1996). Los geles translúcidos tienen en general estructuras de tipo “fine-stranded” y sus propiedades reológicas son dependientes del pH. Los geles de tipo fine-stranded formados a pH ácido son débiles y frágiles (Errington et al., 1998). En estudios recientes se han descrito las propiedades de los agregados de

β -lg formados a pH ácido (Aymard et al., 1999, Shokker et al, 1999). Al calentar a temperatura alrededor de los 80 °C se forman grandes agregados con un peso molecular de alrededor de 10^7 Da, mientras que no se detectan agregados de tamaño intermedio como lo observado a pH neutro. El tamaño de los agregados aumenta levemente con el tiempo de calentamiento y la fuerza iónica, y es independiente de la concentración de proteína.

Los geles translúcidos formados por encima de pH 6 son fuertes y elásticos, con altos valores de esfuerzo y deformación de fractura (Stading et al., 1991, Tang et al., 1995). El factor que afecta más fuertemente las características de los geles formados a pH ácido es la disminución en las reacciones de intercambio tiol/ disulfuro, a diferencia de lo que ocurre a pH neutro (Errington et al., 1998). Los ensayos de grandes deformaciones permiten observar las diferencias entre geles transparentes formados a pH ácidos o alcalinos (Stading et al., 1991)

Velocidad y temperatura de calentamiento

Tanto la temperatura como la velocidad de calentamiento, afectan las características estructurales de geles de β -lg. Stading et al. (1993) reportaron que las variaciones en la velocidad de calentamiento entre 12 y 0,1 °C/min a pH 5,3 llevan a la formación de estructuras con una mayor distribución de tamaño de partícula, y cadenas de agregados más gruesas. Este efecto incluso es mayor al observado al variar el pH entre 4,5 y 7,5. Verheul et al. (1998a) observaron un aumento en la rigidez de los geles con un aumento en la temperatura entre 65 y 80 °C, debido probablemente a una mayor cantidad de proteína agregada. Las propiedades de fractura y dureza de los geles tiende a aumentar con un aumento en los tiempos y temperaturas de gelificación (Foegeding et al., 1995). El efecto producido por el aumento de temperatura es comparable al de aumento en la temperatura de calentamiento (Foegeding et al., 1995). Stading et al. (1992) describió la formación de inhomogeneidades en la estructura de geles “fine-stranded” formados a pH 7,5 al disminuir la velocidad de calentamiento.

Presencia de sales y otros solutos

La presencia de sales afecta el proceso de gelificación ya que neutraliza parte de las cargas superficiales de la proteína en solución y disminuye las repulsiones electrostáticas entre las moléculas, especialmente a valores alejados del punto isoeléctrico de la proteína. A pH 8, las repulsiones electrostáticas entre moléculas de β -lg son tales que dificultan la formación de enlaces entre moléculas desplegadas, por lo que solo se logra la gelificación a altas concentraciones

proteicas. La presencia de sales suprime parte de estas repulsiones y favorece la gelificación, disminuyendo además la concentración necesaria para gelificar. En presencia de altas concentraciones de NaCl la agregación física toma una mayor importancia y se observa la formación de grandes agregados durante el calentamiento (Verheul et al., 1999).

Bowland et al. (1995a) investigaron el efecto del agregado de aniones divalentes y monovalentes en la gelificación térmica de proteínas del lactosuero. Mediante ensayos de fractura de los geles se determinó la formación de estructuras de tipo “fine-stranded”, mixtas o particuladas al variar la fuerza iónica de las soluciones. La variación simultánea de concentraciones de iones Ca^{++} y Na^{+} permite obtener geles opacos o transparentes, que muestran diferentes microestructuras y propiedades texturales (Bottcher et al., 1994). La presencia de lactosa inhibe la gelificación térmica de soluciones de WPI. Esto es debido a que los azúcares ejercen un efecto protector contra la desnaturalización térmica (Morr y Ha, 1993).

El efecto del agregado de sales en la agregación de β -lg a pH ácido tiene dos efectos contrapuestos: por un lado, el aumento en la fuerza iónica reduce la repulsión intermolecular por neutralización de grupos cargados, lo que aumenta la velocidad de agregación. Por otro lado, el aumento en la fuerza iónica aumenta la temperatura de desnaturalización, debido a un aumento en la estabilidad conformacional de la proteína. Debido a que el desplegamiento de la proteína es el paso inicial para la agregación, la reducción en la velocidad de desplegamiento llevará a una reducción en la velocidad de agregación.

1.1.4. GELIFICACIÓN DE SISTEMAS MIXTOS β -LG/POLISACÁRIDOS

1.1.4.1 Formación de geles mixtos en condiciones de incompatibilidad termodinámica

La morfología de geles de proteína/polisacáridos obtenidos en condiciones de incompatibilidad termodinámica y sus propiedades mecánicas están determinadas en primera instancia por las propiedades del sistema líquido inicial (una o dos fases) y la posibilidad de gelificación del polisacárido y la proteína. En el caso de que los biopolímeros puedan gelificar, su concentración en el sistema debe ser mayor a la concentración crítica necesaria para gelificar.

Tolstoguzov (1997b) ha podido relacionar los diagramas de fase de varios sistemas mixtos con las posibles estructuras de los geles mixtos. En mezclas de proteínas y polisacáridos gelificantes se forman geles mixtos si la concentración de ambos es superior a la mínima necesaria para gelificar. Las concentraciones críticas de varios polisacáridos aniónicos se encuentran generalmente entre 0,1 – 0,3% y para las proteínas el rango de concentración es de 5 a 13 %. Si ambos biopolímeros están

por encima de la concentración crítica de gelificación y no ocurre separación de fases (si la concentración del sistema se encuentre por debajo de la curva binodal), se formará un gel mixto homogéneo. La existencia de fenómenos de volúmenes de exclusión entre las moléculas de los diferentes biopolímeros pueden de todas formas afectar la cinética de gelificación de uno o de ambos componentes (Dickinson & McClements, 1995).

Por el contrario si la concentración del sistema se encuentra por encima de la curva binodal se formarán emulsiones “agua en agua” que al gelificar formarán geles de diferente grado de heterogeneidad dependiendo de las velocidades relativas de separación de fases y gelificación que pueden ser controladas mediante varias condiciones del proceso, tales como la velocidad de calentamiento/enfriamiento, el esfuerzo de corte aplicado y el pH. Existe una concentración particular para estos sistemas denominada “punto de inversión de fases” donde el sistema cambia de una matriz gelificada de A conteniendo inclusiones de B a una matriz de B conteniendo inclusiones de A (Brownsey & Morris, 1988). Este fenómeno es análogo a la inversión de fases en emulsiones.

Los efectos sinérgicos en un sistema de dos fases ocurren cuando el gel mixto se encuentra formado por una fase continua constituida por el biopolímero de más fuerte carácter gelificante y el otro biopolímero está presente en la fase dispersa gelificada. Sin embargo, la fase dispersa puede ser tan diluida que no ocurre la formación del gel en dicha fase. Los geles “rellenos” con partículas líquidas de uno de los biopolímeros pueden formarse cuando uno de los biopolímeros está presente en concentraciones por debajo de la crítica de gelificación o en mezclas de un agente gelificante con uno no-gelificante (Tolstoguzov, 1997b). En la **Figura I.1.3** se muestran las posibles características de geles mixtos de proteínas/polisacáridos formados de acuerdo a la concentración del sistema inicial.

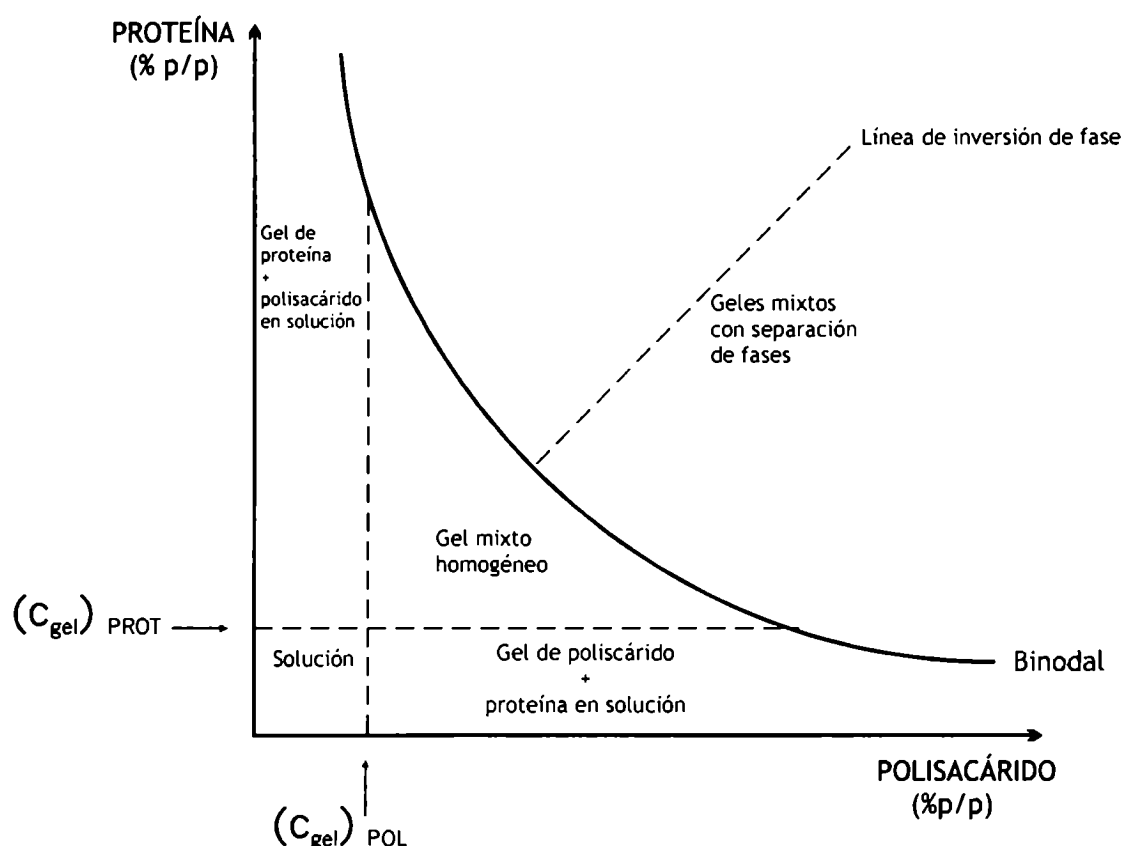


Figura 1.1.3 Diagrama de fases para mezclas de hidrocoloides en relación al tipo de geles que se formarán por tratamiento térmico. $(C_{gel})_{PROT}$ y $(C_{gel})_{POL}$ son las concentraciones críticas para la gelificación de la proteína y el polisacárido.

1.1.4.2 Geles mixtos de WPI o β -lg y polisacáridos

En la mayoría de los estudios de geles mixtos de proteínas del suero y polisacáridos formados en condiciones de incompatibilidad termodinámica, se utilizan concentraciones de proteína por encima de la mínima necesaria para gelificar, que es de aproximadamente un 10% (Beaulieu et al., 2001; Syrbe et al., 1995; Zasytkin et al., 1996; Turgeon & Beaulieu, 2001; Walkenstrom et al., 1998; Fernández, 1994; Ndi et al., 1996), dependiendo de las condiciones del medio, tales como pH, fuerza iónica y características del aislado (composición, presencia de sales).

El calentamiento se realiza a temperaturas superiores a la de pico de desnaturalización (75-90 °C). También se ha reportado la obtención de geles mixtos (WPI/xántica) por aplicación de tratamientos de alta presión (Zasytkin et al., 1996).

La presencia de polisacáridos en estos sistemas se refleja en diferentes formas: disminución de la concentración mínima de proteína necesaria para gelificar (Zasytkin et al., 1996, Turgeon &

Beaulieu, 2001; Ndi et al., 1996) , disminución en la temperatura o tiempo de gelificación respecto a geles de proteína sola (Bryant et al., 2000), variación en la firmeza o textura (Zasytkin et al., 1996, Olsson et al., 2002b), modificación en la microestructura del gel (geles particulados o “fine-stranded”) (Zasytkin et al., 1996; Olsson et al., 2002a), cambio en la apariencia y retención de agua de los geles (Beaulieu et al., 2001, Olsson et al., 2002b).

Las características de los polisacáridos presentes en el sistema mixto determina muchas de las propiedades de los geles obtenidos. Los polisacáridos estudiados en la gelificación de proteínas del suero son: goma xántica (Zasytkin et al., 1996; Bryant et al., 2000; Walkenstrom et al., 1998) , κ , λ o ι -carragenano (Ould Eleya y Turgeon, 2000; Turgeon y Beaulieu, 2001) , metilcelulosa (Syrbe et al., 1995;), pectinas (Syrbe et al., 1995; Beaulieu et al., 2001, Turgeon & Beaulieu, 2001, Wang y Qvist, 2000), alginato de sodio (Neiser et al., 1998, 2000), dextrano (Syrbe et al., 1995;), goma guar (Syrbe et al., 1995; Fernández, 1994), locust bean (Fernández, 1994).

En presencia de polisacáridos no-gelificantes se obtienen geles en los cuales el polisacárido se encuentra disperso en la fase acuosa de la matriz gelificada de proteína o en forma de relleno. Syrbe et al. (1995) observaron la formación de geles “rellenos” partiendo de soluciones homogéneas de WPI y polisacáridos no-gelificantes o gelificantes (goma guar, goma xántica, pectina, metilcelulosa, κ -carragenano) en concentraciones inferiores a la crítica para gelificar. En sistemas mixtos de β -lg y pectinas con diferente grado de esterificación se observó la formación de una fase proteica gelificada conteniendo una fase dispersa enriquecida en el polisacárido (Beaulieu et al., 2001).

Aún sin que se produzca una separación macroscópica de fases, la existencia de interacciones repulsivas entre proteína y polisacárido puede producir importantes efectos en la cinética de gelificación de uno o ambos componentes, así como en la microestructura y reología del gel resultante (Dickinson, 1993).

Las características moleculares de los polisacáridos influyen en gran medida en las propiedades de los geles. Por ejemplo, un mayor grado de esterificación de polisacáridos tales como pectinas o alginatos disminuye la carga neta negativa de los mismos a $\text{pH} > \text{pI}$, con lo que disminuye la repulsión electrostática entre polisacárido-proteína (Beaulieu et al., 2001).

Ould Eleya y Turgeon (2000) realizaron una caracterización reológica del proceso de gelificación de sistemas mixtos de β -lg + κ -carragenano, observándose la gelificación de la matriz de β -lg durante el calentamiento (90 °C), y la posterior gelificación de la fase dispersa durante en enfriamiento. En este tipo de sistemas, debido a que la β -lg forma geles irreversibles, con posteriores calentamientos del sistema se obtiene la fusión del gel termorreversible de polisacárido contenido en la matriz proteica.

La presencia de sales utilizadas normalmente para inducir la gelificación de proteínas del suero (NaCl, CaCl₂, NaSO₄) puede producir un efecto de “screening” sobre las moléculas de ambos biopolímeros, modificando las condiciones de incompatibilidad y por lo tanto las características de los geles formados (Ould Eleya y Turgeon, 2000; Beaulieu et al., 2001, Turgeon y Beaulieu, 2001).

I.2

Objetivos

I.2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la dinámica de la gelificación y propiedades de los geles de β -lg en presencia de polisacáridos no-gelificantes.

El estudio se realizará a pH 6-7, es decir por encima del pI de la β -lg (5,2), principalmente en una concentración de β -lg (6%) donde por sí sola no gelifica. Si bien en estos sistemas no hay separación de fases, existen fenómenos de volúmenes de exclusión.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Analizar la habilidad de diferentes polisacáridos en promover la gelificación de la β -lg y caracterizar las propiedades micro y macroestructurales de los geles formados.
- 2) Estudiar el efecto de los diferentes polisacáridos en la desnaturalización de la β -lg.
- 3) Estudiar el efecto de los diferentes polisacáridos en la agregación de la β -lg.
- 4) Estudiar el efecto de variables como el pH, concentración del polisacárido y sólidos totales, tiempo y temperatura en algunos aspectos del proceso de gelificación de la β -lg y en las características de los geles formados.
- 5) Analizar qué tipo de interacciones se establecen entre la β -lg y los polisacáridos en la gelificación.

I.3

Materiales y Métodos

1.3. MATERIALES Y MÉTODOS

1.3.1 Materiales

Se utilizó un concentrado de proteínas de suero lácteo con alto porcentaje de β -lactoglobulina conteniendo las variantes A y B de la misma. El mismo fue donado por la firma Besnier & Bridel (Francia). En la **Figura I.3.1** se muestra una electroforesis en condiciones disociantes (con SDS) en donde se observa que el concentrado posee mayoritariamente β -lg (PM= 18 kDa) en su forma monómerica, y un bajo porcentaje de β -lg dimérica en las condiciones del buffer de corrida (pH 6,8), por lo cual el concentrado proteico se denominará en el trabajo como β -lactoglobulina.

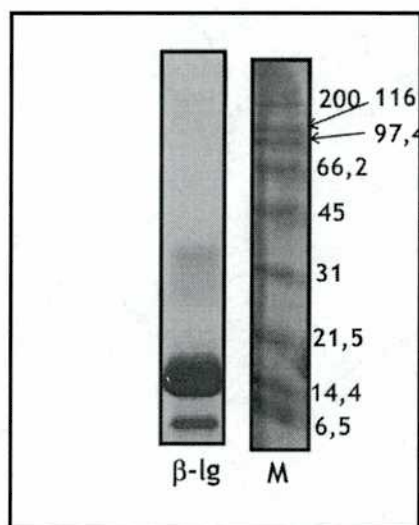


Figura I.3.1. SDS-PAGE electroforesis del concentrado de proteínas del suero lácteo. M= Marcador de peso molecular (kDa)

Para la realización de los estudios se utilizaron dos lotes del concentrado. El contenido promedio de proteína determinado por el método de Kjeldahl (Kjeltec Auto Analyzer, Tecator), fue de 85,2 % en base seca.

Los polisacáridos utilizados (Sanofi Bioindustries) fueron: Goma Xántica (XAN), kappa y lambda carragenano (κ -C y λ -C), goma guar (GG) y alginato de propilenglicol (PGA).

1.3.2. Preparación de soluciones de proteína y polisacáridos

Las soluciones de proteína se prepararon disolviendo la cantidad pesada de concentrado proteico en agua destilada bajo constante agitación suave. El pH se ajustó al valor requerido con HCl o NaOH 0,1N.

Las soluciones de polisacáridos se prepararon disolviendo los mismos en agua destilada con agitación constante hasta hidratación y disolución completa de los mismos. En la mayoría de los casos la preparación se realizó con agua a temperatura ambiente, debido a que la mayoría de las gomas presentan alta solubilidad en frío. En el caso del κ -C, el mismo fue hidratado y dispersado en agua a temperatura ambiente, y luego se llevó a 80 °C para lograr su completa disolución. Para prevenir el crecimiento microbiano en todos los sistemas se agregó azida sódica en una concentración de 2 ppm.

Las soluciones mixtas de β -lg + polisacáridos se obtuvieron mezclando partes iguales de las soluciones de cada biopolímero, que fueron preparadas al doble de la concentración requerida. Las soluciones fueron agitadas por 30 minutos o por periodos más prolongados en sistemas muy viscosos, para lograr una dispersión total de las soluciones. Luego de la mezcla, se midió el pH de las soluciones y se ajustó en caso de ser necesario.

Obtención de los sistemas de deshidratados

Para obtener los sistemas mixtos deshidratados que fueron utilizados en los ensayos calorimétricos, se liofilizaron soluciones mixtas de proteína+polisacáridos en liofilizador Stokes por 48 hs. Posteriormente los mismos se equilibraron a 25 °C durante 1 semana a dos actividades de agua (a_w) de 0,65 y 0,80.

1.3.3. Métodos

1.3.3.1 Calorimetría diferencial de barrido

Para el estudio de las transiciones térmicas de la proteína sola y en presencia de los polisacáridos se utilizó un calorímetro diferencial de barrido Mettler TA 4000. El análisis de los termogramas se realizó mediante el software TA72. Se realizó una previa calibración utilizando indio puro.

Se utilizaron crisoles de aluminio de 40 μ l y de 160 μ l. Debido a las diferencias en los resultados dependiendo de la cantidad de muestra utilizada, en la sección de resultados se indicará en cada caso qué tamaño de muestra y tipo de crisoles se utilizó en las determinaciones.

Como referencia se utilizaron crisoles vacíos. Se trabajó a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, y el rango de temperatura barrido fue de 5 a 95 °C en las soluciones y de 5 a 130 °C en los sistemas deshidratados.

Parámetros calorimétricos

Se evaluaron las temperaturas de inicio y de pico de desnaturalización así como el cambio de entalpía aparente (ΔH_T) involucrado.

La temperatura de inicio (T_{onset}) se obtuvo por intersección de la línea de base con la pendiente inicial de la curva al iniciarse la transición térmica (Relkin, 1994). La temperatura de pico (T_p) de la endoterma, que indica la temperatura aparente de desnaturalización de la proteína, fue determinada en el punto de máximo flujo calórico para las condiciones de corrida.

El cambio de entalpía correspondiente al proceso de desnaturalización térmica de la proteína (ΔH_T) se obtuvo integrando el área de la endoterma entre los valores de inicio (T_{onset}) y de finalización (T_f), utilizando una línea de base polinomial ajustada entre los valores de inicio y fin. Además se calculó el valor de cambio de entalpía hasta la temperatura de pico ($\Delta H_{1/2}$).

Los parámetros calorimétricos mencionados se representan en la **Figura I.3.2**.

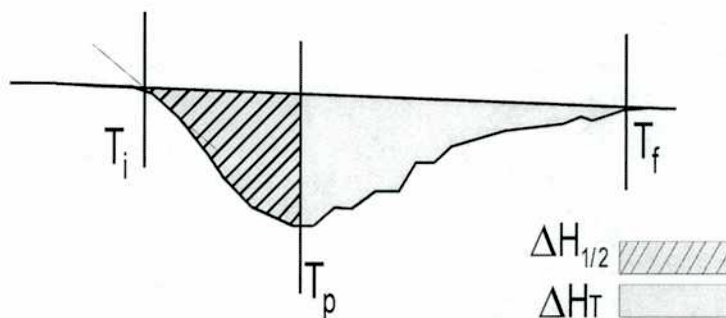


Figura I.3.2. Parámetros calorimétricos evaluados en relación a la desnaturalización de la β -lactoglobulina

Parámetros cinéticos

A partir de las endotermas obtenidas durante el calentamiento pueden obtenerse los parámetros cinéticos del proceso de desnaturalización.

El método desarrollado por Borchardt and Daniels (1957), es utilizado ampliamente para la determinación de constantes de velocidad (k_T) (Hoffmann et al, 1995). Este método se basa en las diferencias en el flujo calórico (dH/dt , en mJ/s) entre la muestra y la referencia (línea de base) en un rango de temperatura entre T_{onset} y T_p (De Wit y Swinkels, 1980). La constante de velocidad de la reacción a una dada temperatura puede ser expresada como:

$$k_T = A \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{R \cdot T}\right) = \left(\frac{\Delta H_T}{c_0}\right)^{n-1} \cdot \frac{dH/dt_{(T)}}{(\Delta H_{rem(T)})^n} \quad \text{Ec.(I.3.1)}$$

donde k_T es la constante cinética, E_a la energía de activación, A el factor pre-exponencial, n el orden de la reacción, c_0 la concentración inicial de reactante, ΔH_T el cambio de entalpía total, ΔH_{rem} el cambio de entalpía remanente a la temperatura evaluada y dH/dt el flujo calórico a la temperatura T .

Para obtener los diferentes parámetros se graficaron los valores de $\ln(k_T)$ vs $(1/T)$ para varios valores de n . El orden de la reacción fue determinado como el valor de n que mejor ajustó una regresión lineal (Borchardt & Daniels, 1957).

Una vez calculada la constante de velocidad de reacción a una dada temperatura, el porcentaje de β -lg nativa remanente en función del tiempo de tratamiento a dicha T , puede calcularse integrando la siguiente expresión:

$$-dc/dt = k_T \cdot c^n \quad \text{Ec (I.3.2)}$$

donde c es la concentración de proteína en la solución, k_T es la constante de velocidad evaluada a temperatura T y n es el orden de la reacción (Hillier y Lyster, 1979).

1.3.3.2 Electroforesis

Las soluciones de proteína y de los sistemas mixtos fueron analizadas antes y luego de los tratamientos térmicos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida utilizando una celda doble Mini Protean II de Bio-Rad.

El calentamiento de las soluciones se realizó en tubos de vidrio conteniendo aproximadamente 6 ml de muestra en un baño seco (Thermolyne Dry Bath, USA). A tiempos consecutivos, se retiraron 0,5 ml de muestra que se colocaron en tubos eppendorf realizando el enfriamiento en baño de hielo y agua. Posteriormente, las muestras fueron diluidas primero en agua destilada y luego en el buffer de corrida para su siembra.

Los ensayos fueron realizados de acuerdo al método de Laemmli (1970) en las siguientes condiciones.

Las condiciones fueron las siguientes:

Espesor de gel: 0,75 mm

Volumen de siembra: 20 μ l

Relación buffer de corrida/muestra: 4:1

Masa de concentrado proteico en la siembra: 40 μ g

Gel de corrida: 12-15% acrilamida, buffer 1,5M Tris-HCl (pH 8,8)

Gel "stacking": 4 % acrilamida, buffer 0,5% Tris-HCl (pH 6,8)

Corriente: 500 mA

Voltaje: 200 V

Se realizaron electroforesis tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes. Con el objetivo de diferenciar la formación de enlaces covalentes y no-covalentes se realizaron ensayos en condiciones disociantes con dodecil-sulfato de sodio (SDS) y con SDS + β -Me respectivamente.

Luego de la corrida, los geles fueron teñidos en una solución de 0,1% Coomassie Blue disuelto en una mezcla 9:9:2 agua-metanol-ácido acético glacial, y desteñidos en una mezcla 8:1:1 de agua-metanol-ácido acético glacial.

1.3.3.3 Dispersión dinámica de luz (DLS)

Las soluciones utilizadas fueron preparadas con agua doblemente filtrada (0,2 nm Millipore), con el objetivo de eliminar todas las partículas de polvo presentes que pudieran interferir en las mediciones.

La agregación de la β -lactoglobulina y los sistemas mixtos se llevó a cabo por calentamiento en tubos de vidrio cerrados conteniendo aproximadamente 6 ml de solución en un baño seco a temperatura constante. En tiempos sucesivos se retiró 1 ml de muestra, se colocó en un tubo eppendorf de 1,5 ml y se enfrió inmediatamente en un baño de hielo.

Las muestras fueron diluidas con agua desionizada para no introducir ningún tipo de impureza que pudiera interferir en la medición. La dilución a realizar se determinó en cada caso de modo de obtener una buena señal de medida, lo cual fue evaluado por el conteo de partículas promedio.

Las mediciones se realizaron en un Fotómetro de dispersión dinámica de luz láser de la firma Brookhaven Instruments, provisto de laser He-Ne (632,8 nm) y un Correlator Digital modelo BI-2000. Las medidas fueron realizadas con un ángulo de dispersión fijo de 90°. La cubeta de cuarzo en la que se colocó la muestra fue termostatzada a 25 °C en un baño termostatzado externo.

Se evaluaron la intensidad dispersada promedio (I_s) relacionada al número, tamaño y velocidad de formación de los agregados de β -lg (Hoffman, 1996) y el diámetro hidrodinámico aparente (d_h) calculado para agregados de geometría esférica. Tanto I_s como d_h fueron obtenidos de la función de autocorrelación de la intensidad de luz dispersada. El diámetro promedio fue estimado por el método de cumulantes (Kopel, 1972). La intensidad de luz dispersada fue calculada de la línea de

base de la función de autocorrelación para lo cual se utilizó un software de la firma Brookhaven Institute.

1.3.3.4 Determinación de la viscosidad de soluciones

Se determinó la viscosidad de las soluciones de polisacáridos (0,5%) en un viscosímetro Brookfield DV-LVT con cono y plato a 20 °C. Se utilizaron los conos CP41 y CP52, de diámetros 2,4 y 4,8 mm respectivamente. En el rango de velocidad de deformación de 10 a 120 s⁻¹. Se obtuvieron los valores de esfuerzo de corte frente a las velocidades de deformación. Los datos fueron ajustados mediante la ecuación de Herschel Burkley, según:

$$\tau = \tau_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n \quad \text{Ec (1.3.3)}$$

donde τ es el esfuerzo de corte, $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación, K es el coeficiente de consistencia, n es el índice de flujo y τ_0 es el umbral de corte para velocidad de deformación nula.

1.3.3.5 Reometría dinámica.

La reometría dinámica es una técnica que involucra pequeñas-deformaciones por lo cual es de suma utilidad para el estudio de la transición sol-gel y para la caracterización del comportamiento viscoelástico de geles en la “región lineal”, en la cual las amplitudes de deformaciones y esfuerzos son suficientemente bajos para asegurar la proporcionalidad deformación-esfuerzo (Matsumura y Mori, 1996).

Para una respuesta elástica ideal, el esfuerzo resultante estará en fase con la deformación aplicada; para una material viscoso ideal, la respuesta estará desfasada en 90° respecto de la deformación aplicada.

En un experimento de reología dinámica oscilatoria, la relación entre la deformación y esfuerzo está descrita por el módulo complejo:

$$G^* = G' + i G''$$

donde G' es el modulo de almacenamiento (o elástico) y G'' es el módulo de pérdida (o viscoso).

G' da una idea de la energía almacenada en la red tridimensional, G'' de la energía disipada por la muestra en forma de flujo. La tangente de pérdida ($\tan\delta$) es la relación entre el módulo viscoso y elástico, G''/G' . El ángulo de desfase δ indica el carácter viscoelástico del material.

Las mediciones se realizaron en un reómetro oscilatorio dinámico Phar Physica MCR 300 con control de esfuerzo. La geometría de medición utilizada fue la de platos paralelos, utilizando un plato de diámetro 29,95 mm (PP30/S), con un “gap” de 1mm. Se colocaron aproximadamente 0,7 ml de muestra entre los platos, lo que permitió llenar completamente el espacio entre los platos. Las superficies de los platos y el área expuesta de muestra fueron cubiertos con silicona líquida para evitar la adherencia de la misma a los platos y prevenir evaporación de agua de la misma. La temperatura se controló mediante un sistema Peltier conectado a un baño termostatzado (Viscotherm VT2, Phar Physica).

Determinación del punto gel y evolución de parámetros viscoelásticos

En el proceso de gelificación se parte de una solución, registrándose parámetros típicos de un sistema líquido, en el cual $G'' > G'$. Durante el calentamiento de la solución se produce un aumento en el módulo elástico con la consiguiente reducción en $\tan\delta$. La evolución de estos parámetros, así también como los valores finales alcanzados serán característicos de diferentes tipos de geles.

Para la determinación del punto de gelificación se siguió el siguiente procedimiento:

Se colocó la muestra en el sistema de medición, el cual se termostatzó a la temperatura inicial de calentamiento. El sistema fue luego calentado mediante una rampa hasta la temperatura deseada de calentamiento. La velocidad de calentamiento en esta rampa fue entre 5 y 25 °C/min según el ensayo. Luego de haber llegado a la temperatura final, el sistema se mantuvo a temperatura constante por un intervalo de tiempo necesario para lograr un valor de equilibrio de G' cuando era posible.

Se registró la evolución del módulo elástico (G'), módulo viscoso (G''), módulo complejo (G^*) y tangente del ángulo de pérdida ($\tan\delta = G''/G'$), utilizando una deformación de 0,01% y una frecuencia de 1 Hz. Estas condiciones fueron determinadas previamente mediante ensayos en los cuales se evaluó la zona de viscoelasticidad lineal de los sistemas. Además, en el tipo de ensayos realizados era necesario aplicar una deformación mínima ya que se parte de un sistema líquido al comienzo de las mediciones.

El punto de gelificación de los sistemas se determinó como el punto de cruce entre G' y G'' , o sea, a $\tan\delta=1$. En los sistemas con goma xántica, se observó que el valor inicial de G' era mayor al de G'' , por lo que se determinó el punto de gelificación como el de inicio de aumento de G' .

En todos los casos se observó que la gelificación se producía en la etapa de temperatura constante, independientemente de la velocidad de la rampa de calentamiento, por lo que el parámetro determinado fue el tiempo de gelificación (t_{gel}) a la temperatura de calentamiento.

Se siguió la evolución de los parámetros viscoelásticos durante todo el proceso de calentamiento. Luego el sistema fue enfriado a una velocidad de 25 °C/min hasta temperatura ambiente.

Dependencia de los parámetros con la frecuencia de oscilación

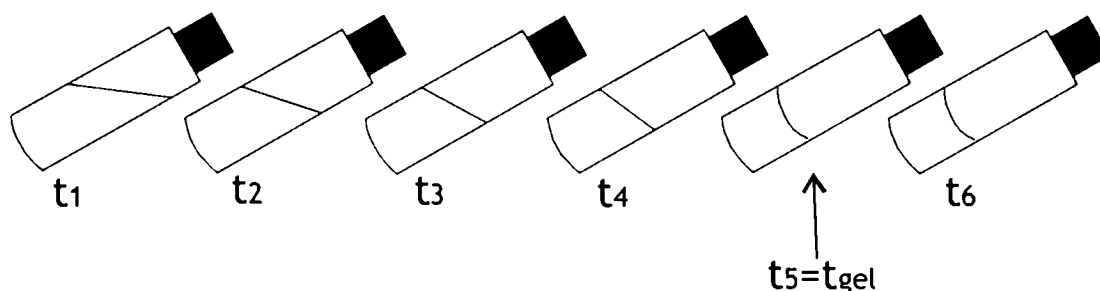
Las muestras, luego de ser enfriadas se mantuvieron en el sistema de medición para la realización del barrido de frecuencias el cual se realizó a una deformación de 1%, entre 0,01 a 10 Hz. Según lo descripto por Stading y Hermansson (1992), la dependencia de módulo elástico con la frecuencia da información acerca del tipo de estructura del gel. El grado de dependencia de G' con la frecuencia puede ser expresado por medio de la constante n según:

$$\log G' = n \cdot \log f + K \quad \text{Ec. (I.3.4)}$$

donde G' es el módulo elástico, f es la frecuencia de oscilación, y K una constante.

I.3.3.6 Ensayo de “tilting”

Para la evaluación visual del tiempo de gelificación de los sistemas se utilizó un ensayo de “tilting” (Relkin et al., 1998a). En un baño seco a temperatura constante, se calentaron tubos conteniendo 1 ml de solución. Los mismos fueron cerrados herméticamente para prevenir evaporación de líquido. A tiempos sucesivos se retiraron los tubos del baño, y fueron enfriados a 5 °C por 24 hs. El tiempo de gelificación se determinó como el tiempo necesario para que el menisco de la solución contenida en los tubos no sufra deformación o “no fluya” al inclinarlo. En el siguiente esquema se muestra el procedimiento de obtención del punto gel.



1.3.3.7 Formación de geles

La obtención de geles para su observación visual, microscópica y la evaluación de la textura y pérdida de agua se llevó a cabo mediante calentamiento en un baño seco (Thermolyne Dry Bath) a temperatura constante. El mismo se realizó en tubos de vidrio (19 mm de diámetro x 55 mm de altura) conteniendo 6 ml de las soluciones, sellados por medio de esferitas de vidrio para prevenir evaporación de agua. Luego del tiempo de calentamiento, los tubos fueron retirados y enfriados en un baño a temperatura entre 10-15 °C. Previamente a la realización de los diferentes ensayos, los tubos fueron almacenados 24 hs a 5°C. Los geles fueron retirados de los tubos y se tomó una porción de gel de 1,5 cm de altura de la parte intermedia de los cilindros.

1.3.3.8 Ensayos de grandes deformaciones: Textura y viscoelasticidad

Textura

Los métodos empíricos son importantes en la evaluación de características de geles alimentarios. Dentro de estos ensayos se encuentran los ensayos de compresión y penetración, que permiten la obtención de parámetros tales como la dureza o firmeza de geles. El análisis de perfil de textura (TPA) es un método objetivo que se correlaciona al análisis sensorial adaptado por Bourne (1982) para ser realizado en el Instron. El ensayo TPA está basado en el reconocimiento de la textura como un atributo de múltiples parámetros. El mismo consiste en comprimir una pieza de alimento del tamaño de un bocado dos veces en un movimiento que imita la acción de la mandíbula y extraer de la curva resultante fuerza-tiempo un número de parámetros de textura. Se pueden distinguir parámetros primarios (dureza, fracturabilidad, cohesividad, elasticidad, adhesividad, resiliencia) y parámetros secundarios calculados a partir de los primarios (masticabilidad y gomosidad).

Los ensayos del perfil de textura (TPA) se realizaron en un texturómetro TA-XT2i de Stable Micro Systems. Muestras cilíndricas de geles (19 mm de diámetro x 1,5 m de altura) se comprimieron utilizando una punta de prueba cilíndrica de aluminio de 36 mm de diámetro (P/36R). Las muestras fueron comprimidas un 30 % de su altura original a una velocidad de deformación de 0,5 mm/seg. Este porcentaje de compresión fue determinado de modo de obtener repetitividad en los ensayos y evitar la fractura de la muestras durante el ensayo.

El software del equipo (Texture Expert Exceed) permite obtener a partir de las curvas de fuerza en función del tiempo los diferentes parámetros texturales. A continuación se detallan los parámetros utilizados en el presente trabajo y su cálculo a partir de la curva fuerza-tiempo:

Dureza: está definida como el máximo del pico de fuerza durante la primera compresión.

Adhesividad: La adhesividad se define como el área negativa del gráfico de fuerza vs tiempo para la primera compresión y representa el trabajo requerido para vencer las fuerzas atractivas entre la superficie del alimento y la superficie de otros materiales con los que la muestra entre en contacto.

Elasticidad: La elasticidad está relacionada a la altura que la muestra recupera durante el lapso entre el final de la primera compresión y el comienzo de la segunda.

Cohesividad: La cohesividad se define como la relación entre el área positiva de la curva correspondiente a la segunda compresión y el área de la primera compresión.

La cohesividad puede ser tomada como una medida de la velocidad con la que el material se desintegra bajo acción mecánica. Si la adhesividad es baja comparada con la cohesividad, entonces la punta de prueba quedará limpia, ya que el producto tiene la habilidad de permanecer unido.

En la **Figura I.3.3** se muestra un perfil de textura típico para un gel, y los parámetros calculados a partir de las curvas.

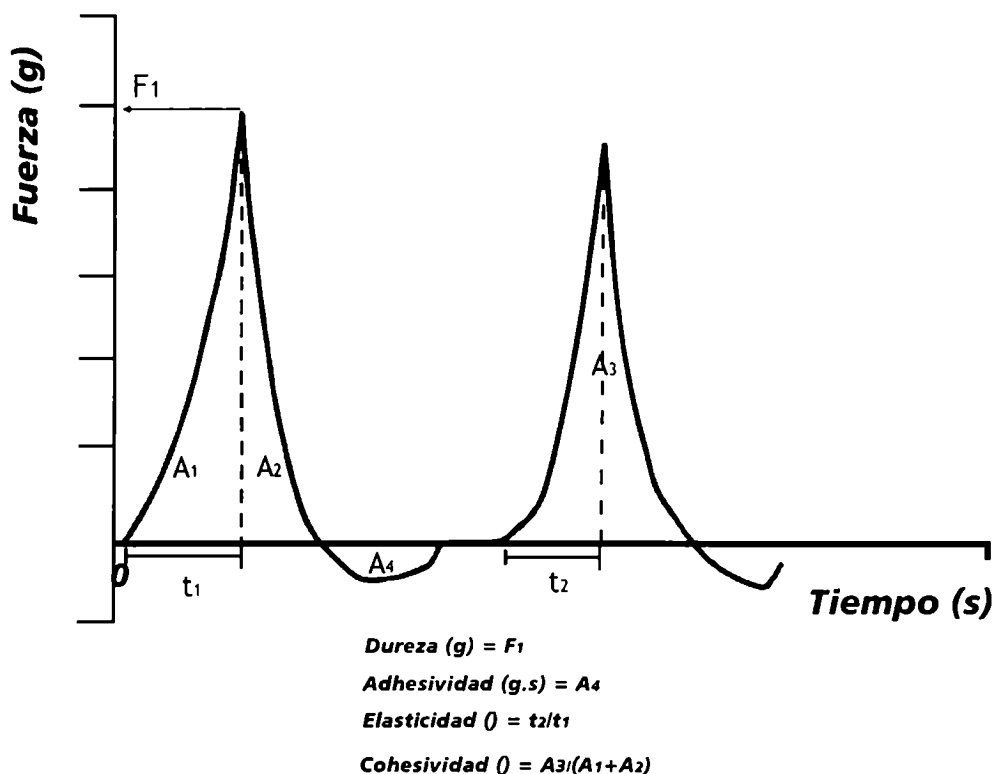


Figura I.3.3. Ensayo de perfil de textura (TPA), donde se indica el cálculo de los parámetros

Viscoelasticidad

Los geles proteicos exhiben un comportamiento viscoelástico, ya que muestran simultáneamente características propias de líquidos y de sólidos. La viscoelasticidad puede estudiarse por métodos transientes de relajación del stress o “creep compliance”. En los métodos de relajación del stress se somete la muestra a una compresión inicial, y luego se deja relajar el esfuerzo aplicado, dependiendo la respuesta del grado de viscoelasticidad del material evaluado.

La viscoelasticidad fue evaluada mediante un ensayo de relajación del stress por compresión. Muestras cilíndricas de geles fueron comprimidas a un 30 % de su altura original y se dejaron relajar por 20 minutos, registrando los valores de fuerza durante el tiempo de relajación. Las curvas de relajación fueron ajustadas mediante la ecuación desarrollada por Peleg (1979), modificada en una forma simplificada según:

$$\frac{F_0 - F_{(t)}}{F_0} = \frac{A \cdot t}{B + 1/t} \quad \text{Ec (I.3.5)}$$

donde F_0 es la fuerza inicial, $F(t)$ es la fuerza al tiempo de relajación t y A y B son constantes. El valor de A describe el nivel de decaimiento del esfuerzo; $A=0$ para un sólido elástico ideal y $A=1$ para un líquido. El valor de B describe el tiempo necesario para alcanzar $A/2$ y es una medida simple del tiempo de relajación. Las curvas obtenidas para los distintos tipos de materiales se muestran en la **Figura 2**. Los geles estudiados en este trabajo presentaron características viscoelásticas, con $0 < A < 1$.

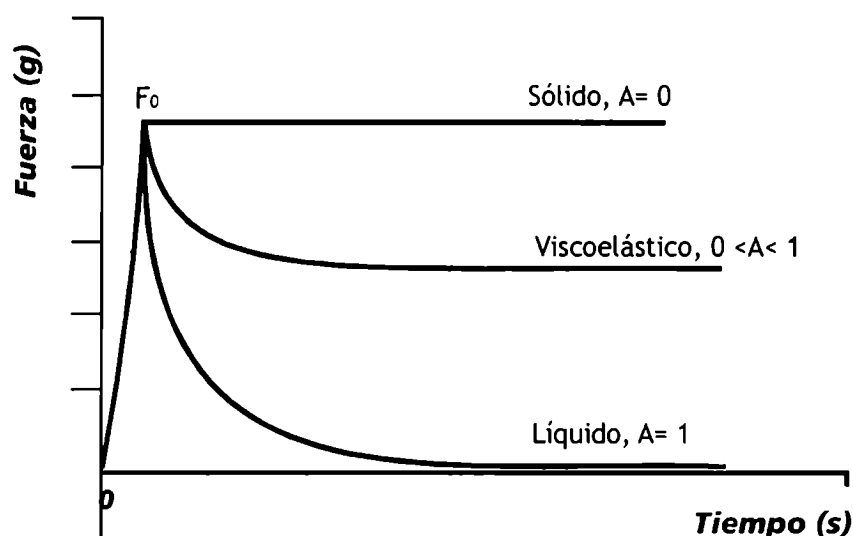


Figura 1.3.4. Curvas típicas obtenidas en ensayos de relajación por compresión para diferentes tipos de materiales

1.3.3.9 Pérdida de agua

La determinación de la capacidad de retención de agua de geles proteicos es de suma importancia en la industria de alimentos ya que puede determinar la aceptabilidad de un producto. En la mayoría de los productos gelificados, el contenido acuoso es superior al 50%, y en algunos casos pueden contener más del 95% (Barbut, S., 1996).

El fenómeno de capacidad de retención de agua ha sido descrito mediante términos tales como “water binding”, capacidad de hidratación, retención de agua, succión de agua, etc. En el presente trabajo la capacidad de retención de agua de los geles se evaluó mediante un ensayo de centrifugación a baja velocidad. Para esto, se colocó una muestra de los geles en tubos eppendorf para centrifugación, o en dispositivos especialmente diseñados con tubos dobles, con pequeñas perforaciones y lana de vidrio en el tubo interior. La centrifugación se realizó a aprox. 1000 rpm durante 2 minutos. La pérdida de agua se determinó por diferencia de pesada entre la muestra al comienzo y luego del ensayo y se expresó este parámetro como el porcentaje de pérdida de agua ($P_{H_2O} \%$) respecto del peso original de la muestra:

$$P_{H_2O} (\%) = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad \text{Ec (I.3.6)}$$

donde P_i es el peso inicial de la muestra de gel y P_f el peso de la muestra luego de la centrifugación. Para lograr repetitividad en los ensayos fue necesario mantener un tamaño de muestra constante, y realizar las pesadas inmediatamente antes y luego de la centrifugación, para evitar pérdidas de agua por evaporación.

1.3.3.10 Microscopía electrónica de transmisión y barrido

La microestructura de un gel proteico tiene directa relación con las características del proceso de gelificación y las propiedades físicas de los geles formados. La microestructura de geles de proteína puede ser caracterizada mediante microscopía óptica o electrónica. Dentro de las técnicas de microscopía electrónica, un aspecto que determina el tipo de técnica a utilizar es el tamaño de agregados que constituyen la red proteica. Las estructuras de geles particulados pueden ser caracterizadas mediante técnicas de microscopía de barrido, mientras que las de geles transparentes de tipo fine-stranded requieren del uso de microscopía electrónica de transmisión para una visualización de la red proteica (Hermansson y Langton, 1992). De hecho, los geles proteicos pueden clasificarse en diferentes tipos de acuerdo a la observación de la microestructura. Las microestructuras compuestas por cadenas cuyo diámetro corresponde a uno o varios diámetros moleculares son del tipo “fine-stranded”, mientras que las compuestas por partículas de diámetro entre 100-1000 veces mayor que el diámetro molecular son de tipo particuladas. Los geles mixtos contienen estructuras de ambos tipos (Foegeding et al., 1995). En el presente trabajo se estudiaron tanto geles del tipo “fine-stranded” como particulados, utilizándose para la observación de la microestructura la técnica más conveniente en cada caso.

Microscopía Electrónica de Barrido.

Se tomaron pequeñas fracciones de los geles (2x2x2 mm) que fueron fijadas de 10 a 24 hs a 4°C en una solución de glutaraldehído al 2% (p/p) (en buffer fosfato de sodio, pH 7.2). Las muestras fueron deshidratadas en series consecutivas de etanol/agua de concentración de etanol creciente (50, 60 ,70, 80, 90, 95 y 100%) durante 2 horas en cada solución, y secadas en un secador por punto crítico (modelo SPI DRY-CPD). Las muestras tratadas fueron fracturadas, montadas en un portamuestra de aluminio o plata y luego cubiertas por una fina capa de 100 Å de oro, por pulverizado al vacío (Polaron modelo E-5100). Se utilizó un Microscopio electrónico

Leitz, modelo AMR 1220, con un voltaje de aceleración de 10 o 15 kV. Se utilizó una magnificación de 1100X a 11000X para la obtención de las imágenes.

Microscopía electrónica de transmisión

Para el análisis de las muestras por microscopía de transmisión, se siguió el mismo tratamiento de fijación y deshidratación con etanol que para las muestras de microscopía de barrido. Luego de la deshidratación, las muestras fueron colocadas en óxido de propileno y embebidas en Epon 812 por 72 hs a una temperatura de 60 °C. Se cortaron finas secciones (40-60 nm de espesor) con un micrótomo y luego fueron teñidas con acetato de uranilo seguido por citrato de plomo. Las muestras fueron examinadas en un microscopio electrónico Jeöl 1200 EXII a una aceleración de 85 kV. Se utilizó una magnificación de 10000X.

I.4

Resultados

PRIMERA SECCIÓN

1.4.1 ESTABILIDAD TÉRMICA DE β -LG EN PRESENCIA DE POLISACÁRIDOS

1.4.1.1 Parámetros calorimétricos

El estudio de las transiciones térmicas de esta proteína es de suma importancia para la caracterización del proceso de gelificación, dado que la desnaturalización es la etapa inicial de este proceso.

La técnica de calorimetría diferencial de barrido ha probado ser un método de suma utilidad para el estudio de la desnaturalización térmica de β -lg y otras proteínas globulares (Relkin, 1996, Relkin et al., 1998b, Verheul et al., 1998c, Hoffmann et al., 1997b). La desnaturalización térmica de la β -lactoglobulina ha sido estudiada extensivamente por numerosos autores (De Wit and Swinkels, 1980; Donovan y Mulvihill, 1987; Relkin, 1994; Qi et al., 1995, 1997; Hoffmann y Van Mil, 1999, Manderson et al., 1998, Boyle et al., 2000, Apenten et al., 2002).

El desplegamiento de la β -lg durante la desnaturalización de la misma, es acompañada por una exposición de grupos polares y no polares que se encuentran ocultos en el interior de la molécula. Una vez expuestos estos grupos, el principal mecanismo de agregación es por medio de uniones covalentes entre las moléculas desplegadas. Sin embargo, una gran cantidad de estudios realizados sobre los cambios conformacionales que se dan en esta proteína durante el calentamiento, reportan la formación de agregados entre moléculas de proteína parcialmente desplegadas, por uniones predominantemente hidrofóbicas o no covalentes (Hoffman et al., 1997c). Por lo tanto, una dificultad que presenta el estudio de estos procesos es que las reacciones exotérmicas y endotérmicas que tienen lugar durante el calentamiento ocurren simultáneamente, dando lugar a un solo pico endotérmico observable en los termogramas. En este sentido, resulta de suma utilidad la aplicación de técnicas complementarias para el estudio de los cambios conformacionales que ocurren en las moléculas de β -lg. Entre estas técnicas se encuentran la dispersión dinámica de luz, cromatografía de exclusión, electroforesis en condiciones nativa y desnaturalizante, estudios de reactividad de grupos tiol, fluorescencia (Hoffman et al., 1996, Hoffman et al., 1997a, Manderson et al., 1998, Manderson et al., 1999).

La presencia de polisacáridos puede afectar el comportamiento térmico de las proteínas. En particular, por encima del pH isoelectrico de la proteína como en este trabajo pueden presentarse fenómenos de incompatibilidad termodinámica (Tolstoguzov, 1997a). En esta sección se presentan los estudios realizados sobre la β -lg y sistemas mixtos de β -lg+polisacáridos por técnicas de calorimetría diferencial de barrido, dispersión dinámica de luz y electroforesis, con el objetivo de analizar el efecto de diferentes polisacáridos en la desnaturalización de la β -lg así como obtener

información acerca del tipo de uniones involucradas y tipos de agregados formados. Los poliscáridos utilizados fueron goma xántica (XAN), goma guar (G), lambda-carragenano (λ -C), kappa carragenano (κ -C) y alginato de propilenglicol (PGA).

En la **Figura I.4.1.1** se observan los termogramas de las soluciones de β -lg y de los sistemas mixtos calentados en el rango de 5 °C a 95°C. Los estudios se realizaron sobre soluciones de β -lg sola y β -lg+polisacáridos en concentraciones de 15% de β -lg y 15%/3% β -lg/polisacáridos respectivamente. Se utilizó esta concentración relativamente alta debido a que es necesario un contenido de aproximadamente 4 mg de proteína en los crisoles (20 μ l) para una buena observación de las endotermas.

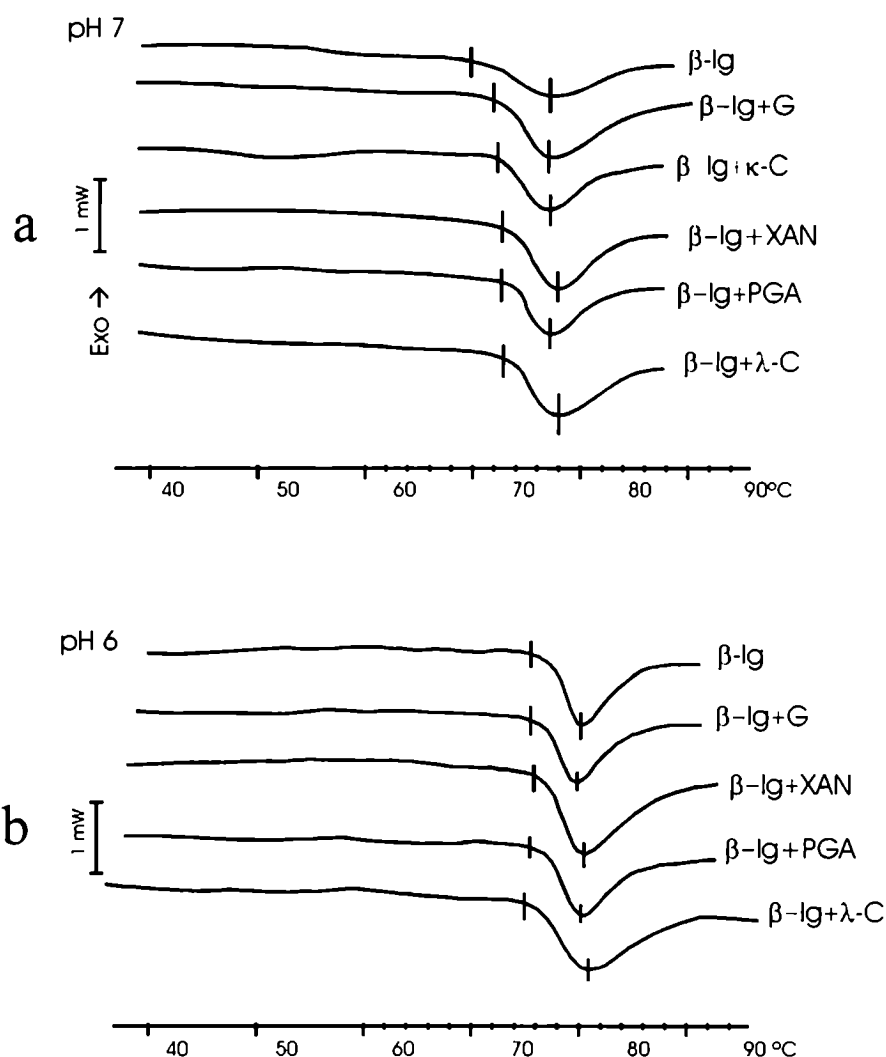


Figura I.4.1.1. Termogramas de β -lg sola (15 %) y β -lg + PS (15%/3%) a (a) pH 7 y (b) pH 6.

A pH neutro (**Fig. I.4.1.1a**) la endoterma para la β -lg es ancha, simétrica y muestra una caída gradual desde la temperatura de inicio de desnaturalización (T_{onset}). En presencia de los polisacáridos, los picos fueron más agudos y la endoterma mostró una transición asimétrica y brusca. Como se observa en la figura, la caída desde T_{onset} fue mucho más pronunciada que en el sistema de β -lg sola.

A pH 6 (**Fig. I.4.1.1b**), los termogramas mostraron una gran similitud con las curvas de los sistemas mixtos obtenidos a pH neutro, presentando un corrimiento del pico hacia mayores temperaturas.

Tabla I.4.1.1 Temperaturas de inicio y de pico de desnaturalización (T_{onset} y T_p) de β -lg (15%) en presencia de los polisacáridos (3%) a pH 6 y 7.

	pH 7		pH 6	
	T_{onset} (°C)	T_p (°C)	T_{onset} (°C)	T_p (°C)
β -lg	69,7 $\pm$ 0,1	76,8 $\pm$ 0,4	75,4 $\pm$ 0,1	79,9 $\pm$ 0,1
β -lg/ κ -C	72,3 $\pm$ 0,2	76,9 $\pm$ 0,1	77,7 $\pm$ 0,8	81,2 $\pm$ 0,1
β -lg/ λ -C	72,7 $\pm$ 0,2	78,0 $\pm$ 0,2	74,9 $\pm$ 0,4	80,1 $\pm$ 0,4
β -lg/XAN	72,5 $\pm$ 0,1	77,7 $\pm$ 0,2	75,7 $\pm$ 0,1	80,4 $\pm$ 0,1
β -lg/PGA	72,4 $\pm$ 0,2	77,1 $\pm$ 0,4	75,5 $\pm$ 0,1	80,1 $\pm$ 0,1
β -lg/G	71,8 $\pm$ 0,2	76,9 $\pm$ 0,2	75,3 $\pm$ 0,4	79,7 $\pm$ 0,4

Estudios previos sobre la β -lg muestran que esta proteína es más sensible a la desnaturalización térmica a pH más altos, y que la temperatura de pico de desnaturalización (T_p) tiende a aumentar a medida que disminuye el pH, siendo máxima la T_p en el pH isoelectrico de la proteína (Mulvihill y Donovan, 1987; Relkin, 1996, Verheul et al., 1998c). Esto se debe a que en el punto isoelectrico, la proteína presenta una estructura compacta que es más resistente al desplegamiento por efecto térmico (McSwiney et al., 1994).

En la **Tabla I.4.1.1**, se muestran las temperaturas de inicio y de pico determinadas para soluciones de β -lg sola y β -lg+polisacáridos, a pH 7 y 6. También se analizaron los polisacáridos solos, no observándose transiciones térmicas en las mismas concentraciones que en las mezclas.

Los parámetros obtenidos para la proteína sola (T_{onset} y T_p) están de acuerdo con los reportados por varios autores que estudiaron la desnaturalización de esta proteína bajo condiciones similares de pH y velocidad de calentamiento. En particular, T_p coincide muy bien con los resultados reportados por Hoffmann et al. (1995) para la misma concentración proteica. A pH neutro no se observaron diferencias entre la temperatura de pico de los sistemas mixtos y de la β -lg sola. En estudios previos se ha reportado que las temperaturas de pico de WPI (12%, pH 7) no se ven modificadas significativamente en presencia de polisacáridos como κ -carragenano o goma guar (Fernandes, 1998). Sin embargo, se observó un aumento de 2-3 °C en la temperatura de inicio de desnaturalización en presencia de los PS (**Tabla I.4.1.1**) excepto en el sistema con goma guar. A pH 6, la presencia de PS no produjo un cambio considerable en la temperatura de transición, excepto para el caso de β -lg + κ -C en el cual se observó un incremento de 2,3 °C en T_{onset} y 1,3°C en T_p . A pesar del poco efecto de los polisacáridos en la temperatura de pico, el aumento observado en la temperatura de onset de 2-3 °C indica un incremento en la estabilidad térmica de la proteína en presencia de los polisacáridos.

Para confirmar la tendencia observada, se evaluó la estabilidad térmica de los sistemas a bajos contenidos acuosos. Para este fin, los sistemas fueron liofilizados y equilibrados a actividades de agua de 0,65 y 0,8. La **Figura I.4.1.2** muestra el incremento en la temperatura de onset (ΔT_{onset}) y de pico (ΔT_p) a diferentes valores de pH.

El efecto estabilizador observado en los sistemas deshidratados fue mayor que el observado en solución. A pH neutro, se observaron los máximos aumentos en estos parámetros, de 10 y 9,4°C para T_{onset} y T_p respectivamente. A diferencia de lo observado en solución, en los sistemas deshidratados a pH 6 se observó un gran aumento en las temperaturas de onset y de pico (**Fig I.4.1.2.c-d**). La goma guar fue la más efectiva entre los polisacáridos en estabilizar la conformación nativa de la proteína.

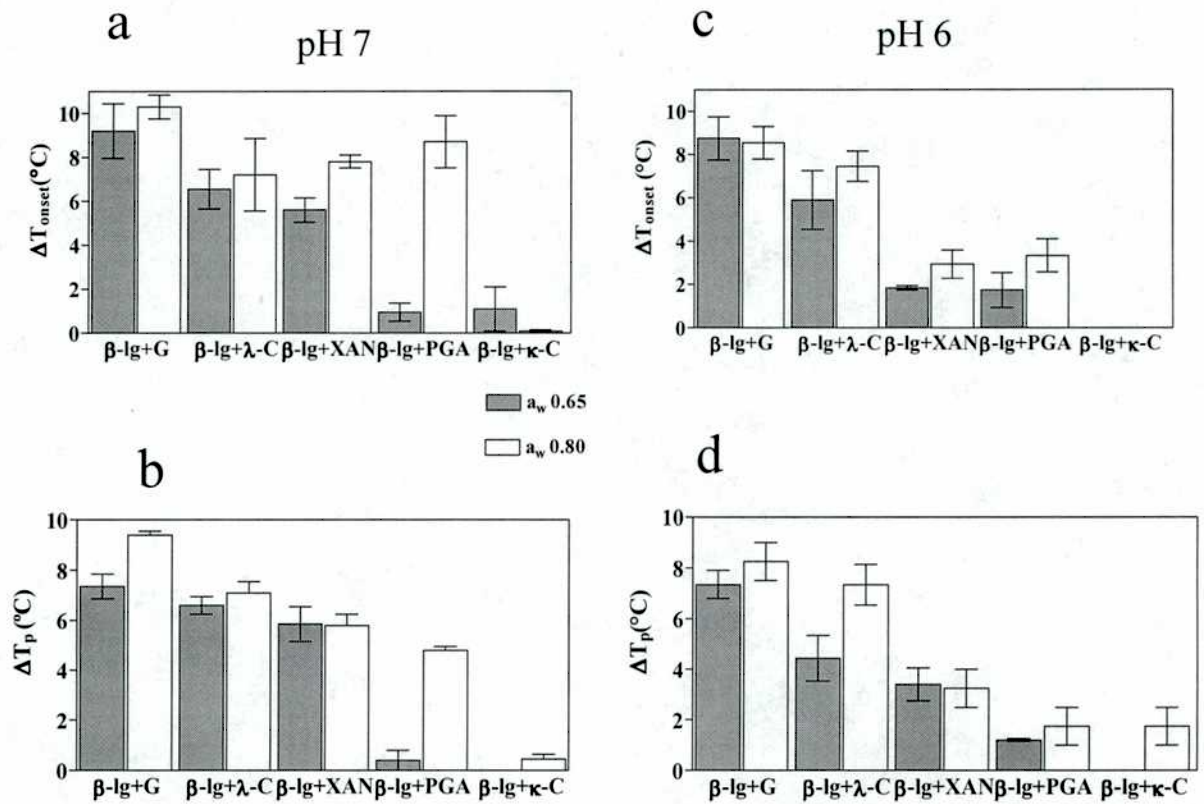


Figura I.4.1.2. Incremento en la temperatura de inicio (a,c) y de pico (b,d) de desnaturalización (ΔT_{onset} y ΔT_p) para los sistemas deshidratados de β -lg + PS equilibrados a a_w 0,65 o 0,80. Los sistemas liofilizados provienen de soluciones 15% β -lg / 3% PS.

En la **Tabla I.4.1.2** se muestran las entalpías de desnaturalización aparente determinadas a partir de las áreas de las endotermas de los sistemas mixtos en solución (**Fig I.4.1.1**). A pH 7 el cambio entálpico fue mayor para los sistemas mixtos que para la β -lg sola, lo que refleja el tamaño relativo de las áreas de las endotermas. Este incremento varió con el polisacárido presente en la mezcla, siendo mayor en presencia de goma guar.

A pH 6 se observa un aumento en los valores de cambio de entalpía para las mezclas respecto de lo observado a pH 7 excepto en el caso de la goma guar, pero este aumento no fue tan notable como el observado en el sistema de β -lg sola.

El cambio de entalpía observado durante el calentamiento de las soluciones, corresponde a la disociación del dímero de β -lg y al proceso de desnaturalización (endotérmico), los que se producen simultáneamente al proceso de agregación (exotérmico) durante el tiempo de adquisición de los termogramas (Relkin et al., 1998).

Tabla I.4.1.2 Cambio de entalpía aparente (ΔH_T) y porcentaje de β -lg desnaturalizada hasta T_p ($\Delta H_{1/2}/\Delta H_T$) para β -lg (15 %) y sistemas mixtos de β -lg (15%) + PS (3%)

	pH 7			pH 6	
	ΔH_T	$\Delta H_{1/2}/\Delta H_T$	% R ^a	ΔH_T	$\Delta H_{1/2}/\Delta H_T$
	(J/g)	(%)		(J/g)	(%)
β -lg	6,76 ± 0,38	46,3 ± 0,4		9,94 ± 0,10	34,2 ± 0,9
β -lg/ κ -	8,34 ± 0,82	36,7 ± 0,1	20,7 ±	8,70 ± 0,21	34,2 ± 1,1
C			0,9		
β -lg/ λ -	8,79 ± 0,51	38,9 ± 0,4	16,0 ±	10,95 ± 0,23	36,8 ± 1,0
C			1,6		
β -lg/XAN	7,64 ± 0,58	38,5 ± 0,5	16,8 ±	8,34 ± 0,39	35,6 ± 0,8
			1,8		
β -lg/PGA	9,24 ± 0,54	36,6 ± 2,2	21,0 ±	11,51 ± 0,02	32,9 ± 0,4
			5,5		
β -lg/G	12,02 ± 0,46	40,4 ± 0,4	12,7 ±	9,72 ± 0,46	36,4 ± 0,4
			1,6		

$$^a \%R = \left(1 - \frac{\Delta H_{1/2}/\Delta H_T|_{\beta\text{-lg}}}{\Delta H_{1/2}/\Delta H_T|_{\beta\text{-lg}+\text{PS}}}\right) \times 100$$

A pH 7 o cercanos y temperatura ambiente, la β -lg se encuentra en un equilibrio dinámico entre su forma dimérica en la cual los monómeros se encuentran unidos por medio de uniones no-covalentes y la forma monomérica de la proteína (Mc Kenzie, 1971). Varios autores han sugerido que el proceso de disociación del dímero de la β -lg es un paso necesario en el proceso de desnaturalización térmica (Caroili et al., 1994, Iametti et al., 1996) y que esta reacción se ve favorecida con el calentamiento en condiciones de pH neutro (Hoffmann y Van Mil, 1999). Se han realizado estudios por calorimetría en condiciones isotérmicas para determinar las diferentes contribuciones en el proceso global (Hoffmann y Van Mil, 1999). La reacción de disociación contribuye de manera considerable en las primeras etapas de aumento de flujo calórico observadas

en la endoterma. Qi et al. (1995) mostró un corrimiento del proceso de disociación del dímero a temperaturas más altas para mayores concentraciones de proteína.

El aumento de la temperatura a pH 7 causa el desplegamiento del monómero de la proteína que involucra una disrupción de uniones no-covalentes y exposición del grupo tiol e hidrofóbicos, previamente ocultos en el interior de la molécula. El grupo tiol en la molécula modificada del monómero puede inducir la formación de uniones covalentes del tipo intercambio tiol/disulfuro, promoviendo la formación de agregados (reacción exotérmica) (Relkin, 1996; Hoffmann y Van Mil, 1999). A pH 6, más cerca del punto isoelectrico de la proteína, la disociación y posterior desplegamiento de la proteína ocurre más lentamente, y los grupos tiol permanecen ocultos en el interior de las moléculas de dímeros y monómeros no desplegados. A este pH, se forman grandes agregados que involucran principalmente uniones físicas o no-covalentes, por lo que pueden denominarse agregados físicos (Hoffman y Van Mil, 1999). La agregación física involucra relativamente una baja contribución exotérmica, llevando a un aumento en la entalpía aparente obtenida en las endotermas (**Tabla I.4.1.2**).

A pesar de que la entalpía global de desnaturalización ΔH_T mostró un aumento en presencia de los polisacáridos a pH neutro, puede observarse una clara reducción en el área de las endotermas entre la temperatura de inicio de desnaturalización y la T_P , respecto de la endoterma para la β -lg sola (**Figura I.4.1.1**). Para cuantificar este comportamiento, se determinó el porcentaje de β -lg desnaturalizada hasta la temperatura de pico, como el cociente de las áreas entre la entalpía hasta T_P ($\Delta H_{1/2}$) y la entalpía total de desnaturalización (ΔH_T).

Como se muestra en la **Tabla I.4.1.2**, la endoterma simétrica obtenido a pH 7 para la proteína sola mostró un valor de la relación de 46,3% (cercano al 50%). Las endotermas más agudas y asimétricas obtenidas en presencia de los polisacáridos presentaron valores menores al 40 %. El porcentaje de β -lg desnaturalizada hasta T_P se redujo entre un 12.7 y 21% en presencia de los polisacáridos (R % en la **Tabla I.4.1.2**). A pH 6, la relación entre $\Delta H_{1/2}$ y ΔH_T dio valores de entre 32 y 37 %, los que reflejan la asimetría de las curvas. Estos valores presentaron similitud con los obtenidos a pH 7 en presencia de los polisacáridos.

Los estudios realizados por electroforesis en condiciones nativas permiten una mejor comprensión de los fenómenos moleculares que ocurren durante el calentamiento. En la **Figura I.4.1.3** se muestran los geles nativos obtenidos para muestras de β -lg sola (6%) y en presencia de PGA y λ -C (0,5%) a pH 7, luego de ser calentadas a 68 °C (cerca de la temperatura de inicio de desnaturalización de la β -lg). En soluciones con concentraciones mayores a la mínima necesaria para gelificar, como es el caso de las utilizadas en los estudios calorimétricos, la agregación y gelificación de la proteína se producen rápidamente, de tal forma que los agregados formados no entran en el gel nativo debido a su gran tamaño. Por lo tanto, para el análisis electroforético se

utilizaron soluciones proteicas más diluidas que las utilizadas en la calorimetría, de modo de poder obtener información cualitativa de los agregados formados durante el calentamiento.

Bajo las condiciones de electroforesis (pH 8.3 en el buffer de corrida), la banda principal observada para todos los sistemas corresponde a los monómeros de las variantes A y B de β -lg. Durante el calentamiento de la proteína, se produce una disminución en la banda nativa y una formación de bandas adicionales de mayor peso molecular. Esta formación de bandas adicionales se observa primero en el gel separador y luego en el stacking, indicando la formación de agregados más grandes. En presencia de PGA o λ -C se observó una disminución más lenta en la banda de β -lg nativa (sobre todo entre los 50 y 90 min), indicando nuevamente el efecto estabilizador de los polisacáridos. Esto concuerda con un incremento en la temperatura de inicio y la reducción del porcentaje de β -lg desnaturalizada hasta T_p a pH 7.

Al observar las bandas correspondientes a los agregados formados durante el calentamiento, pueden observarse diferencias entre los distintos sistemas (**Figura I.4.1.3**) En los perfiles electroforéticos se observa que en el sistema de β -lg sola aparecen una gran cantidad de agregados en el stacking a partir de los 30 minutos de calentamiento, y continúan visibles durante todo el tiempo de calentamiento. En presencia de PGA, se observó una notable disminución en los agregados observados en el stacking desde los 70 min y con λ -C casi no se observaron agregados en la misma zona del gel (stacking). Esto sería debido a la formación de agregados de mayor tamaño en presencia de los polisacáridos, que no entran en el stacking. En el gel de β -lg se observa la aparición de bandas correspondiente a agregados de bajo peso molecular (que entran en la zona del gel de corrida) a tiempos cortos de calentamiento. Estas bandas correspondientes a agregados de bajo peso molecular se observan aun para tiempos de 70 minutos. En los sistemas con polisacáridos, las bandas correspondientes a agregados de bajo peso molecular se observan para tiempos cortos de calentamiento (< 50 min) pero desaparecen a tiempos mayores. En el sistema con λ -C ya a los 40 minutos de calentamiento casi no se aprecian los agregados de bajo peso molecular mencionados.

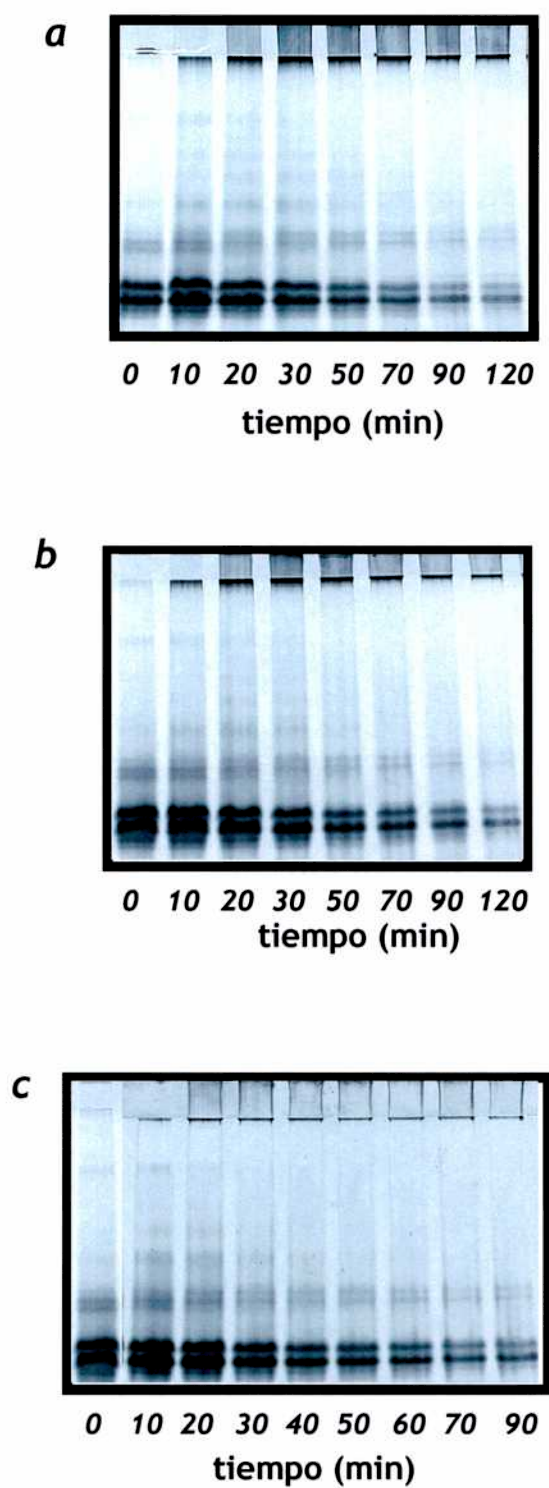


Figura I.4.1.3. Perfiles electroforéticos en condiciones nativas para soluciones (a) β -lg (6%), (b) β -lg + PGA (6 %/ 0,5 %) y (c) β -lg + λ -C (6 % / 0,5 %) a pH 7 luego del calentamiento a 68 °C durante diferentes periodos de tiempo.

En la **Figura I.4.1.4** se muestran los perfiles obtenidos del análisis de los geles para los sistemas de β -lg, β -lg+PGA y β -lg+ λ -C a 30 y 70 minutos de calentamiento a 68 °C. En el caso de la β -lg se observan picos más nítidos correspondientes a agregados de bajo peso molecular, que se aprecian también a los 70 minutos, aunque con un menor área. En las mezclas, estos picos desaparecen casi totalmente a los 70 minutos.

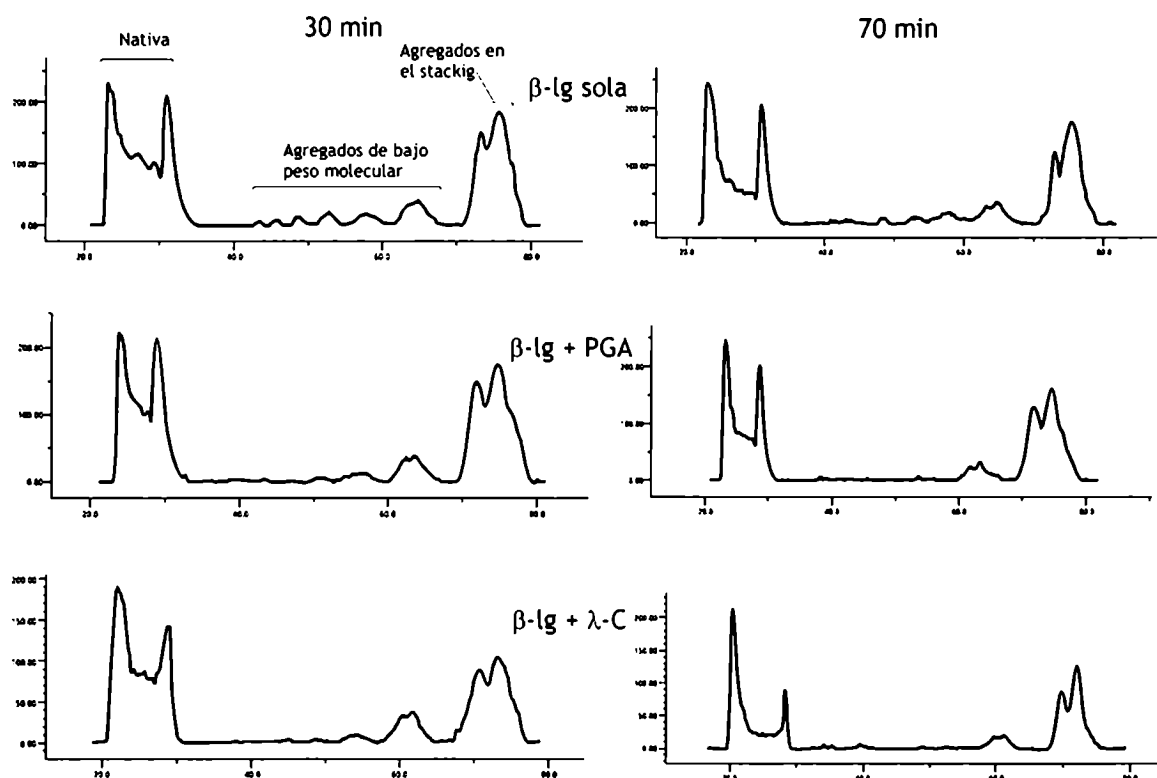


Figura I.4.1.4. Análisis de los perfiles electroforéticos obtenidos para los sistemas de β -lg sola y mixtos, realizados para 30 y 70 minutos de calentamiento a 68 °C, pH 7.

A fin de cuantificar el tamaño de los agregados formados se utilizó la técnica de dispersión dinámica de luz. En la **Tabla I.4.1.3** se indica el diámetro aparente medio de los agregados formados luego de calentar a 68 °C durante 50 minutos. Según lo reportado por Verheul (1998), el monómero de β -lg posee un peso molecular de 18,3 kDa y un diámetro molecular de 3,6 nm. Los agregados obtenidos en el sistemas de β -lg sola, fueron de 40 nm en promedio, por lo que estarían formados por alrededor de 11 monómeros de β -lg. El peso molecular de estos agregados sería de aproximadamente 200 kDa, y serían los que se observan en la parte del stacking (**Figura I.4.1.3**). En los sistemas con polisacáridos, el diámetro promedio de los agregados formados es mucho

mayor, lo que explica que a los mismos tiempos de calentamiento se observen muchos menos agregados en el stacking comparado con la β -lg sola. Según lo observado en la **Tabla I.4.1.3**, el aumento del tamaño de agregados observado en presencia de los diferentes polisacáridos tendría relación con el grado de incompatibilidad entre los diferentes biopolímeros en solución. En secciones siguientes se discutirá más ampliamente este efecto en el estudio de la gelificación de los sistemas mixtos. El tamaño creciente de los agregados en el orden β -lg+PGA < β -lg+ λ -C < β -lg+XAN tendría relación en parte con una mayor incompatibilidad debido al peso molecular creciente de los polisacáridos.

Tabla I.4.1.3 Diámetro promedio para agregados de β -lg formados en soluciones de β -lg sola (6 %) y β -lg + PS (0,5%) luego de un calentamiento a 68 °C durante 50 min

Diámetro (50 min, pH 7)	
β -lg	40 nm
β -lg+PGA	75 nm
β -lg+ λ -C	220 nm
β -lg+X	>1000 nm

En conclusión la modificación de los parámetros calorimétricos de la β -lg en presencia de los PS, indica que las condiciones que favorecen la asociación del dímero y formación de agregados de tipo físico tales como el pH cercano al pI o la presencia de polisacáridos incrementa la estabilidad térmica de la proteína. Este efecto está reflejado en el aumento de T_{onset} y T_P , la disminución del ΔH en la primera parte de los termogramas y el incremento en el cambio de entalpía total.

Muchos de los efectos observados se deberían a un aumento en la concentración efectiva de la proteína en las soluciones mixtas resultante de la incompatibilidad termodinámica entre la proteína y los PS.

Numerosos estudios de sistemas mixtos indican que la concentración total necesaria para que se produzca una separación de fases ronda el 4%, muy inferior a la utilizada en este estudio (15% β -lg/3% PS) (Tolstoguzov, 1997, Grinberg y Tolstoguzov, 1997). En los sistemas estudiados no se observó separación de fases antes o luego del calentamiento a 84 °C durante 1 h, debido posiblemente a la alta viscosidad de los sistemas. Sólo en el sistema mixto con PGA sin calentar se observó separación de fases luego de almacenar el sistema a temperatura ambiente durante 24 hs. Sin embargo, en todos los sistemas se produciría una micro-separación de fases o segregación

parcial en las condiciones estudiadas por la alta concentración de las soluciones. La separación de fases de los sistemas aumenta la concentración efectiva de cada biopolímero en las distintas fases, restringiendo el acceso de las moléculas de agua a la proteína. Esto podría dificultar la disociación y posterior desplegamiento de las moléculas proteicas e induciría la formación de agregados de mayor tamaño. A pH 6, el efecto *per se* de la disminución de pH que favorece la agregación de la proteína por medio de uniones predominantemente hidrofóbicas, parece ser más importante que el efecto de incompatibilidad observado en presencia de los polisacáridos, probablemente debido a una disminución en la incompatibilidad entre los biopolímeros a este pH (Grinberg y Tolstoguzov, 1997). La disminución en la incompatibilidad entre los biopolímeros a pH 6 se produce por una menor repulsión electrostática entre ellos a este pH. Otros autores han descrito efectos similares en soluciones de β -lg en presencia de sustancias que interactúan electrostáticamente con grupos cargados de la proteína. Por ejemplo, la presencia de sales tales como el NaCl, produce un efecto de “screening” que disminuye la repulsión neta entre moléculas de la proteína y promueve la agregación por medio de uniones no-covalentes o físicas (Verheul et al., 1998a). Se ha sugerido que este efecto sería similar al causado por la disminución del pH en estas soluciones, de forma similar a los resultados obtenidos en este estudio.

1.4.1.2 Parámetros cinéticos

Se utilizó la ecuación de Borchardt y Daniels (1957) (Ec 1.3.1) para obtener los parámetros cinéticos (E_a , orden de reacción) a partir de los termogramas para los sistemas de β -lg sola y mixtos a pH 6 y 7. El mejor ajuste de los gráficos de Arrhenius en el rango de temperatura desde T_{onset} hasta T_p se obtuvo con una reacción de orden 2 ($R^2 = 0,98-0,99$). Otros autores han reportado órdenes de reacción para la desnaturalización de β -lg en condiciones similares de pH y concentración de proteína. Liu et al. (1994) reportó el mismo orden de reacción que el obtenido en el presente estudio. Verheul et al. (1998c) obtuvo un orden de reacción de 1,7 a pH 7, similar al reportado por Hoffman et al. (1995), de $n=1,5$.

La **Tabla 1.4.1.4** muestra los parámetros cinéticos determinados a partir de las curvas calorimétricas. Los valores de energías de activación obtenidos para la β -lg sola son del mismo orden que los reportados por Van Mil y Roefs (1993), quienes obtuvieron valores de 740 kJ/mol a pH 5,92 y 485 kJ/mol a pH 6,75. Sin embargo, De Wit y Swinkels (1980) y Liu et al. (1994) reportaron valores más bajos de E_a . El análisis y comparación de los datos cinéticos no es simple debido a que durante el calentamiento se produce la agregación de la proteína simultáneamente a la disociación del dímero y desplegamiento de las subunidades. Los valores de E_a de desnaturalización aumentan con la concentración de la proteína y este incremento es más

pronunciado a bajas velocidades de calentamiento (Hoffmann et al., 1995). Bajo estas condiciones, la agregación tiene un rol importante en el proceso total.

A pH 7, E_a aumenta en forma importante en presencia de los polisacáridos, como muestra la **Tabla I.4.1.4**, lo que revela un efecto similar al de aumento de la concentración. A este pH pueden esperarse interacciones repulsivas entre proteína-polisacárido debido a que ambos biopolímeros se encuentran cargados negativamente. La presencia de estas interacciones repulsivas lleva a un incremento en el potencial químico, o en otras palabras, a la actividad termodinámica de la proteína en solución (Pavlovskaya et al., 1993). Los valores de E_a obtenidos a pH 6 en presencia de PS fueron similares al obtenido para la β -lg sola, indicando que la disminución en el pH sería el principal factor que promueve el aumento en el valor de la energía de activación para el proceso.

Tabla I.4.1.4 Parámetros cinéticos obtenidos por el método de Borchardt y Daniels para la desnaturalización de β -lg sola (15 %) y sistemas mixtos β -lg (15%) + PS (3 %) .

Sistema	pH 7		pH 6	
	E_a (kJ mol ⁻¹)	k (72°C) (L . g ⁻¹ . s ⁻¹ . 10 ³)	E_a (kJ mol ⁻¹)	k (76°C) (L . g ⁻¹ . s ⁻¹ . 10 ³)
β -lg	456,2	0,146	836,2	0,051
β -lg/PGA	857,9	0,024	809,4	0,070
β -lg/X	798,5	0,014	829,5	0,021
β -lg/ λ -C	868,0	0,07	762,7	0,066
β -lg/ κ -C	798,1	0,036	861,8	0,012
β -lg/G	761,0	0,045	802,9	0,057

Las menores constantes de velocidad de reacción para la desnaturalización de la β -lg obtenidas a pH 7 y 72 °C (cerca de la temperatura de onset a pH 7) indicarían una menor conversión de β -lg nativa al ser calentada en presencia de los PS, en concordancia con los resultados obtenidos por electroforesis. La constante de conversión de la proteína a pH 6 y 76 °C (cerca del onset de desnaturalización a este pH), fue mucho menor que la obtenida a pH 7, indicando nuevamente una mayor estabilidad térmica de la proteína a pHs más cercanos al pI de la proteína. La adición de los polisacáridos tuvo un menor efecto en la velocidad de conversión de la proteína a pH 6 (**Tabla I.4.1.4**). En estas condiciones, prevalece la conformación nativa, con la β -lg en su forma dimérica.

En esta conformación, los grupos tiol se encontrarían ocultos en la zona de unión entre los dímeros, lo que dificultaría la agregación irreversible por medio de uniones covalentes entre los monómeros disociados (Hoffmann et al., 1997a). Esto explica la mayor estabilidad frente a la desnaturalización de la β -lg a pH cercanos al pI, o en condiciones en donde se favorece la estabilización de la forma dimérica de la proteína.

Los resultados presentados en esta sección demuestran que los polisacáridos afectan el complejo comportamiento térmico de la proteína, que involucra el desplegamiento y posterior agregación de las subunidades. Un análisis general de los datos calorimétricos y cinéticos indica que los polisacáridos aumentan la estabilidad térmica de la β -lg a pH neutro debido a una limitada compatibilidad entre los biopolímeros. Sin embargo, a pH 6, este efecto se minimiza debido a que prevalece el efecto de la disminución de pH que estabiliza la conformación nativa de la proteína y disminuye la incompatibilidad entre los biopolímeros.

SEGUNDA SECCIÓN

1.4.2 ESTUDIO DE LA GELIFICACIÓN DE β -LG + POLISACÁRIDOS

1.4.2.1 Ensayos preliminares

La gelificación de la β -lactoglobulina ha sido estudiada ampliamente debido a sus excelentes propiedades gelificantes y a que se encuentra bien caracterizada molecularmente. A pH neutro se ha reportado que la concentración mínima para obtener un gel es de alrededor del 10 % (Ould Eleya et al., 2000), dependiendo de las características de la muestra y de las condiciones del medio, tales como la fuerza iónica y el tipo de sales presentes (Ndi et al., 1996). A pH más cercano al pI de la proteína, se reduce la concentración necesaria para gelificar debido a que se produce una menor repulsión electrostática entre las moléculas de proteína, favoreciendo la agregación de la misma durante el calentamiento (Stading et. al., 1993). En el caso del WPC utilizado en este trabajo se observó que era necesaria una concentración superior al 8,5% a pH neutro aproximadamente para la obtención de un gel autosoportable. A menores concentraciones de proteína no se observó la gelificación mediante todas las técnicas utilizadas en el presente estudio para determinar el punto gel.

En los estudios realizados en sistemas mixtos de β -lg o concentrados de proteínas del suero en presencia de diferentes polisacáridos tales como κ -C, alginato de sodio, pectina de alto y bajo metoxilo, goma xántica, goma guar, maltodextrina, (Ould Eleya et al., 2000, Dumay et al., 1999, Walkenstrom et al., 1998, Bryant et al, 2000, Fernandes, 1998, Mishra et al., 2001) se han utilizado en general concentraciones de proteína superiores a la necesaria para la gelificación de la proteína sola, con el objetivo de comparar las propiedades de los geles mixtos con los de proteína sola. Uno de los objetivos que se plantearon en ese trabajo al comenzar el estudio de los sistemas mixtos, fue el de obtener geles de β -lg en concentraciones en las cuales la proteína sola no gelificaría, mediante el agregado de polisacáridos, por lo cual se realizaron pruebas preliminares para la obtención de las concentraciones de la proteína y de los polisacáridos que permitieran lograr ese objetivo. Se estudiaron las características de geles mixtos formados en presencia de polisacáridos no gelificantes, ya que el objetivo fue evaluar el efecto de los mismos en la gelificación y propiedades de la red proteica formada. En este tipo de sistema gelificado, los polisacáridos no gelificantes se encontrarían disueltos en la fase acuosa retenida por la matriz gelificada (Zasytkin et al., 1997).

Se determinó que con una concentración de 5,5% de proteína a pH neutro se obtenían geles autosoportables a una temperatura de calentamiento superior a la de pico de desnaturalización a ese pH ($T_p = 78\text{ }^{\circ}\text{C}$) en presencia de una concentración de polisacáridos de aproximadamente 0.5%.

De esta forma se logró promover la gelificación de la proteína, obteniéndose sistemas de diferente apariencia y características de acuerdo al polisacárido utilizado. Por lo tanto, se utilizó una concentración de 6% de proteína y 0.5% de los polisacáridos para el estudio de las características del proceso de gelificación y la caracterización de geles mixtos de modo de determinar el efecto diferencial de los polisacáridos para promover la gelificación de la β -lactoglobulina. En varios estudios se ha reportado una disminución de la concentración mínima de proteína requerida para gelificar en presencia de polisacáridos. Capron et al. (1999) observaron este efecto con el agregado de κ -C a soluciones de β -lactoglobulina en tanto que Mishra et al.(2001) obtuvieron a pH 8 una reducción del 12% al 8% en presencia de pectina .

En las condiciones estudiadas, no se observaron fenómenos de segregación o separación de fases antes o después del calentamiento de las soluciones.

La separación de fases se produce normalmente a concentraciones totales mayores al 4% (Grinberg y Tolstoguzov, 1997). Sin embargo, varios autores han estudiado sistemas mixtos en concentraciones superiores a éstas, no observando separación de fases aun en condiciones de limitada compatibilidad termodinámica. Syrbe et al. (1998) no observaron segregación o separación de fases en soluciones mixtas de β -lg y polisacáridos iónicos tales como pectina, alginato de sodio o carboximetilcelulosa en condiciones de pH entre 6 y 7, a menos que se produjera el calentamiento de las soluciones. Turgeon et al. (2001) y Wang et al. (2000) observaron el mismo comportamiento en sistemas mixtos de WPI y pectina incluso a altas concentraciones. Estos sistemas que son macroscópicamente homogéneos pueden presentar fenómenos de volúmenes de exclusión que producen un aumento en la concentración efectiva de cada biopolímero, por lo que se habla de una compatibilidad limitada entre los biopolímeros en la solución. En ciertos casos puede existir una cosolubilidad total entre los biopolímeros, como ha sido reportado para el sistemas mixto de BSA y alginato de sodio (Neiser et al., 1998), pero este comportamiento es caso excepcional.

1.4.2.2 Caracterización de la gelificación por el ensayo de “tilting”

El ensayo de “tilting” permite en forma sencilla y rápida estimar los tiempos de gelificación de proteínas. Como se muestra en la **Figura I.4.2.1**, el tiempo de gelificación (t_{gel}) de la β -lg varió mucho de acuerdo al polisacárido utilizado, a la temperatura de calentamiento y al pH del medio. A pH neutro (**Figura I.4.2.1 a**), el tiempo necesario para gelificar aumentó en el orden β -lg+ λ -carrag < β -lg+xantica < β -lg+PGA para cada temperatura de calentamiento. A pH 6, el tiempo de gelificación se redujo ampliamente para temperaturas superiores a 80 °C aproximadamente (**Figura**

I.4.2.1b), y a este pH el efecto del tipo de polisacárido fue menor, obteniéndose el siguiente orden en los tiempos de gelificación: β -lg+PGA < β -lg+xántica $\cong$ β -lg+ λ -carragenano. Como puede observarse, al variar el pH del medio de 7 a 6, se invirtió el orden de tiempos de gelificación de tal forma que el PGA que a pH neutro era el que producía una gelificación más lenta, a pH 6 es el que produce la más rápida.

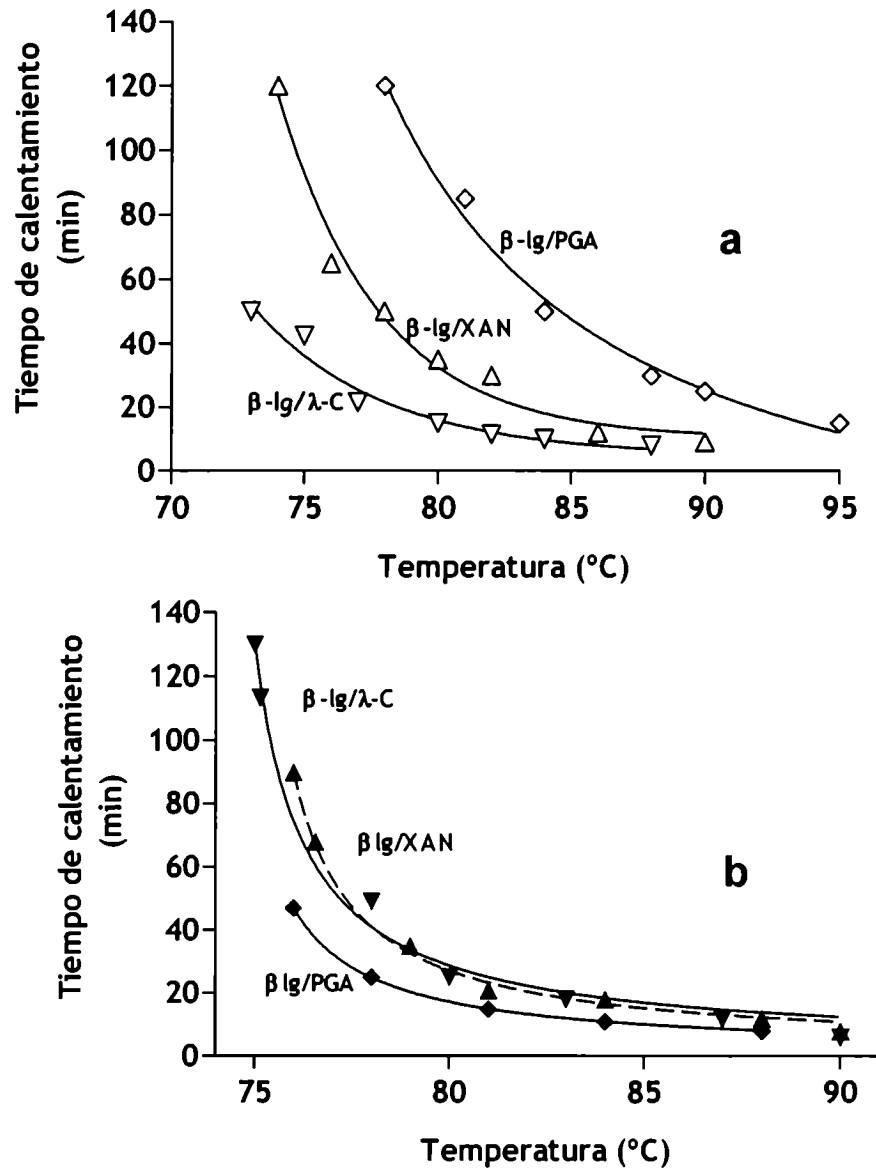


Figura I.4.2.1. Tiempo de gelificación de sistemas mixtos de β -lactoglobulina + polisacáridos a (a) pH 7 y (b) pH 6 de acuerdo al ensayo de “tilting”.

El t_{gel} de soluciones de proteínas del suero disminuye al aumentar la concentración de proteína (Tang et al., 1993). Por lo tanto, la disminución en el t_{gel} en presencia de las gomas revelaría las

diferencias entre los polisacáridos para aumentar la concentración efectiva de la proteína según el grado de incompatibilidad de los biopolímeros en solución. En sistemas en los cuales no hay separación macroscópica de fases ($\text{pH} > \text{pI}$ y concentraciones de los biopolímeros relativamente bajas) debido a fenómenos de exclusión molecular originados en una limitada compatibilidad, se produciría un aumento en la concentración efectiva de ambos biopolímeros. Esto facilitaría las interacciones proteína-proteína que conllevan durante el calentamiento a la agregación con la consecuente formación de la red tridimensional del gel. Puede verse en la **Figura 1.4.2.1**, que el tiempo de gelificación muestra un gran aumento a temperaturas por debajo de la de pico de desnaturalización a pH 7 y 6 (aproximadamente 77 y 80 °C respectivamente), reduciéndose notablemente a mayores temperaturas. Esto se debe a que por debajo de la temperatura de pico de desnaturalización, la velocidad de las reacciones de disociación y desplegamiento de la proteína y aumento en la reactividad del grupo tiol disminuyen notablemente.

A pH 6, la carga neta que posee la proteína es menor, y se ven más favorecidas las atracciones proteína-proteína, por lo tanto la presencia de los polisacáridos tiene un efecto menor que el observado a pH neutro. Aún a este pH más cercano al pI de la proteína, no se observó gelificación de las soluciones de proteína sin el agregado de polisacáridos, lo que demuestra el importante efecto de los mismos.

1.4.2.3 Caracterización de la gelificación por reometría dinámica

1.4.2.3.1 Caracterización dinámica de la gelificación

La reometría dinámica es utilizada ampliamente para el seguimiento del proceso de gelificación de proteínas y polisacáridos. La evolución del módulo elástico y viscoso del sistema sometido a calentamiento permite determinar el tiempo y temperatura de gelificación.

Se estudió el proceso de gelificación entre 80 °C y 88°C a pH neutro, esto es, a temperaturas mayores a la de pico de desnaturalización a este pH determinada anteriormente ($T_p \cong 77$ °C). A pH 6 en cambio se estudió la gelificación a 84 °C.

El punto de gelificación puede definirse reológicamente como el punto donde G' comienza a aumentar por sobre el nivel de ruido (correspondiente a sistemas líquidos), o el punto de cruce entre G' y G'' (Stading & Hermansson, 1990). En la determinación del punto gel por ambos métodos no se encontraron diferencias significativas en el tiempo obtenido. Se utilizó en este caso el valor de comienzo de aumento de G' ya que en el sistema con goma xántica el valor de G' fue siempre mayor a G'' .

En soluciones de β -lg sola no se observó gelificación, según fue mencionado anteriormente. Las gráficas de G' en función del tiempo de calentamiento a 88 °C para la β -lg sola (**Figura I.4.2.2**) mostraron que G' no aumentó por sobre el nivel de ruido aún luego de 150 minutos de calentamiento, lo que indica que en este caso no se obtuvo un gel .

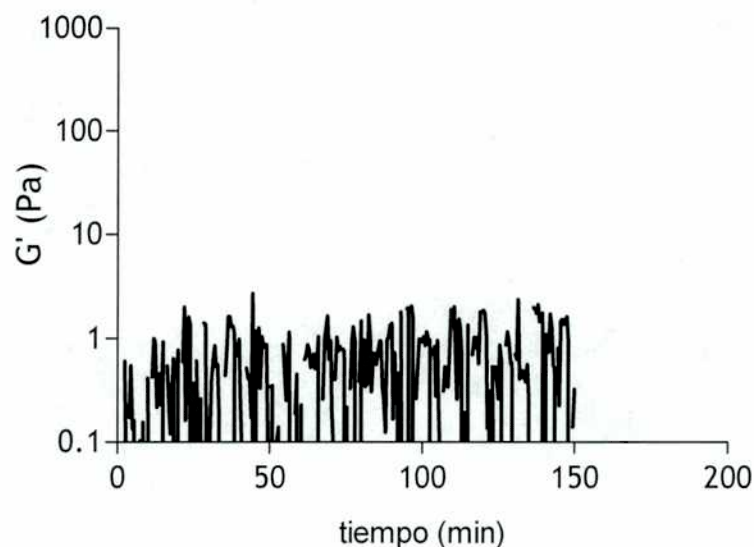


Figura I.4.2.2. Evolución de G' con el tiempo de calentamiento a 88 °C para β -lg al 6%, pH 7

En la **Figura I.4.2.3** se muestra la evolución de G' y G'' con el tiempo de calentamiento a 80 °C para distintos sistemas mixtos. El calentamiento se realizó desde temperatura ambiente hasta la temperatura final deseada. En todos los casos, debido a la alta velocidad de calentamiento (25 °C/min) el punto de gelificación se registró en la etapa de calentamiento a temperatura constante. Por lo tanto, los tratamientos pueden considerarse isotérmicos. Luego de un rápido aumento del módulo elástico luego del punto gel, se observó una disminución en la velocidad de desarrollo de la estructura y una estabilización relativa del mismo a tiempos largos de calentamiento. En la **Tabla I.4.2.1** se indican los tiempos de gelificación y los valores máximos de los módulos para los diferentes sistemas mixtos a diferentes temperaturas de calentamiento (pH=7).

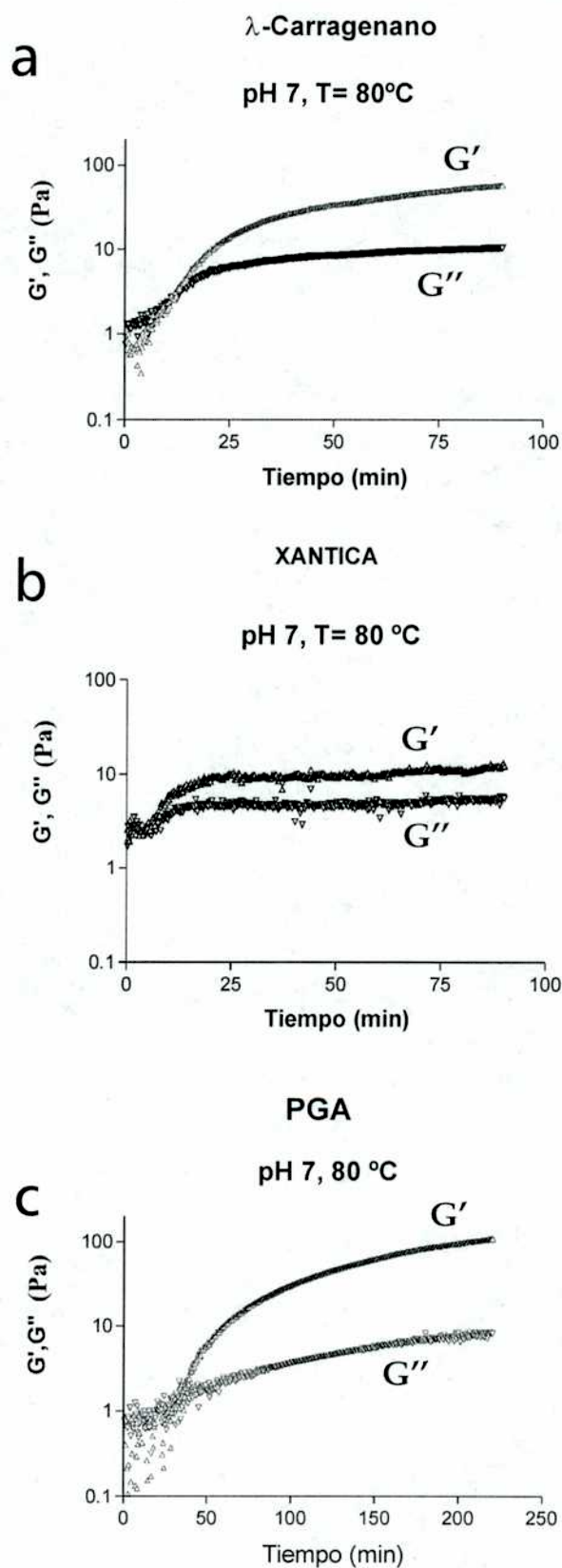


Figura I.4.2.3. Evolución de G' y G'' vs tiempo de calentamiento a 80 °C, pH7. a) β -lg/ λ -C, b) β -lg /X, c) β -lg/PGA

En comparación con los tiempos obtenidos por el ensayo de “tilting”, los tiempos de gelificación determinados por reometría resultaron mucho menores aunque presentaron la misma tendencia de acuerdo al polisacárido utilizado. Mediante esta técnica se observó que las diferencias entre tiempos de gelificación de los sistemas con λ -C y xántica fueron menores. El sistema con PGA fue el que presentó una gelificación más lenta, mostrando una notable disminución del tiempo requerido para gelificar con el aumento de la temperatura de calentamiento.

Tabla I.4.2.1. Tiempo de gelificación (t_{reol}), módulo elástico (G') y viscoso (G'') al finalizar la etapa de calentamiento a diferentes temperaturas para sistemas β -lg (6%)/PS (0,5%) a pH 7.

Sistema		t_{reol} (min)	G'_{max} (Pa)	G''_{max} (Pa)
β -lg/ λ -C	80 °C	12,5	57,4	10,5
	84 °C	5,04	129	14,4
	88 °C	3,8	179	17,9
β -lg/X	80 °C	7,02	13	5,53
	84 °C	5,30	62,6	12
	88 °C	3,5	68,4	8,17
β -lg/PGA	80 °C	38,42	110	8,3
	84 °C	13,00	132	9,37
	88 °C	6,5	140	8,42

La secuencia de eventos que tienen lugar durante el proceso de gelificación pueden ser separados en aquellos que ocurren en la fase fluida (sol) y en aquellos que se producen en la fase sólida (gel) (Foegeding et al., 1995). La línea divisoria entre tales eventos es el punto de gelificación, donde el sistema líquido se transforma en un sólido. La estructura primaria del gel así como su desarrollo posterior es resultado de los procesos de desnaturalización/agregación. Luego del punto de gel, cuando el sistema entra en la etapa de gelificación en fase sólida, la agregación se encuentra limitada difusionalmente por la alta viscosidad de la matriz gelificada.

El tiempo obtenido como comienzo de aumento de G' estaría indicando la formación de la red primaria, que luego se va fortaleciendo, mostrando un aumento en el módulo elástico hasta llegar a un valor estable del mismo. Las grandes diferencias entre los tiempos de gelificación obtenidos por los distintos métodos (tilting y reológico) estarían dadas por el hecho de que el ensayo de “tilting” se realiza en condiciones de formación de un gel estable, ya que se determina como el tiempo en el cual no se observa deformación en el menisco luego del calentamiento y posterior enfriamiento de los sistemas. Además de incluir el tiempo necesario para la formación de un gel estable, durante el

enfriamiento de los sistemas se produce el fortalecimiento de las estructuras por medio de uniones puente hidrógeno.

En el sistema mixto β -lg/PGA se observaron valores máximos de G' relativamente altos a todas las temperaturas de calentamiento, mientras que en presencia de goma xántica los valores de G' fueron bajos, mostrando un aumento solo entre 80 y 84 °C. Esto indicaría un mayor carácter sólido de los geles de β -lg formados en presencia de PGA y λ -C.

Tabla I.4.2.2 Características de los sistemas mixtos β -lg/PS (6%/0,5%) a pH 6 calentados a 84 °C

Sistema	$t_{gel}(\text{min})$	$G'_{max}(\text{Pa})$	$G''_{max}(\text{Pa})$
β -lg/ λ -C	1,68	340	49,7
β -lg/Xan	1,44	163	22,8
β -lg/PGA	1,44	84,2	12,2

En la **Tabla I.4.2.2** se muestra el efecto de los polisacáridos a pH 6 en las propiedades evaluadas. El tiempo de gelificación se redujo mucho respecto al observado a pH 7 para la misma temperatura de calentamiento, coincidentemente con lo observado por la técnica de “tilting”. Los perfiles de G' obtenidos a pH 6 para los diferentes sistemas se observan en la **Figura I.4.2.4**. A medida que el pH se acerca al pI de la proteína (5,2 para la β -lg), se favorecen las interacciones proteína-proteína y la gelificación se produce en menor tiempo, requiriéndose además menor concentración de proteína para gelificar. Por lo tanto, con el aumento de la concentración efectiva de la proteína y las condiciones favorables del medio, se produce una rápida formación de la matriz primaria a pH 6. Los valores máximos de G' fueron más altos en los sistemas con λ -carrag y xántica, y se observó una disminución en presencia de PGA.

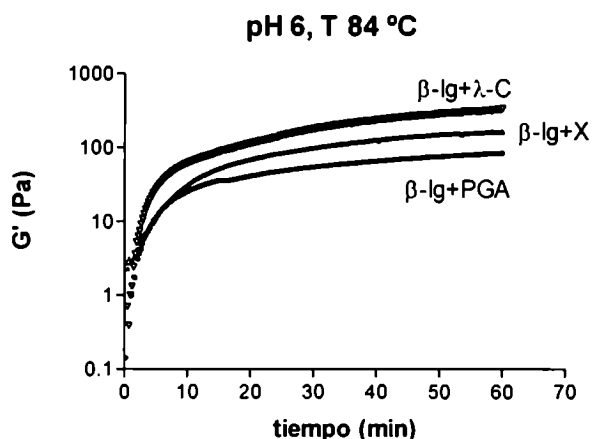


Figura I.4.2.4. Evolución de G' con el tiempo de calentamiento a 84 °C para las soluciones mixtas a pH 6

1.4.2.3.2 Cinética de gelificación

Se determinaron las energías de activación correspondientes a la formación de la estructura primaria de los geles mixtos mediante el ajuste de la ecuación de Arrhenius expresando la velocidad de gelificación como la inversa del tiempo de gelificación ($1/t_{\text{reol}}$). Los valores de energías de activación para los diferentes sistemas a pH 7 en la **Tabla I.4.2.3** muestran que la E_a involucrada en la formación de la red primaria del gel depende fuertemente del tipo de polisacárido presente. En presencia de PGA la gelificación de la β -lg se ve más afectada por aumentos de la temperatura de calentamiento de acuerdo al mayor valor de E_a de este sistema. El bajo valor de E_a obtenido en presencia de goma xántica sugiere que los procesos difusionales son limitantes debido a la alta viscosidad del sistema (desde el comienzo de las mediciones reológicas se observó que $G' > G''$).

Tabla I.4.2.3. Energías de activación correspondientes al proceso de formación de la estructura primaria de geles mixtos β -lg (6%)/PS (0,5%)

Sistema	E_a (kJ/mol)	R^2
β -lg + PGA	256	0,990
β -lg + λ -C	157,5	0,959
β -lg + X	91,4	0,986

La velocidad de desarrollo de la estructura gelificada, una vez que se ha obtenido red primaria del gel, puede ser evaluada a través de los cambios en los parámetros viscoelásticos en función del tiempo (Aguilera, 1993). Algunos autores determinaron la velocidad de desarrollo de la estructura como la pendiente de G' con el tiempo en la primera parte de las curvas, durante el tiempo de mayor crecimiento de G' (Aguilera, 1993). Sin embargo, para considerar el desarrollo total de la estructura, tanto en las etapas de mayor crecimiento de G' , como en la etapa de estabilización del módulo, se escogió una ecuación que permitiera el modelado de toda la curva de desarrollo de G' . En varios estudios (Nishinari et al., 1996, Ikeda et al, 1999, Katsuta et al, 1997) se ha propuesto la siguiente ecuación que representa una reacción de primer orden:

$$G' = G'_{\infty} \cdot (1 - \exp(-k_G t)) \quad \text{Ec (I.4.2.1)}$$

donde G'_{∞} es el valor de módulo elástico obtenido para largos tiempos de calentamiento, y k_G es la constante de velocidad de desarrollo de G' a la temperatura de trabajo (proceso isotérmico).

En la **Tabla I.4.2.4** se muestra comparativamente la velocidad de desarrollo del gel estable para los distintos sistemas mixtos calentados a 84 °C. El sistema con PGA a pH 7 es el que presentó un desarrollo más lento de la estructura del gel durante el calentamiento. Sin embargo, a pH 6, la velocidad de estructuración del gel de β -lg/PGA mostró un gran aumento, siendo mayor que la determinada para los otros sistemas. De todas formas, a pH 6 las diferencias obtenidas entre los sistemas con distintos polisacáridos fueron pequeñas.

Tabla I.4.2.4. Velocidad de desarrollo de G' a 84 °C para los sistemas mixtos β -lg (6%)/PS (0,5%)

Sistema	pH 7	R^2	pH 6	R^2
β -lg + PGA	$2,967 \cdot 10^{-5}$	0,995	$2,864 \cdot 10^{-2}$	0,993
β -lg + λ -C	$1,224 \cdot 10^{-2}$	0,999	$0,6933 \cdot 10^{-2}$	0,998
β -lg + X	$1,344 \cdot 10^{-2}$	0,997	$1,428 \cdot 10^{-2}$	0,999

I.4.2.3.3 Evolución de la viscoelasticidad durante la gelificación

Un parámetro evaluado frecuentemente para caracterizar la evolución de los sistemas durante la gelificación, es la tangente del ángulo de desfase ($\tan\delta$). Este parámetro se define como el cociente entre el módulo viscoso y elástico ($\tan\delta=G''/G'$) y describe el grado de viscoelasticidad de la red proteica (Aguilera, 1993). Durante la agregación y gelificación de los sistemas, se produce una disminución de este parámetro debido al gran incremento en el módulo elástico respecto al viscoso. En los sistemas gelificados, se produce una disminución en el valor de $\tan\delta$ a partir de 1, es decir a partir del punto de cruce entre G' y G'' . En la **Figura I.4.2.5** se muestra en forma comparativa la evolución de $\tan\delta$ para las tres mezclas de PS + β -lg calentadas a distinta temperatura. En todos los casos, la $\tan\delta$ disminuyó con el aumento de la temperatura de calentamiento, aunque pueden verse grandes diferencias en los diferentes sistemas de acuerdo al polisacárido utilizado. En el sistema con PGA, $\tan\delta$ disminuyó hasta valores muy bajos a todas las temperaturas de calentamiento, obteniéndose un valor final entre 0,06-0,08. En los sistemas con xántica y λ -C se puede observar una diferencia más marcada entre la evolución a 80°C y a 84 y 88 °C. En presencia de λ -C se obtuvieron valores mínimos de $\tan\delta$ entre 0,1 y 0,2 dependiendo de la temperatura de calentamiento. En el sistema con xántica, se ve que aunque los valores observados de G' parecen estabilizarse luego del calentamiento, no sucede lo mismo con $\tan\delta$, que disminuye constantemente durante el calentamiento, lo que indicaría que las estructuras del gel todavía se

encontrarían en desarrollo. A 88 °C el valor mínimo obtenido fue de 0,17, considerablemente mayor que el obtenido para los otros sistemas.

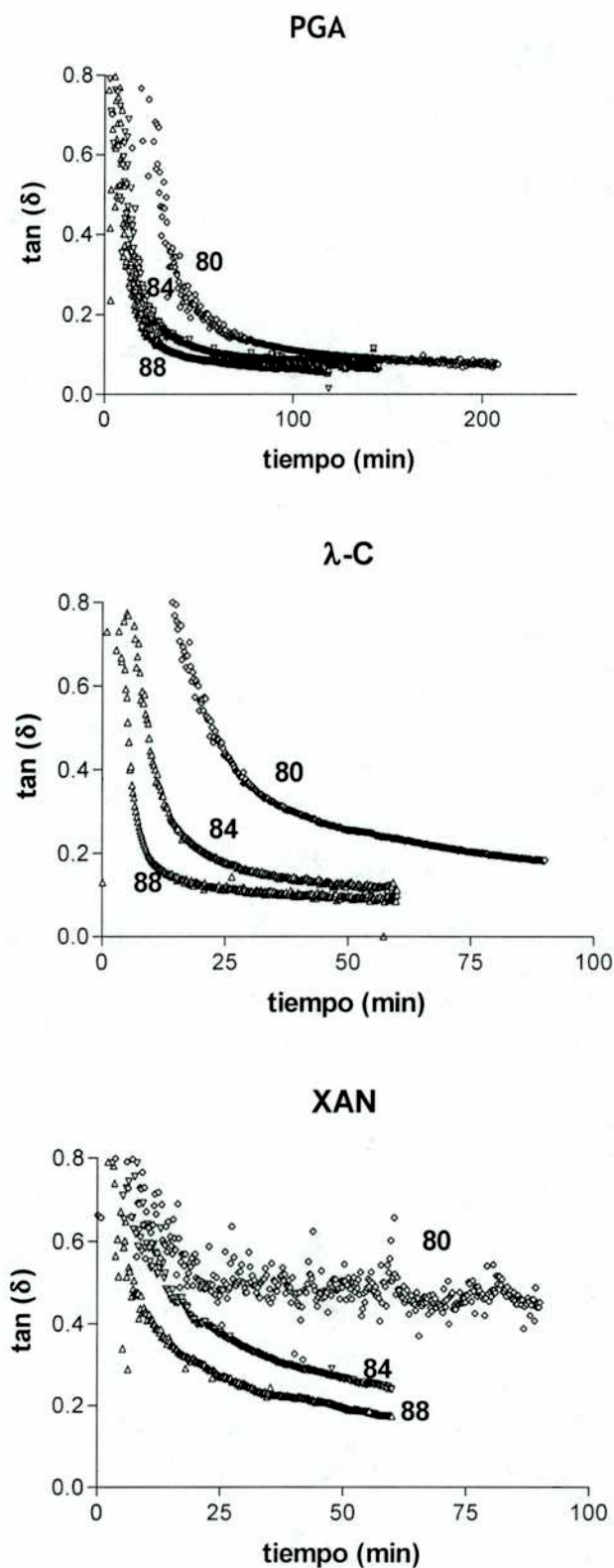


Figura I.4.2.5. Evolución de la tangente del ángulo de desfase, $\tan\delta$ para los sistemas a pH neutro

Las diferencias más notables en los valores de viscoelasticidad en los sistemas con goma xántica y λ -carragenano se observaron a 80 °C, en donde se obtuvieron valores finales de $\tan\delta$ de 0,45 y 0,2 respectivamente. En estos casos, debido a la alta viscosidad de los sistemas los agregados formados no se llegan a conectar generando redes proteicas con bajo G' . En estudios realizados en presencia de mayores concentraciones de β -lg se ha reportado una disminución en la elasticidad de los geles formados en presencia de XAN, por una contribución de elementos viscosos a la estructura aportados por la goma, en especial a temperaturas cercanas a la de pico de desnaturalización (Zasytkin et al., 1996).

A mayores temperaturas, la gelificación se produce rápidamente debido a la alta velocidad de agregación de la proteína en estas condiciones. Este comportamiento se ve reflejado en la rápida disminución de $\tan\delta$ y los valores más bajos alcanzados a mayores temperaturas. A pH 6, como se muestra en la **Figura I.4.2.6**, la evolución de $\tan\delta$ muestra un comportamiento similar para los tres sistemas calentados a 84 °C, obteniéndose valores de hasta 0,14.

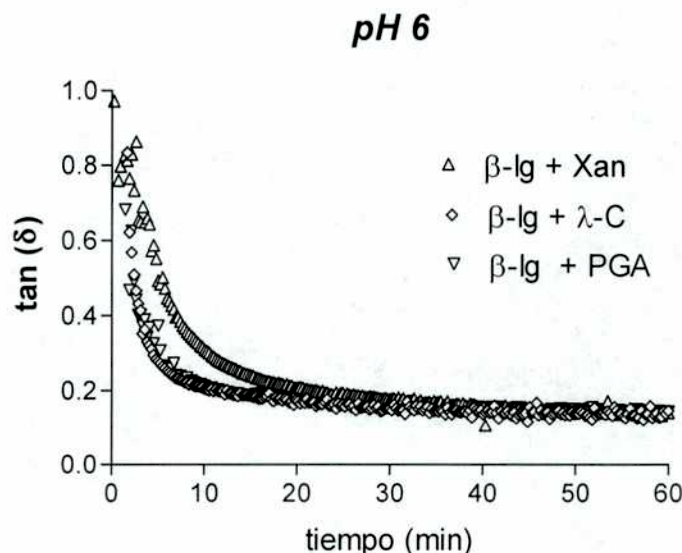


Figura I.4.2.6. Evolución de la tangente del ángulo de desfase, $\tan\delta$ para los sistemas mixtos a pH 6.

I.4.2.4 Caracterización de viscoelasticidad, textura y retención de agua de los geles

I.4.2.4.1 Barrido de frecuencia

El barrido de frecuencia de un gel puede proveer información a cerca de la estructura de los sistemas gelificados. En un gel mediado por enlaces covalentes, el valor del G' es independiente de

la frecuencia (f), mientras que en un gel de tipo físico se observa una pequeña pendiente en los gráficos de G' vs f (Stading et al., 1990). El grado de dependencia con la frecuencia puede ser expresado cuantitativamente por el parámetro n , que se obtiene del ajuste de los datos de G' vs f , según:

$$\text{Log } G' = n \log f + K \quad \text{Ec (1.4.2.2)}$$

donde G' es el módulo elástico, f es la frecuencia de oscilación, n es la pendiente de G' vs f y K es una constante. Un gel covalente de proteína presenta un $n=0$, mientras que en un gel de tipo físico $n>0$ (Stading et al, 1990). El valor de la pendiente es por lo tanto una medida del grado de agregación física en la estructura gelificada. Además este valor puede relacionarse con el tamaño de los agregados formados en la matriz, ya que generalmente el tamaño de los agregados de tipo físico es mucho mayor al de los agregados covalentes, que llevan generalmente a la formación de geles tipo "fine-stranded".

En la **Figura I.4.2.7** se observa el gráfico del barrido de frecuencias de geles formados a 84 °C, luego de ser llevados a temperatura ambiente. En el mismo se indican los valores de n obtenidos en cada caso.

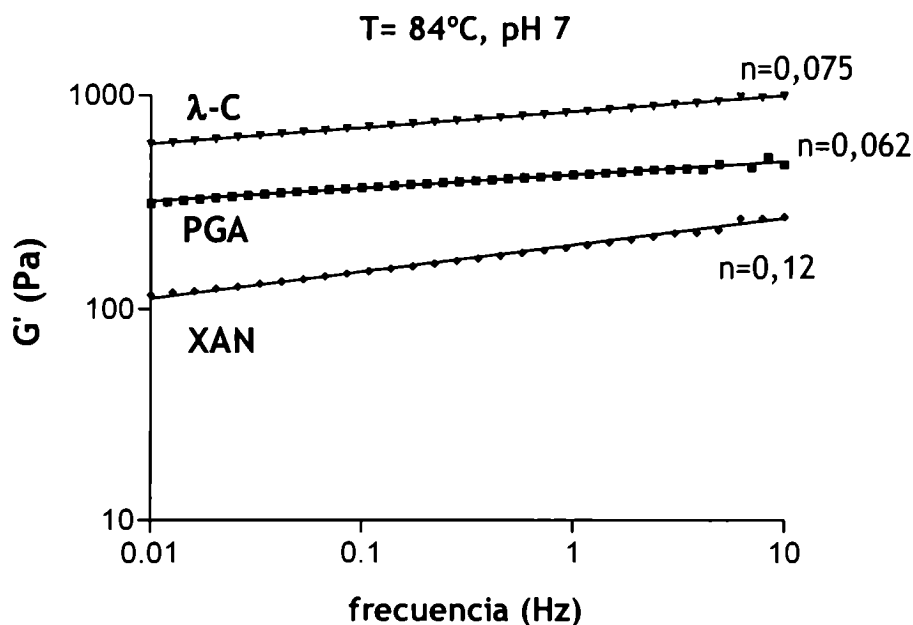


Figura I.4.2.7. Barrido de frecuencias (0,01-10 Hz) para geles mixtos de β -lg + PS, formados a 84 °C y pH neutro.

El valor de n aumentó en el orden β -lg+PGA $\leq$ β -lg+ λ -C $\ll$ β -lg+X. Esto indica una agregación más grosera y formación de agregados de tipo físico predominantemente en los geles

con goma xántica, mientras que el gel con PGA presenta una estructura en donde las cadenas poliméricas se formarían involucrando más uniones de tipo covalente. La mayor proporción de agregados de tipo físico en los geles con goma xántica indicaría además que los agregados formados en la estructura serían de mayor tamaño que los formados en el gel con PGA.

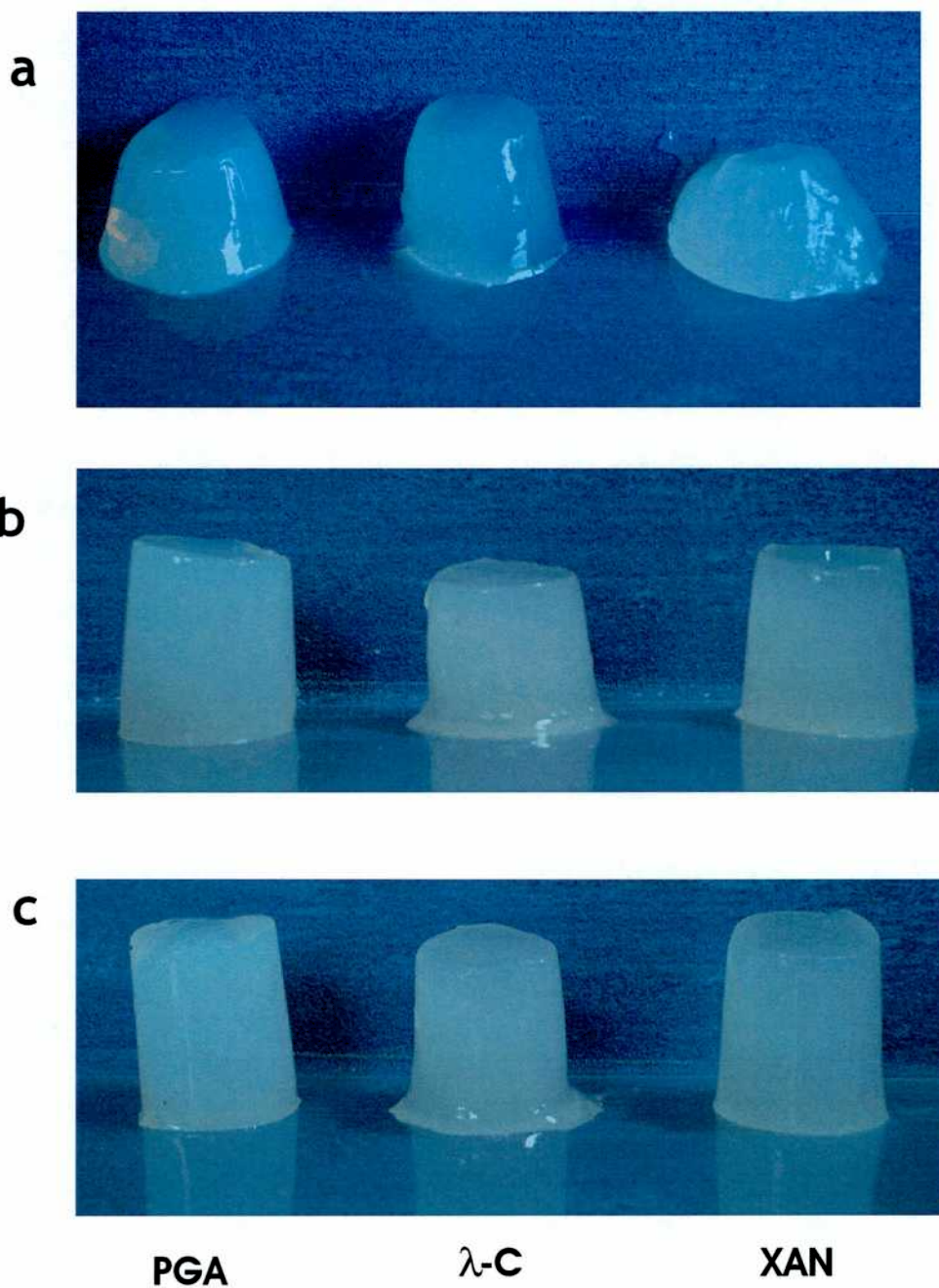


Figura I.4.2.8. Geles mixtos formados a diferentes temperaturas de calentamiento a pH neutro. a) T=80 °C, b) T=84 °C, c) T=88 °C.

La apariencia de los geles mixtos formados a pH neutro se observa en la **Figura I.4.2.8**. En ausencia de polisacáridos, los geles de β -lg formados con una concentración de alrededor del 10% eran casi transparentes; con el agregado de polisacáridos se obtienen geles translúcidos, de coloración blanquecina. Puede observarse que el aumento en la temperatura de calentamiento de los geles provoca un aumento en la opacidad de los geles, en el volumen y en la firmeza aparente de los mismos. Se ha observado un efecto similar en la apariencia de geles de β -lg obtenidos a pH neutro en presencia de otros polisacáridos tales como polipectato de sodio o pectinas (Ndi et al., 1996, Beaulieu et al., 2001)

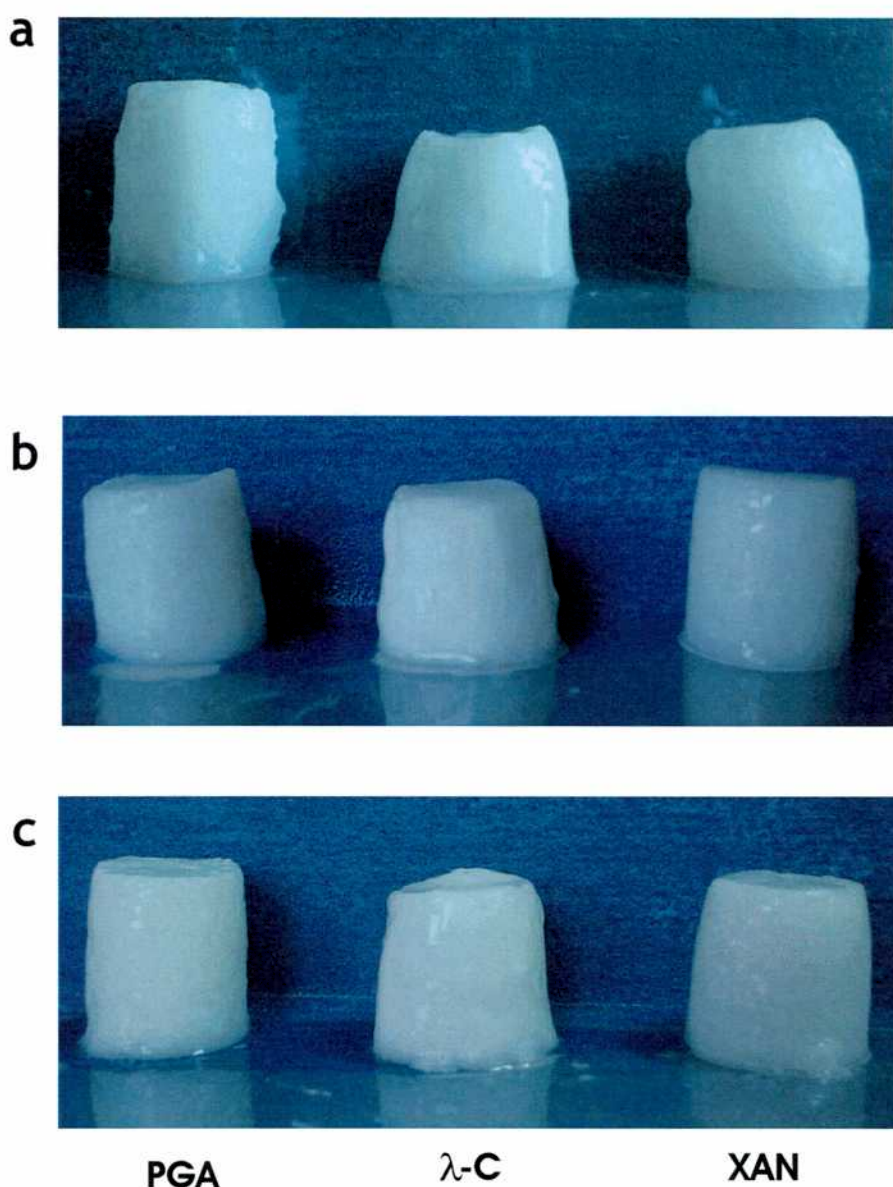


Figura I.4.2.9. Geles mixtos formados a diferentes temperaturas de calentamiento a pH 6. A) $T=80\text{ }^{\circ}\text{C}$, b) $T=84\text{ }^{\circ}\text{C}$, c) $T=88\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los geles mixtos formados a pH 6, mostraron una apariencia totalmente diferente a los geles formados a pH neutro (**Figura I.4.2.9**). Estos geles fueron totalmente opacos y de color blanco, presentando una mayor cantidad de líquido exudado.

I.4.2.4.2 Textura y pérdida de agua de los geles

Los ensayos de perfil de textura revelaron diferencias entre los sistemas, observándose un importante efecto de la temperatura y el pH.

En la **Figura I.4.2.10** se observa que el aumento en la temperatura de calentamiento, produjo sobre todo un aumento en la dureza de los geles. La adhesividad aumentó con la temperatura en los geles con PGA y λ -carragenano y se redujo en el caso de la goma xántica. La elasticidad presentó valores altos en general para todos los geles ($> 0,85$), y tendió a disminuir con la temperatura en el caso del PGA, a aumentar levemente a 88 °C en el λ -C y a aumentar más marcadamente en el caso de la xántica. La cohesividad de los geles aumentó en general con la temperatura. Solo en el caso de la xántica se observó un valor más alto para la temperatura de 84 °C respecto de las otras temperaturas. Los esfuerzos de fractura y dureza de los geles tienden a aumentar con la temperatura y tiempo de gelificación (Foegeding et al., 1995).

En cuanto a los geles a pH 6, se observó un aumento en la dureza para los sistemas con λ -C y xántica, un aumento en la adhesividad en todos los casos y una disminución en la elasticidad y cohesividad. La disminución del pH a valores más cercanos al pI de la proteína, provoca la formación de geles de tipo particulado, en donde las moléculas de proteína se agregan por medio de uniones no específicas y se forman agregados de gran tamaño. Como resultado de este tipo de agregación, los geles formados presentan una mayor dureza debido al engrosamiento de las cadenas de la red, pero su elasticidad y capacidad de retención de agua se ven reducidas.

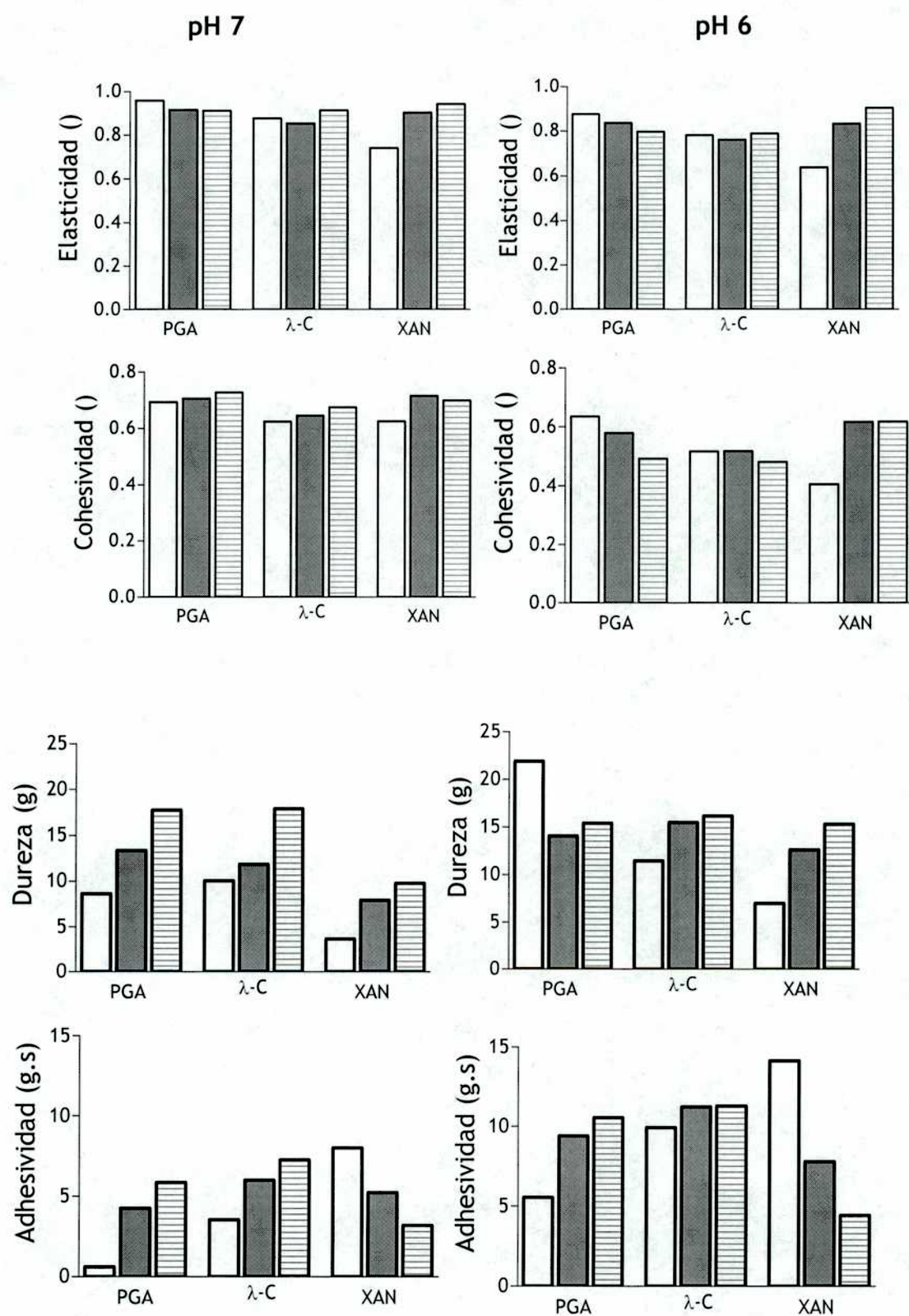


Figura I.4.2.10. Características de textura de geles mixtos β -lg (6%) + polisacáridos (0.5%) formados a diferentes temperaturas de calentamiento: $\square$ 80 °C, $\blacksquare$ 84 °C, $\hatched$ 88 °C y distintas condiciones de pH (6 y 7).

Una característica importante de los geles proteicos es su capacidad de retención de agua. En la **Figura I.4.2.11** se observa que los diferentes geles presentaron una variada capacidad de retención de agua. El gel con PGA presentó muy baja pérdida de agua (P_{H_2O}) a pH neutro, en todos los casos inferior al 5%. El gel con λ -C presentó una pérdida de agua mayor, sobre todo en los formados a 88°C, y el gel con xántica presentó muy baja pérdida de agua, salvo en el sistema formado a 88 °C, donde se observó un valor un poco superior. A pH 6 los valores de P_{H_2O} en los geles formados a 84 °C aumentaron notablemente. Solo en el caso del sistema con xántica se siguió observando un valor muy bajo de pérdida de agua. Las diferencias observadas en los valores de pérdida de agua de los geles, están relacionadas a las propiedades de la red proteica formada en cada caso y a las características propias de cada polisacárido. Las características de un polisacárido presente en la fase acuosa de la matriz del gel determinan la capacidad de retención de agua de los geles. En el caso de los geles con PGA, la moderada incompatibilidad entre los biopolímeros promueve la agregación de la proteína, pero no se produce una agregación tan grosera como en el caso de la goma xántica, según el tamaño de los agregados formados. A pH 6, se forman geles de tipo particulado con una mayor pérdida de agua. En presencia de goma xántica, la capacidad de retención de agua del gel no estaría determinada por el tipo de estructura proteica, sino por el relleno de los poros de la red. La gran capacidad de adsorción de agua de la goma hace que los geles presenten muy poca pérdida de agua en todas las condiciones estudiadas. Se ha reportado que en presencia bajas concentraciones de varios polisacáridos (pectinas, alginatos) se reduce notablemente la pérdida de agua de los geles (Dumay et al., 1999, Turgeon et al., 2001, Beaulieu et al., 2001).

En el caso del λ -C el aumento en la pérdida de agua se debe a la formación de una estructura más agregada que en el caso del gel con PGA, y a la menor capacidad de retención de agua del polisacárido en comparación con la xántica.

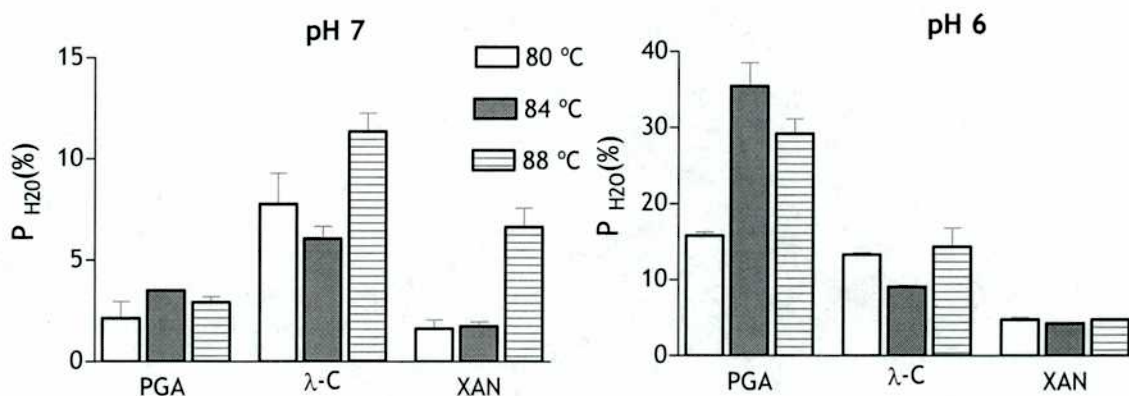


Figura I.4.2.11. Pérdida de agua (P_{H_2O}) de los geles mixtos a pH 7 y pH 6

1.4.2.5 Microestructura de los geles

El estudio de la microestructura, del tamaño de las cadenas de agregados y poros de los geles es de suma importancia para interpretar el comportamiento reológico y textural.

Se analizó la microestructura de los geles mixtos a pH 7 y 6 mediante microscopía electrónica de barrido. Los geles de proteínas globulares, tanto del tipo transparentes como opacos o particulados generalmente se estudian por técnicas de microscopía de transmisión (Aguilera, et al., 1999), debido a que el tamaño de las cadenas y partículas es menor a los 50 nm. En presencia de polisacáridos, se ha observado la formación de partículas de tamaño superior al micrón, por lo que en sistemas mixtos la microscopía de barrido es más adecuada. Además, las micrografías obtenidas mediante esta técnica dan una imagen volumétrica de las estructuras, con lo que se facilita la interpretación de las imágenes obtenidas.

En la **Figura I.4.2.12** y **I.4.2.13** se presentan las microestructuras de los geles, formados a 84 °C, a pH 7 y 6. La temperatura de formación de los geles fue elegida como la intermedia en las que se evaluaron otras características, permitiendo una interpretación general de los resultados obtenidos con cada polisacárido. Las estructuras observadas corresponden a sistemas particulados, excepto en el caso del gel con PGA a pH 7, en donde se observó una estructura lisa y continua, que corresponde a un gel de tipo “fine-stranded”. En la **Figura I.4.2.13** se muestra también en forma comparativa la microestructura de un gel de β -lg formado a pH 6 con un 12% de proteína, observándose un tamaño de agregados y cadenas mucho menor que en presencia de todos los polisacáridos. A pH neutro, si bien no se visualizan la micrografía, se obtuvo un gel de tipo “fine-stranded”, por lo que la estructura no se aprecia por microscopía de barrido.

A pH 7 en presencia de λ -C se forman agregados grandes y esféricos de aproximadamente 8 μ m de diámetro, observándose pocas zonas de unión entre los mismos (**Fig I.4.2.12.a**). Las partículas esféricas de entre 2 y 4 μ m de diámetro dispersas en la estructura podrían representar partículas agregadas del polisacárido dispersas entre los agregados de proteína. Esto último implicaría una microseparación de fases. Olsson et al. (2002) sugirió que en geles mixtos de β -lg con pectina de baja viscosidad, esta se encontraría sobre las cadenas de la estructura proteica, debido a las interacciones electrostáticas existentes entre ambos biopolímeros.

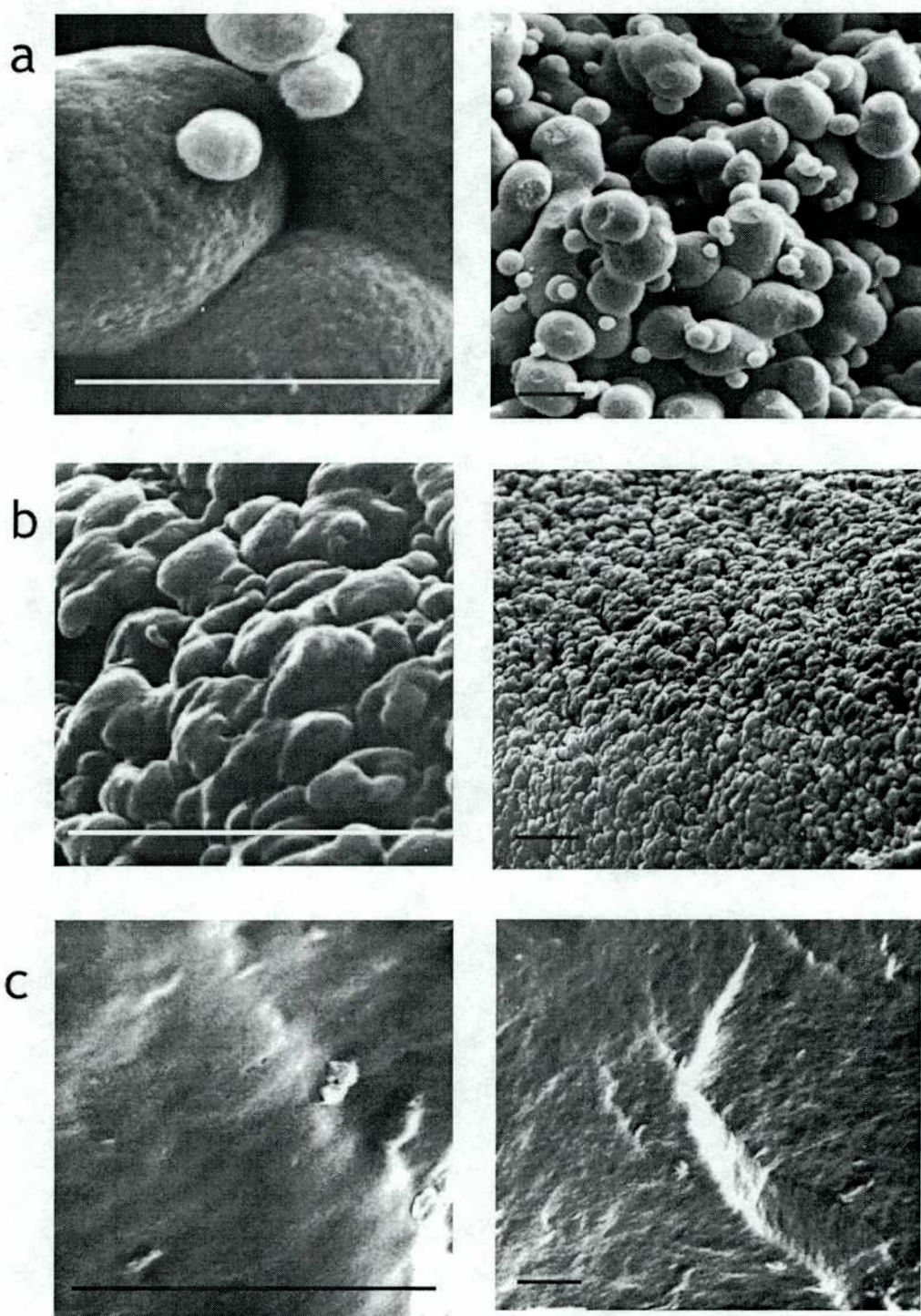
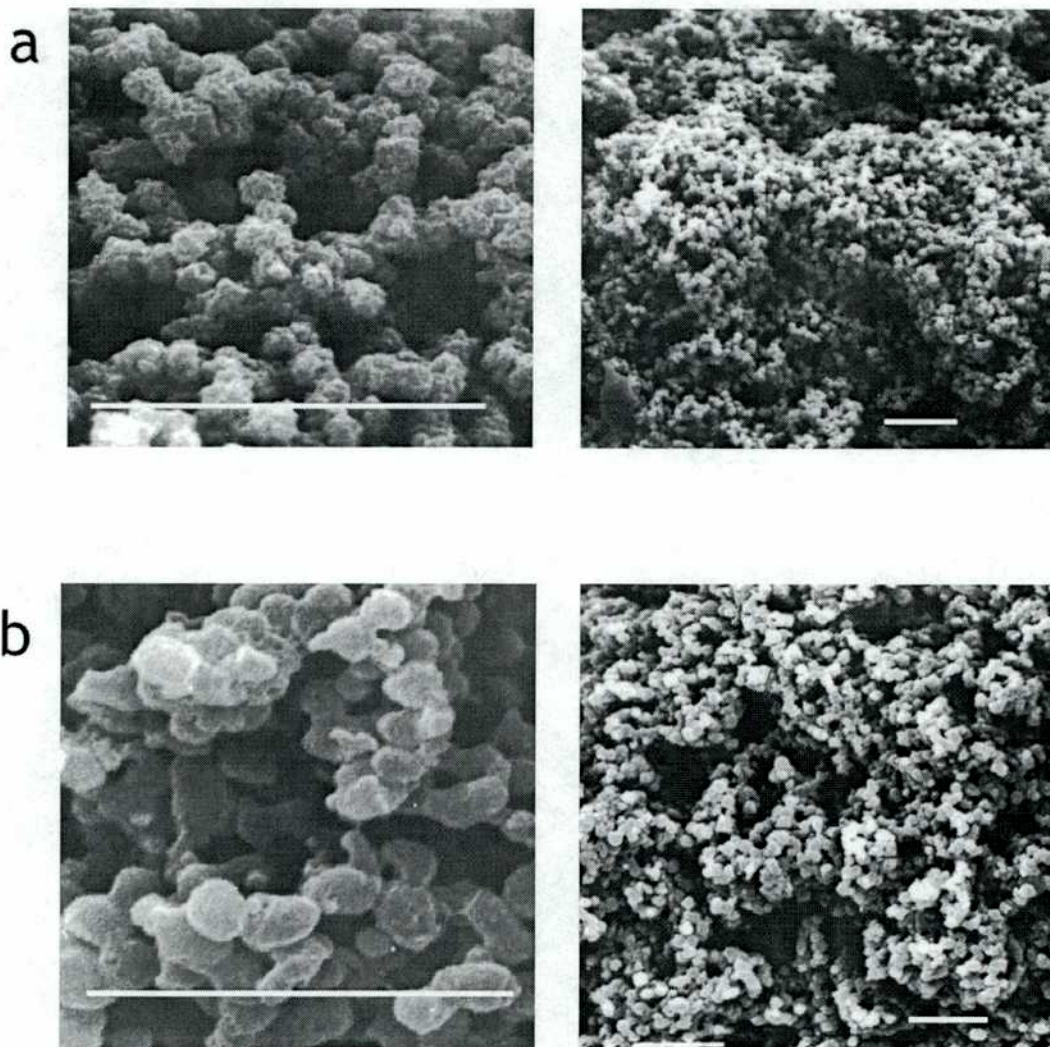


Figura I.4.2.12. Microestructuras de geles mixtos de β -lg (6%)-PS (0.5%) obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) a pH 7. (a) β -lg, (b) β -lg/ λ -C, (c) β -lg/Xan, (d) β -lg/PGA. Se muestran dos magnificaciones, la barra en ambas escalas indica una longitud de 10 μ m.

Estas inclusiones de partículas de menor diámetro no fueron observadas en los geles con goma xántica. Estos geles (**Fig I.4.2.12 b**) muestran una estructura densa formada por agregados lisos de

forma irregular, con un tamaño de aprox. 2 μ m, presentándose esto agregados como fundidos unos con otros.

A pH 6 se obtuvieron geles de estructura más regular en presencia de λ -C y goma xántica (**Fig I.4.2.13 a y b**). Estos geles mostraron una apariencia similar a los geles particulados de β -lg sola formados a mayores concentraciones, aunque el diámetro de las cadenas de agregados en el sistema de β -lg sola era mucho menor (**Figura I.4.2.13 d**). En los geles con λ -C las partículas o agregados forman gruesas cadenas con una estructura y distribución de poros más regular que lo observado a pH 7 (**Fig I.4.2.13.a**). Los agregados se encuentran asociados en grupos esféricos de alrededor de 1 μ m de diámetro, formando luego una cadena de agregados. Esto indica la formación de agregados 8 veces más pequeños que los observados a pH neutro.



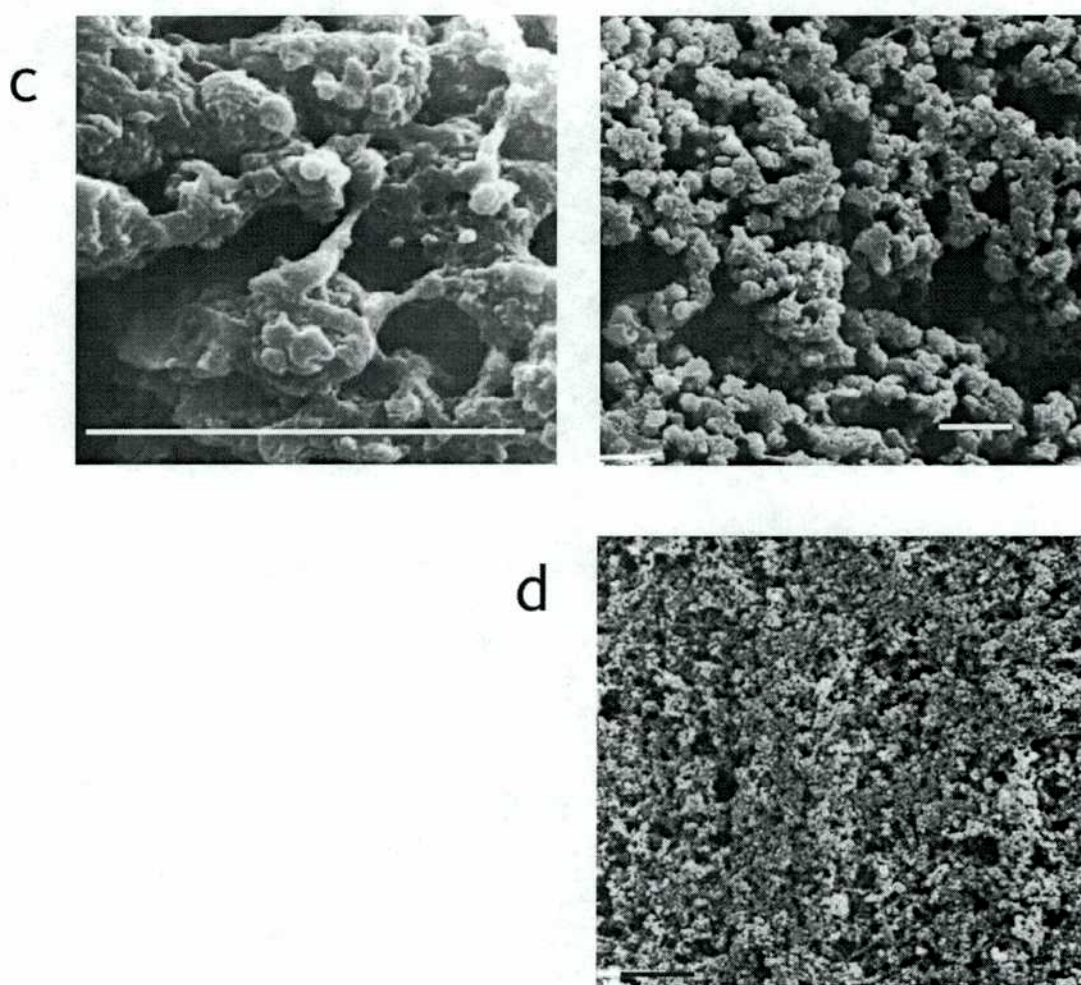


Figura I.4.2.13. Microestructura de los geles mixtos de β -lg (6%)-PS (0,5%) obtenida por Microscopía electrónica de barrido (SEM) a pH 6 (a) β -lg/ λ -C, (b) β -lg/XAN, (c) β -lg/PGA .(d) β -lg sola 12%. En las figuras (a), (b) y (c) se muestran dos magnificaciones, la barra en ambas escalas indica una longitud de 10 μ m.

La microestructura de los geles β -lg/XAN a pH 6 (**Fig I.4.2.13.b**) indica una reducción en el tamaño de los agregados a la mitad del valor que a pH 7, con una forma más esférica y no tan fundidos como a pH 7. Las partículas formadas en presencia de PGA a pH 6 (**Fig I.4.2.13.c**) muestran una estructura irregular, en forma de escamas en grupos, fundidas en una densa estructura. Estos grupos de escamas presentaban zonas de unión no muy extensas entre ellos.

Si se toman en cuenta los tiempos de gelificación observados en presencia de los distintos polisacáridos a pH 7 (sobretudo en los ensayos de “tilting”), se observa una correlación entre estos tiempos y el tamaño de agregados que forman la estructura. Esto es, a menor tiempo de gelificación se observa la formación de agregados de mayor diámetro. Esto sugiere que a mayor

incompatibilidad entre la proteína y polisacáridos en solución, se promueve la formación de agregados más grandes, y la gelificación se produce más rápidamente.

Los parámetros que mostraron una variación significativa con el tipo de polisacárido fueron la dureza, cohesividad y la pérdida de agua, los que correlacionaron bien con las características microestructurales. En presencia de la goma xántica, los bajos valores de dureza y G' registrados en ensayos de textura y reométricos, se deberían a la formación de grandes agregados, pero con poca continuidad entre ellos. La gran incompatibilidad existente entre la goma xántica y la β -lg sería la causa de una agregación grosera de la proteína, pero al mismo tiempo esta estructura formada bruscamente carece de conectividad en la estructura, lo que le otorga las características observadas. Olsson et al. (2002 a,b) estudió las estructuras formadas en presencia de pectina de diferentes viscosidades. En presencia del polisacárido, si bien se promovía la formación de agregados más grandes, un incremento en la dureza de los geles se observaba sólo ante un aumento en la conectividad de las estructuras agregadas. En los sistemas mixtos con pectina de alta viscosidad se producía una pérdida en la conectividad de las estructuras, con lo que se observaba una importante disminución en la dureza. En presencia de la goma xántica se produciría un efecto similar. La alta viscosidad del sistema dificulta la movilidad de los grandes agregados formados, y estos quedan inmovilizados en el sistema, sin posibilidad de agregarse entre sí. Las características pseudoplásticas con umbral de fluencia observadas para la xántica, dificultan la formación de estructuras con gran conectividad en condiciones estáticas de formación de los geles, como en las que se realizó la formación de los geles. Sin embargo, si el proceso incluye un determinado esfuerzo de corte, puede vencerse este umbral de fluencia y permitir la formación de agregados con una mayor conectividad. Walkenstrom et al. (1998) observó un aumento en los valores de G' obtenidos en sistemas mixtos de β -lg y Xántica con el esfuerzo de corte. Sin embargo, a altos valores de corte pueden romperse los agregados formados y observarse un descenso en el valor de G' .

En el sistema con λ -C, los agregados formados son de mayor tamaño, esféricos de apariencia lisa y la estructura muestra zonas de contacto entre los agregados y poros grandes entre ellos. Esta estructura parecería haberse formado en forma más ordenada que en el caso de la estructura con goma xántica, debido probablemente a una menor incompatibilidad del polisacárido con la β -lg. Este polisacárido posee una densidad de carga negativa menor que la goma xántica, presentando además un comportamiento pseudoplástico pero sin umbral de fluencia, lo que permite a los agregados difundir, formando la red y fortaleciendo las estructuras ya formadas.

En general, en todos los sistemas mixtos se observó que un aumento en la temperatura de calentamiento resultaba en la formación de geles más opacos, más firmes y con mayor exudado. El efecto del pH produjo un efecto similar en todos los sistemas mixtos. A pH más cercanos al pI de la

proteína, se observó una menor diferenciación en las características otorgadas por cada polisacárido, respecto al tiempo de gelificación, parámetros reológicos y texturales y microestructuras de los sistemas.

1.4.2.6 Efecto de los polisacáridos en geles con mayores porcentajes de proteína.

Hasta el momento se mostraron las características de geles mixtos de β -lg + polisacáridos en sistemas con bajo porcentaje de β -lg (6%), debido a que uno de los objetivos planteados al principio del trabajo fue la obtención de geles mixtos en condiciones en donde la proteína sola no gelifica. Sin embargo, el agregado de polisacáridos no sólo tiene como objetivo la disminución de la concentración de β -lg necesaria para gelificar. Mediante la gelificación de sistemas mixtos pueden obtenerse una amplia gama de productos gelificados, con características diferentes a las presentadas por geles de proteína sola. A continuación se muestran las características de geles proteicos formados a partir de soluciones al 10% de β -lg y de geles mixtos de β -lg /PS (10 %/0,5%).

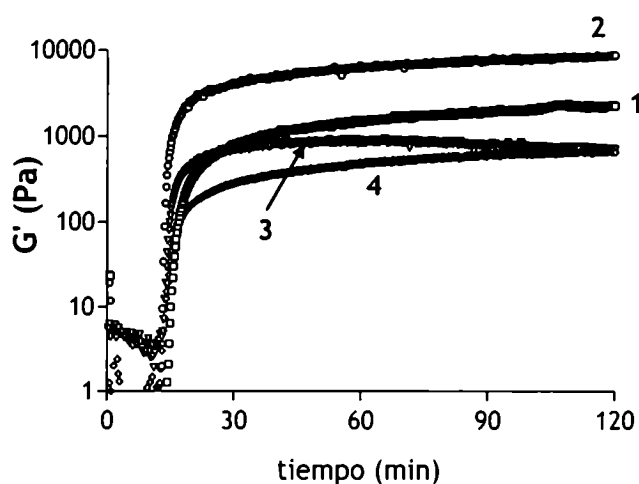


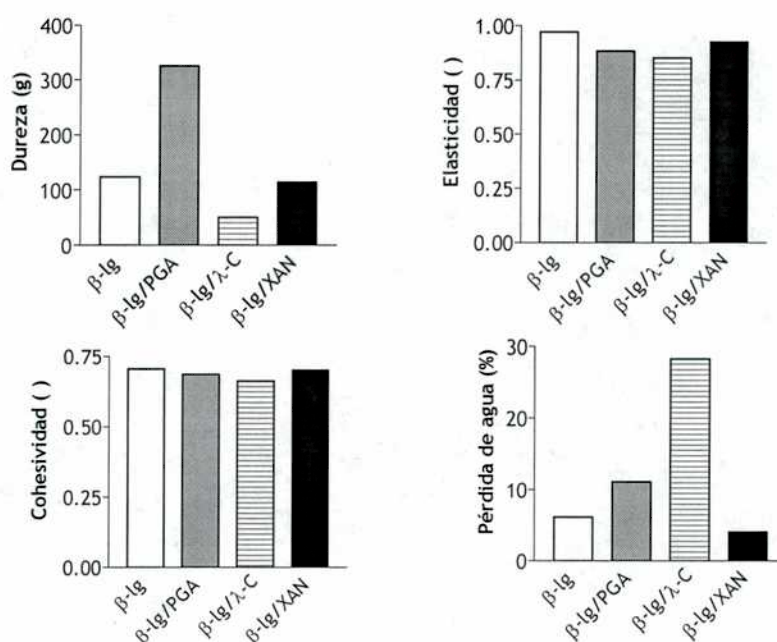
Figura I.4.2.14 Evolución de G' durante el calentamiento a 84 °C de geles mixtos de β -lg + PS (10%/0,5%).
(1) β -lg (2) β -lg/PGA, (3) β -lg/ λ -C, (4) β -lg/XAN

En la **Figura I.4.2.14** se muestra la evolución del módulo elástico durante el calentamiento a 84 °C. En presencia de PGA se observó un importante aumento de G' respecto de los geles de β -lg sola, mientras que en presencia de λ -C y XAN se observó un comportamiento contrario. Los valores máximos de G' alcanzados luego de 120 minutos de calentamiento se muestran en la **Tabla I.4.2.6**.

Tabla I.4.2.6. G' máximo obtenido en la gelificación de β -lg sola (10%) y sistemas mixtos β -lg/PS (10%/0,5%)

Sistema	$G'_{120\text{min}}$ (Pa)
β -lg sola	2374
β -lg + PGA	8952
β -lg + λ -C	714
β -lg + X	740

Los parámetros texturales y pérdida de agua de los geles mostraron grandes diferencias con el polisacárido presente (**Figura I.4.2.15**). En el gel con PGA se observó un importante aumento en la dureza respecto del gel de β -lg sola. Similarmente a lo observado con el módulo elástico, la presencia de XAN y λ -C produjeron una disminución en la dureza de los geles. En general, todos los geles fueron elásticos y cohesivos, aunque la presencia de PS tendió a disminuir el valor de estos parámetros respecto de los geles de β -lg sola.

**Figura I.4.2.15** Parámetros de textura y pérdida de agua para geles de β -lg (10%) y geles mixtos β -lg/PS (10%/0,5%)

Los geles de β -lg sola presentaron baja pérdida de agua, como se ha reportado previamente para geles de tipo “fine-stranded” formados a pH neutro. En presencia de PGA y λ -C se observó un aumento en la pérdida de agua que estaría relacionado a la formación de una estructura

particulada, en donde se llevaría a cabo una agregación más grosera debido a fenómenos de incompatibilidad termodinámica y a la alta concentración proteica. En los geles particulados se produce un aumento en el tamaño de agregados y poros en la estructura, lo que disminuye la retención de agua de los geles (Durand et al., 2002). Si bien en el sistema con goma xántica también se formaría una estructura particulada, el polisacárido presente en la fase dispersa o “relleno” posee una gran capacidad de adsorción de agua, lo que resulta en una muy baja pérdida de agua del gel mixto.

La comparación visual de los geles de β -lg sola y en presencia de los polisacáridos muestra el aumento en opacidad en los geles mixtos (**Figura I.4.2.16**). Esto sería debido a la formación de geles particulados en presencia de todos los polisacáridos, aún en bajos porcentajes en relación a la proteína.

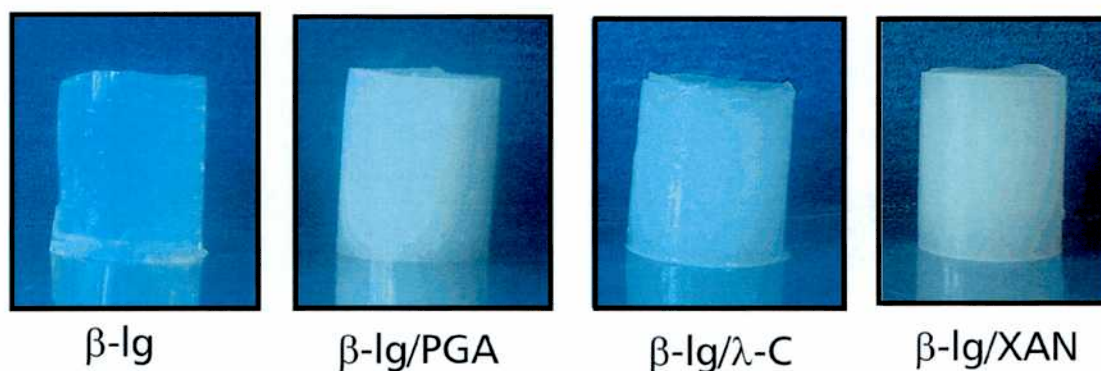


Figura I.4.2.16. Apariencia de geles de β -lg (10%) y geles mixtos de β -lg/PS (10%/0,5%), formados a 84 °C, pH 7.

I.4.2.6 Discusión: Factores intrínsecos de los polisacáridos que afectan su comportamiento en los sistemas mixtos

Las importantes diferencias observadas en presencia de los distintos polisacáridos en la formación de los geles, la dependencia con la temperatura y los parámetros reológicos obtenidos, confirman que las características particulares de cada polisacárido son un factor fundamental en el grado de interacción o incompatibilidad con la proteína y en el tipo de estructura formada. Las características moleculares de los polisacáridos y su afinidad por el solvente determinan en gran medida las propiedades de los sistemas mixtos. El grado de exclusión entre diferentes

macromoléculas depende de la flexibilidad, forma y tamaño de las macromoléculas además de su concentración en el seno de la fase (Tolstoguzov, 1995).

En este sentido, resulta de gran importancia determinar la capacidad de retención de agua de los polisacáridos y su comportamiento reológico ya que reflejan diferencias en su peso molecular e hidrofobicidad. Sánchez et al (1995) reportó valores de absorción de agua para diferentes polisacáridos, entre ellos la goma xántica y el PGA, observándose una capacidad de absorción de agua de 232 ml/g para la goma xántica y de 15 ml/g para el PGA. En la **Tabla I.4.2.5** se muestran los parámetros de la ecuación de Herschel-Burkley para las soluciones de polisacáridos al 0.5%.

Tabla I.4.2.5. Propiedades reológicas de soluciones de polisacáridos al 0,5 %

Sistema	τ_0 (D cm ⁻²)	K	n	μ (60 s ⁻¹) (cp)
PGA	-	0,039	1,00	3,81
λ - Carragenano		1,290	0,72	39,7
Goma Xántica	41,5	3,424	0,49	111,6

La goma xántica y el λ -carragenano presentaron un comportamiento pseudoplástico, con un coeficiente de consistencia de 0,4904 y 0,7258 respectivamente mientras que el PGA presentó un comportamiento Newtoniano. Además, la solución de goma xántica presentó un alto umbral de fluencia.

Las diferencias observadas reflejan las diferencias entre los polisacáridos en su peso molecular, estructura e hidrofiliidad. Se estima un peso molecular de $2,5 \cdot 10^3$ kDa para la goma xántica, de 720 kDa para el λ -Carragenano y 150 kDa para el PGA según lo reportado en diversos estudios (Sánchez et al, 1995, Sarker et al, 1999). El efecto diferencial de los polisacáridos en promover la gelificación de la proteína y las características de los geles tienen sin duda una estrecha relación con las características moleculares de los mismos.

El denominado fenómeno de volúmenes de exclusión está directamente relacionado con las características moleculares de los polisacáridos, la flexibilidad de las moléculas que los forman, la carga neta superficial en las condiciones del medio y el tipo de grupos polares que presentan. Las moléculas de goma xántica adoptan una conformación helicoidal similar a varillas rígidas sin tendencia a asociarse, la cual le da al polisacárido su carácter de agente espesante. Además el polisacárido desarrolla altas viscosidades en un amplio rango de temperaturas independientemente del pH (Oakenfull, 1998). Tanto el PGA como el λ -C son polisacáridos con una cadena polimérica lineal, y esto hace que desarrollen una viscosidad mucho menor .

Otra diferencia fundamental entre estos polisacáridos es el tipo y número de grupos polares presentes en la molécula. En el caso de la goma xántica, ésta presenta un alto grado de sustitución de las cadenas poliméricas, en forma de un trisacárido. Estos trisacáridos están presentes en cada residuo alternado de glucosa, y consisten en unidades de α -D-manosa, β -D-ácido glucurónico y β -D-manosa terminal. La presencia de ácido glucurónico y el grupo piruvato imparten un alto carácter aniónico a la goma (Lapasin y Priel, 1995).

El λ -carragenano presenta 3 grupos sulfato por cada 2 residuos de galactosa, lo que le brinda un fuerte carácter aniónico. Este polisacárido presenta un mayor número de grupos sulfato comparado con otros carragenanos tales como el κ o ι . Esta mayor carga negativa hace que exista una fuerte repulsión entre las cadenas poliméricas, lo que le impide la gelificación, presentando solo propiedades espesantes. Además, por su carga neta negativa, posee una alta solubilidad en agua y desarrolla una viscosidad relativamente alta en solución.

El PGA presenta una cadena lineal constituida por ácido D-manurónico y ácido L-gulurónico. Los grupos carboxilo presentes en las cadenas del polisacárido contribuyen a la retención de agua y a promueve fuertes repulsiones electrostáticas entre las cadenas. Parte de los grupos carboxilo de las cadenas se encuentran esterificados, y reemplazados por grupos propilenglicol. La presencia de estos grupos levemente hidrofóbicos previene una rápida penetración de agua, lo que explica la baja viscosidad desarrollada por el polisacárido en comparación con otros polisacáridos más negativamente cargados.

Zasykin et al (1996) estudiaron el proceso de gelificación de β -lg (7-17 %) en presencia de goma xántica (0,9%) y observaron que este polisacárido inducía la formación de grandes agregados de proteína, aunque la gran viscosidad de las soluciones en muchos casos impedía la unión entre los agregados para formar la matriz gelificada. Por lo tanto en estos sistemas muchas veces se obtienen texturas del tipo “spread” (esparcibles) en lugar de geles autosoportables. Si bien con las concentraciones utilizadas en este estudio se obtuvieron geles autosoportables en presencia de goma xántica, los bajos valores de G' y altos valores de $\tan \delta$ observados durante la formación de los geles reflejan en parte el comportamiento observado previamente por Zasykin et al. (1996).

A pH neutro existe una limitada compatibilidad entre los biopolímeros en solución, debido a que ambos poseen carga neta negativa a este pH. Sin embargo, la presencia de interacciones electrostáticas atractivas entre grupos negativos de los polisacáridos con grupos positivos de la proteína, disminuye el grado de incompatibilidad entre los biopolímeros. En los sistemas con PGA, debido al bajo peso molecular y al carácter parcialmente hidrofóbico del mismo, la intensidad de las repulsiones electrostáticas entre el polisacárido y la proteína sería menor que en el caso del λ -C o goma xántica, o en otras palabras, existiría una mayor compatibilidad entre los biopolímeros en solución. Esta mayor compatibilidad produciría un efecto moderado del polisacárido en la

gelificación de proteína, y si bien a pH neutro el desarrollo de la estructura es lento, con suficiente tiempo de calentamiento pueden obtenerse geles con elevados valores de G' y de elasticidad.

Además de los fenómenos de incompatibilidad y volúmenes de exclusión que ocurren en mezclas de proteínas y polisacáridos, pueden ocurrir también en estos sistemas fenómenos de complejamiento por interacciones específicas entre grupos de las cadenas de ambos biopolímeros. Estas interacciones dependerán de las características de las moléculas de cada polisacárido. En sistemas mixtos de proteínas y PGA pueden producirse reacciones de entrecruzamiento entre el grupo éster del ácido manurónico y el grupo ϵ -amino de la lisina para dar un enlace de tipo amida (Dickinson & Euston, 1991). La formación de complejos covalentes entre proteínas y polisacáridos se produce especialmente bajo condiciones de calentamiento, por lo que durante el proceso de gelificación podrían ocurrir.

El estudio de las propiedades dinámicas, macro y microestructurales de los geles de β -lg en presencia de diferentes polisacáridos indica que los geles con PGA fueron más afectados por cambios en el pH, temperatura de calentamiento y concentración. En presencia de PGA a pH neutro se forman geles de tipo “fine-stranded”, como ocurre en geles de proteína sola, pudiéndose obtener también geles particulados al variar la composición y concentración total del sistema. Por lo descrito anteriormente y debido a que los geles mixtos con PGA fueron los que presentaron mejores características de textura, resultó interesante profundizar el estudio de los sistemas mixtos β -lg + PGA.

TERCERA SECCIÓN

1.4.3 EFECTO COMBINADO DE VARIABLES QUE AFECTAN LAS CARACTERÍSTICAS DE GELES MIXTOS DE β -LG + PGA

1.4.3.1 Estudios por DLS del efecto del PGA en la agregación de β -lg

El método de dispersión dinámica de luz ha sido utilizado para el estudio de la agregación térmica de la β -lg en un amplio rango de condiciones del medio. Esta técnica da información cuantitativa y cualitativa acerca de los agregados formados durante el calentamiento, así como de la velocidad de formación de dichas partículas. Particularmente la utilización de esta técnica ha llevado a una mayor comprensión del mecanismo de agregación de la β -lg que tiene lugar durante el calentamiento, en un amplio rango de condiciones (Roefs et al., 1994, Elofsson et al., 1996, Sharma et al., 1996, Hoffmann et al., 1996, Haque et al., 1997, Bauer et al., 1998, Le Bon et al., 1999, Durand et al., 2002, Alting et al., 2003)

1.4.3.1.1 Efecto del pH

Para estudiar el efecto del PGA en el tamaño de los agregados de β -lg formados, se calentaron soluciones de β -lg sola y β -lg + PGA a 68 °C, observándose un comportamiento totalmente diferente en ambos casos (**Figura 1.4.3.1**). En soluciones de β -lg sola, si bien no se observó gelificación, se obtuvieron agregados de tamaño constante en ambas condiciones de pH. A pH más cercanos al pI de la proteína (5,2) se obtuvieron agregados de aproximadamente 140 nm, mientras que a pH neutro se formaron agregados de menor tamaño (aprox. 50nm). Sin embargo, los agregados de mayor tamaño observados a pH 6 se formarían a expensas de una muy baja cantidad de proteína desnaturizada, debido a la mayor estabilidad térmica de la proteína en estas condiciones de pH.

En la **Sección 1.4.1** los perfiles electroforéticos realizados a pH neutro mostraban una importante disminución en la banda de proteína nativa durante el calentamiento a 68 °C. Las electroforesis nativas realizadas a pH 6 en soluciones de β -lg sola y en presencia de polisacárido durante el calentamiento a 68 °C, no mostraron una disminución apreciable en las bandas de proteína nativa (**Figura 1.4.3.2**) lo que indica una mayor estabilidad térmica de la proteína a pH 6. Tampoco se observaron los agregados correspondientes a las observaciones por DLS, debido probablemente al gran tamaño de los mismos, que no permitiría su entrada en el gel “stacking” y en el de corrida.

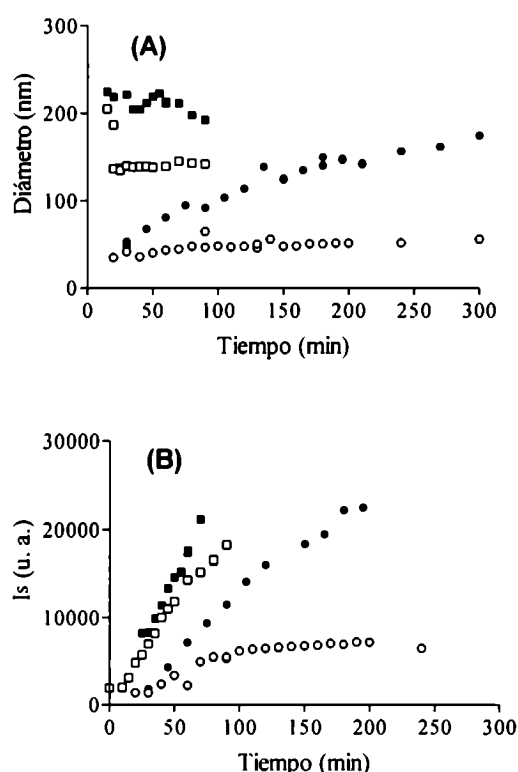


Figura 1.4.3.1 Efecto del pH en la agregación de soluciones de β -lg pura (6%) y soluciones mixtas de β -lg/PGA(6%/0.5%): (A) Diámetro hidrodinámico aparente, d_h (nm) y (B) Intensidad de luz refractada, I_s (U. A.) versus tiempo. ($\square$) β -lg pH6, ($\blacksquare$) β -lg/PGA pH6, ($\circ$) β -lg pH7, ($\bullet$) β -lg/PGA pH7.

Estudios previos muestran la formación de pequeños agregados de diámetro de 10 a 100 nm en soluciones de β -lg sola (6% p/p) calentadas a 70 °C a pH neutro (Sharma et al., 1996). El diámetro hidrodinámico registrado en soluciones de β -lg a T ambiente es de alrededor de 5,5-6,8 nm, para la forma dimérica de la proteína. Esto indicaría que los agregados formados en la solución de β -lg sola estarían constituidos en promedio por alrededor de 15 unidades de β -lg a pH neutro (50 nm) y por 40 unidades a pH 6 (150 nm).

La presencia de PGA produjo un aumento en el tamaño de los agregados en ambas condiciones de pH, aunque no se observó gelificación de los sistemas debido a la baja temperatura de calentamiento. Como se mostró los tiempos de gelificación de soluciones de β -lg/PGA por debajo de la temperatura de pico de gelificación fueron muy largos (**Figura 1.4.2.1**), requiriéndose probablemente mucho más que 300 minutos de calentamiento a 68 °C para la obtención de un gel.

Se obtuvieron agregados de un diámetro aproximado de 180 nm y 210 nm a pH 7 y 6 respectivamente luego del calentamiento. Sin embargo, se observó que el efecto del polisacárido fue más importante a pH neutro. La velocidad de formación de agregados aumentó notablemente en presencia de PGA a pH 7, mientras que a pH 6, casi no se observó efecto en la velocidad inicial

de crecimiento de los agregados en el sistema mixto. En la electroforesis mostrada en la **Figura I.4.3.2** se observan perfiles muy similares para las soluciones de β -lg sola y en presencia de PGA a pH 6. En estas condiciones no se observó la formación de pequeños agregados. Los agregados observados aparecen en la zona superior del gel de corrida y en el “stacking”, pero la banda de β -lg nativa no sufre una reducción apreciable en ambos sistemas. Esto indicaría la formación de muy pocos agregados a pH 6 debido probablemente a la baja temperatura de calentamiento. Hoffmann et al. (1999) observó una mínima conversión de β -lg a pH 6 (menos del 10% luego de 24 hs de calentamiento a 65 °C), aunque la turbidez de las soluciones calentadas indicaba la formación de grandes agregados en estas condiciones.

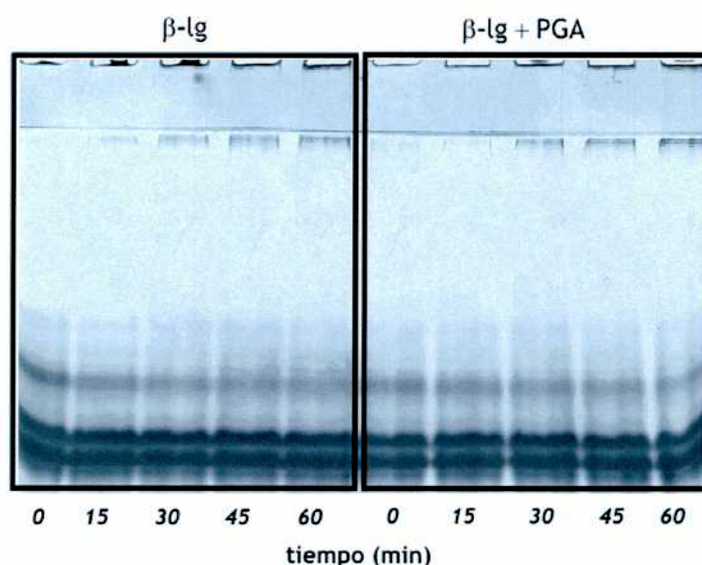


Figura I.4.3.2 PAGE-Electroforesis nativa de soluciones de β -lg (6%) y β -lg/PGA (0,5%) a pH 6 calentadas a 68 °C por diferentes tiempos.

Ndi et al. (1996) observó la formación de agregados de alto peso molecular al calentar soluciones de β -lg al 5% en presencia de polipeptato de sodio debido a fenómenos de incompatibilidad termodinámica entre los biopolímeros a pH 6,5. Los resultados observados indicarían que a pH 6 la formación de agregados involucra más uniones de tipo físicas o no específicas que dan lugar a agregados de gran tamaño, a diferencia de lo que ocurre a pH 7, en donde los agregados van creciendo gradualmente debido principalmente a reacciones de intercambio tiol-disulfuro. La presencia de PGA promueve la formación de agregados de mayor tamaño observados por DLS, aunque en las condiciones de temperatura y tiempo aplicadas no producen una disminución significativa en la banda de proteína nativa a este pH.

I.4.3.1.2 Efecto de la concentración de proteína y PGA

Se evaluó el efecto del agregado de PGA en el diámetro hidrodinámico y la intensidad I_s de los agregados de β -lg a pH neutro a dos concentraciones diferentes de proteína: 3% y 6 % (**Figura I.4.3.3**). El porcentaje relativo de PGA se mantuvo constante en los experimentos, de manera que las concentraciones totales de los sistemas mixtos β -lg/PGA fueron 6%/0.5% y 3%/0.25%.

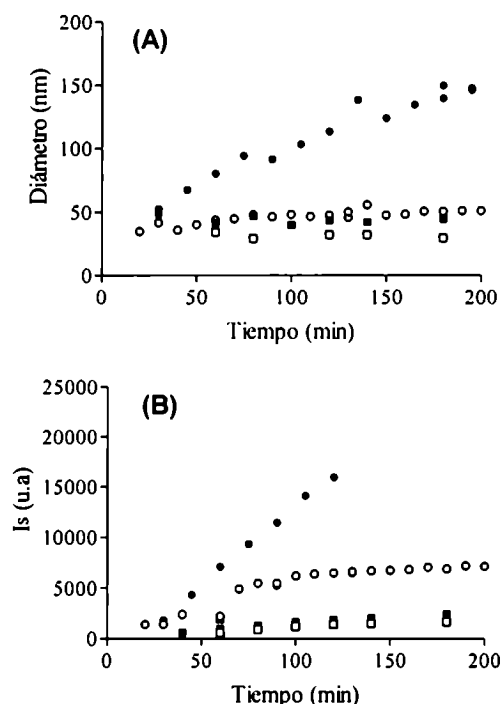


Figura I.4.3.3. (A) Diámetro hidrodinámico aparente, d_h (nm) e (B) Intensidad refractada, I_s (u. a.) versus tiempo para soluciones de β -lg. y β -lg/PGA calentadas a $68 \pm 1^\circ\text{C}$. Las concentraciones de las soluciones a pH neutro fueron: ($\square$) 3% β -lg, ($\blacksquare$) 3% β -lg/0.25%PGA, ($\circ$) 6% β -lg, ($\bullet$) 6% β -lg /0.5%PGA.

En la solución de menor concentración de proteína sola se observó la formación de pequeños agregados (30 nm) y bajos valores de I_s . El agregado de PGA incrementó levemente estos valores. En estas condiciones, el diámetro de los agregados (< 45 nm) indicaría que éstos están formados por alrededor de 11-12 unidades de β -lg (peso molecular 200-220 Kda). Este resultado se confirmó por electroforesis de β -lg (3%) y β -lg+PGA (3%/0.25%) (**Figura. I.4.3.4**) en donde se observa la aparición de nuevas bandas a mayores tiempos de calentamiento. En geles realizados al 6% de β -lg en condiciones nativas y disociantes (con SDS), se observó una similitud importante en la ubicación de las bandas de agregados (no mostrado) en ambas condiciones, con lo que podría decirse que en los geles nativos el peso molecular de los agregados observados se encuentra entre 10-200 kDa.

Luego de 45 min de calentamiento, los agregados observados en el stacking corresponderían a los de tamaño máximo observados en esas condiciones, de alrededor de 45 nm (> 220 kDa). En presencia de PGA, sólo se observa entre los sistemas una pequeña diferencia en el aumento de intensidad de los agregados en el gel separador a los 30 min. y un aumento en la cantidad de agregados en el stacking luego de 60 min. de calentamiento.

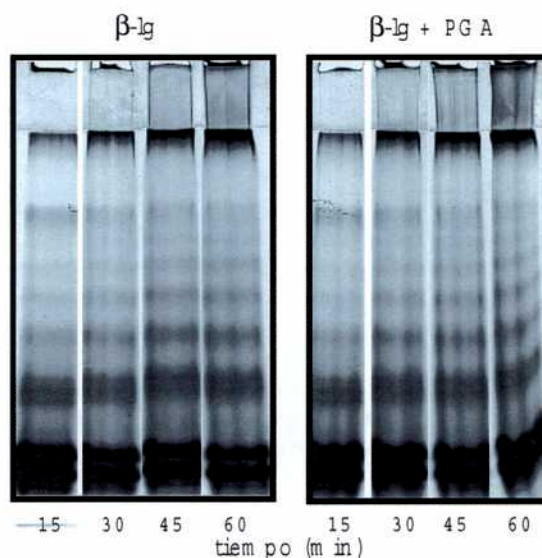


Figura I.4.3.4 PAGE-electroforesis (nativa) para soluciones de β -lg (3%) y β -lg/PGA (3%/0,25%) a pH neutro calentadas a 68 °C por diferentes tiempos

A mayores concentraciones de proteína (6%) se observó un incremento en el diámetro y velocidad de crecimiento, de acuerdo a lo reportado previamente por Hoffman et al. (1996) quien estudió por DLS la agregación de β -lg en un rango de concentración entre 1,5 y 10%, observando la formación de agregados de entre 10 y 100 nm (Hoffmann et al., 1996). Otros estudios reportan diámetros de entre 50 y 65 nm en el rango de concentraciones de 3-9 % (Alting et al., 2003).

La presencia de PGA produjo un gran aumento en d_h e I_s , obteniéndose agregados de aproximadamente 150 nm (**Figura I.4.3.3**). El fenómeno de incompatibilidad termodinámica entre proteínas y polisacáridos tiene lugar generalmente a pH por encima del pI de la proteína, donde ambos biopolímeros tienen carga del mismo signo (Tolstoguzov, 1997a). Aún sin observarse separación de fases en el presente sistema, la existencia de interacciones repulsivas entre las moléculas de los diferentes biopolímeros lleva a un aumento en el potencial químico de la proteína en solución, o en otras palabras, en su actividad termodinámica lo cual se traduce en un aumento de su concentración efectiva. Esta limitada incompatibilidad termodinámica entre los biopolímeros explicaría el aumento producido en d_h e I_s en presencia del polisacárido, efecto similar al observado por aumento en la concentración de proteína.

Se evaluó el efecto de la concentración de PGA en el tamaño de los agregados de β -lg (6%). La **Figura I.4.3.5** muestra las curvas de d_h y de I_s durante el calentamiento a 72 °C. Los valores de d_h y de I_s aumentaron en presencia de concentraciones crecientes de PGA. Se observó un aumento notable del tamaño de los agregados para concentraciones superiores a 0,5%. La velocidad de crecimiento de los agregados (pendiente inicial en los gráficos de I_s en función del tiempo) se incrementó notablemente a partir de un 0,75 % de PGA. Para las concentraciones más altas de PGA (0.75 y 1%) se observó un constante crecimiento de los agregados durante el tiempo de medición.

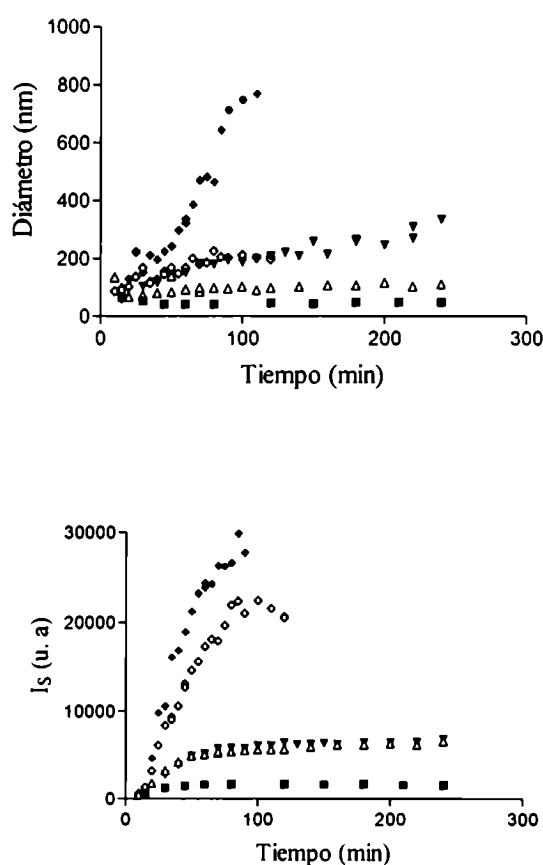


Figura I.4.3.5. Efecto de la concentración de PGA en la agregación de soluciones de β -lg (6%)/PGA a pH neutro. El proceso de agregación fue llevado a cabo a 72°C. (A): Diámetro hidrodinámico aparente, d_h (nm) e (B) Intensidad refractada, I_s (u. A.) vs tiempo. Concentraciones de PGA: (■) 0%, (Δ) 0.25%, (∇) 0,5% ($\diamond$) 0.75%, ($\circ$) 1%.

El efecto observado al aumentar la concentración de polisacárido es similar al descrito por Hoffman et al. (1997) al aumentar la concentración de proteína. Durante el tiempo de medición de

los parámetros por DLS no se observó gelificación en los sistemas debido probablemente a la baja temperatura de calentamiento (72 °C). La apariencia de las soluciones luego del calentamiento no fueron similares. Las soluciones de β -lg sola mostraron una coloración blanquecina, casi transparente. En el caso de los sistemas mixtos, luego del calentamiento se observó una coloración blanca en las soluciones, con un aumento de opacidad en presencia de concentraciones crecientes de PGA. En la **Figura I.4.3.6** se observa la apariencia de soluciones luego del calentamiento durante 100 minutos a 72 °C. Puede observarse que en presencia de un 1 % de PGA se obtiene una solución totalmente blanca y opaca. Concentraciones más altas de PGA (2%) pueden llevar a una separación de fases como se muestra en **Figura I.4.3.6**.

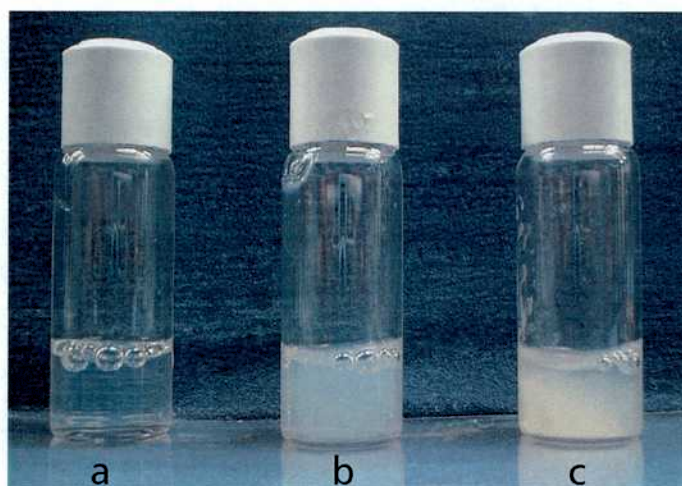


Figura I.4.3.6. Apariencia de soluciones calentadas a 72 °C durante 100 minutos: (a) β -lg 6%. (b) β -lg 6%/PGA 1%, (c) β -lg 6%/PGA 2%

Los geles de poliacrilamida muestran resultados coincidentes con los de la **Fig. I.4.3.5**. Luego del calentamiento a 72 °C durante 100 min, en condiciones nativas se observa una importante reducción en la banda de β -lg nativa respecto de la solución no calentada (no se muestra en la figura). Los agregados formados no entran en el gel de resolución, sino sólo en el stacking, indicando la formación de agregados de más de 200 kDa. En presencia de PGA casi no se observan agregados en el stacking, indicando la formación de agregados aún más grandes.

En los geles con SDS se observa en la parte superior del gel separador y en el stacking la aparición de agregados. Esto indicaría la presencia de uniones hidrofóbicas entre los agregados. Sin embargo, en presencia de 2% de PGA no se observaron estos agregados, posiblemente debido a que la alta concentración de PGA induce la formación de agregados muy grandes de difícil

disolución en el buffer de corrida. En presencia de β -Me se observa la entrada de β -Ig en el gel de resolución debido a la ruptura de enlaces covalentes, en menor medida para las soluciones con 2% de PGA. Este último resultado podría indicar la formación de otras uniones covalentes además de las de tipo disulfuro entre moléculas de proteína. En sistemas mixtos de proteínas y PGA se ha reportado la formación de complejos covalentes entre grupos ester de polisacárido con grupos ϵ -amino de los residuos de lisina en la proteína (Dickinson & Euston 1991). Durante el calentamiento de las soluciones mixtas podría favorecerse la formación de estas uniones, sobre todo a altas concentraciones de PGA, lo que explicaría que aún en condiciones de reducción de las uniones disulfuro la proteína no entre en el gel de corrida.

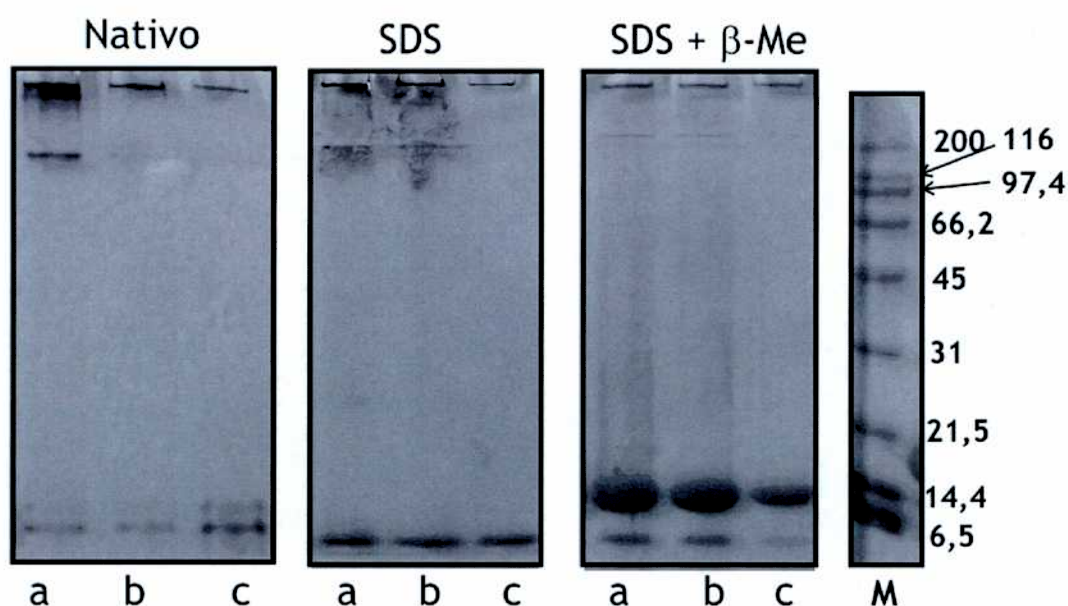


Figura I.4.3.7 Electroforesis en condiciones nativas y desnaturalizantes para soluciones de (a): β -Ig sola (6%), (b): β -Ig/PGA (6%/1%), (c): β -Ig/PGA (6%/2%) luego de un calentamiento a 74 °C durante 100 minutos. M: Marcador de pesos moleculares (en kDa).

En conclusión, la presencia de PGA tiene un rol fundamental en el tamaño de los agregados de β -Ig formados durante el calentamiento. El aumento en el tamaño de los agregados explicaría la gelificación de los sistemas mixtos en condiciones en donde la proteína sola no gelifica, según se observó en la sección anterior para temperaturas y tiempos de tratamiento mayores. Sin embargo, debe considerarse que una concentración demasiado alta de PGA puede llevar a una separación de fases, no permitiendo de esta forma la inclusión de la fase acuosa en donde se encuentra disuelto el PGA en la matriz del gel, como se observó para las soluciones con 2% de PGA.

I.4.3.2 Estudio del efecto combinado del pH, sólidos totales y relación β -lg/PGA, en las características de geles mixtos mediante la metodología de superficies de respuesta

Se ha mostrado que según la cantidad de polisacárido presente en el sistema y el pH del medio, el PGA promueve la agregación de la proteína moderadamente en bajas concentraciones y a pH neutro y puede llegar a producir la formación de grandes agregados a pH 6 o a mayores concentraciones. Este comportamiento se verá reflejado en las características de los geles que se obtengan, que podrán ser del tipo particulados o “fine-stranded”. Por lo tanto, resulta de interés el estudio del efecto combinado de las diferentes variables en las características de los geles mixtos de β -lg + PGA.

Para ello se utilizó la metodología de superficies de respuesta que permite analizar el efecto de cada una de las variables y sus interacciones. Esta metodología ha sido empleada para el estudio de sistemas mixtos de κ -C en presencia de proteínas del lactosuero (Tziboula et al., 1998) o de caseínas (Lundin et al., 1998).

En el presente trabajo se seleccionó una red de Doehlert de tres factores (Doehlert, 1970) para estudiar el efecto de los sólidos totales (S), la fracción en peso de PGA (%) en la mezcla (F_{PGA}) y el pH en características tales como pérdida de agua, dureza, elasticidad y viscoelasticidad de los geles. El diseño experimental requiere de una variación de siete, cinco y tres puntos de las variables estudiadas. La concentración de sólidos totales fue la variable de la que se tomó más puntos de variación, ya que en las pruebas experimentales se observó gran variación en las propiedades de los geles con el aumento de la concentración. Para el pH se tomó una variación de tres valores: 6, 6,5 y 7, todos por encima del pH isoelectrico de la proteína, y donde se observaron grandes variaciones en las características visuales de los geles. Los valores de las variables (reales y codificados) se muestran en a **Tabla I.4.3.1**.

Al preparar los sistemas de acuerdo al diseño experimental (**Tabla I.4.3.2**) no se observó separación de fases antes o después del calentamiento.

Tabla I.4.3.1. Valores reales y codificados de las variables estudiadas

Variable	Valores reales y (codificados)
PH	6 (-0,8165); 6,5 (0); 7 (0,8165)
S (%)	7 (-0,866); 8 (-0,5774); 9 (-0,2887); 10 (0); 11 (0,2887); 12 (0,5774); 13 (0,866)
F_{PGA} (%)	5 (-1); 10 (-0,5); 15(0); 20 (0,5); 25 (1)

Se evaluaron las respuestas de un total de 15 puntos, incluyendo las tres repeticiones del punto central. En la **Tabla I.4.3.2** se detalla el valor de las tres variables en cada punto experimental, indicando además el porcentaje de proteína y polisacárido en cada uno. Se utilizó un modelo cuadrático completo de 10 coeficientes para describir las respuestas (P_{H_2O} , dureza, elasticidad y parámetro viscoelástico A):

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_1^2 + b_5X_2^2 + b_6X_3^2 + b_7X_1X_2 + b_8X_1X_3 + b_9X_2X_3 \quad \text{Ec(I.4.3.1)}$$

donde b_i son los coeficientes de regresión dados por el modelo. El diseño experimental fue analizado mediante el programa Statgraphics 5.1, que permitió la obtención de todos los coeficientes de la regresión, y mediante el cual se generaron las superficies de respuesta. Las variables independientes resultaron significativas para $P < 0,05$ en el modelo completo, las que se mantuvieron en el modelo reducido.

Tabla I.4.3.2. Red de Doehlert. El punto central se indica en negrita

Punto	Sólidos totales (% p/p)	Fracción PGA (%)	pH	% proteína	% PGA
1	10	15	6,5	8,5	1,5
2	10	25	6,5	7,5	2,5
3	10	5	6,5	9,5	0,5
4	13	20	6,5	10,4	2,6
5	7	10	6,5	6,3	0,7
6	7	20	6,5	5,6	1,4
7	13	10	6,5	11,7	1,3
8	11	20	7	8,8	2,2
9	9	10	6	8,1	0,9
10	9	20	6	7,2	1,8
11	12	15	6	10,2	1,8
12	11	10	7	9,9	1,1
13	8	15	7	6,8	1,2

El análisis de regresión arrojó términos estadísticamente significativos para todos los coeficientes en el caso de la pérdida de agua (P_{H_2O}), dureza y el parámetro viscoelástico A (**Tabla I.4.3.3**). Para la elasticidad el término de segundo orden para F_{PGA} fue no significativo, y por lo tanto se excluyó del modelo reducido final. En todos los casos el término “lack of fit” fue significativo, lo que indica que el orden de la ecuación no resulta secundario. Sin embargo, cuando se incluye una gran cantidad de datos en el análisis, un modelo con un “lack of fit” significativo puede utilizarse de todos modos (Box y Drapper, 1987). En este análisis, se consideraron los coeficientes con un $R^2 > 0,89$ como evidencia de la aplicabilidad del modelo en el rango de las variables estudiado.

Las variables que tuvieron más efecto en la pérdida de agua de los geles fueron F_{PGA} y su interacción con los sólidos totales, S, indicado por el valor relativamente grande de su coeficiente en el modelo (**Tabla I.4.3.3**). El valor positivo del término lineal de F_{PGA} indica que la pérdida de agua aumenta con un incremento de la fracción de PGA en la mezcla. El término cuadrático negativo para F_{PGA}^2 sugiere la existencia de un valor máximo de P_{H_2O} para un incremento en F_{PGA} . El término negativo para el coeficiente de interacción entre F_{PGA} -S indica una interacción sinérgica entre estas variables que contribuye a una disminución en P_{H_2O} . La variable que menos afectó P_{H_2O} fue el pH, como muestra el bajo valor observado para los coeficientes lineal y cuadrático. Los sólidos totales tuvieron un efecto más importante en el término cuadrático que en el lineal, indicando que P_{H_2O} tiene un máximo que es función de los sólidos totales.

Respecto de la dureza de los geles, los términos más importantes de la regresión fueron los de F_{PGA} y sólidos totales (lineales y cuadráticos) y las interacciones de S con el pH y F_{PGA} . El pH fue la variable que tuvo menos efecto en la dureza de los geles. El valor negativo del coeficiente lineal para F_{PGA} indica que la dureza de los geles se reduce al aumentar la fracción de polisacárido en la mezcla y el término cuadrático positivo indica la existencia de un mínimo. Los sólidos totales mostraron términos lineal y cuadrático positivos, lo que indica un aumento no lineal de la dureza con los sólidos totales. Los valores negativos y relativamente altos de la interacción F_{PGA} -S y S-pH sugieren efectos antagónicos entre las variables involucradas. Al aumentar conjuntamente estos parámetros se obtiene una disminución en la dureza.

Tabla I.4.3.3 . Coeficientes de regresión estimados por regresión múltiple

Coeficiente	Pérdida de agua (%)	Dureza (g)	Elasticidad	Parámetro viscoelástico A
Constante	57,67	14,07	0,861	0,760
<i>Lineales</i>				

F_{PGA}	13,14	-35,27	-0,034	0,043
S	-1,78	16,70	-0,013	-0,075
pH	-2,29	0,999	0,049	-0,021
<i>Cuadráticos</i>				
F_{PGA}^2	-11,38	36,83	(0,003)	0,054
S^2	-4,84	16,87	-0,029	0,038
pH^2	2,42	-1,56	-0,020	0,003
<i>Interacciones</i>				
F_{PGA} -S	-19,58	-15,61	0,008	0,144
F_{PGA} -pH	5,78	-1,48	0,022	-0,110
S-pH	5,37	-16,27	-0,042	0,043
R^2	0,897	0,912	0,954	0,888
Lack of fit	*	*	*	*

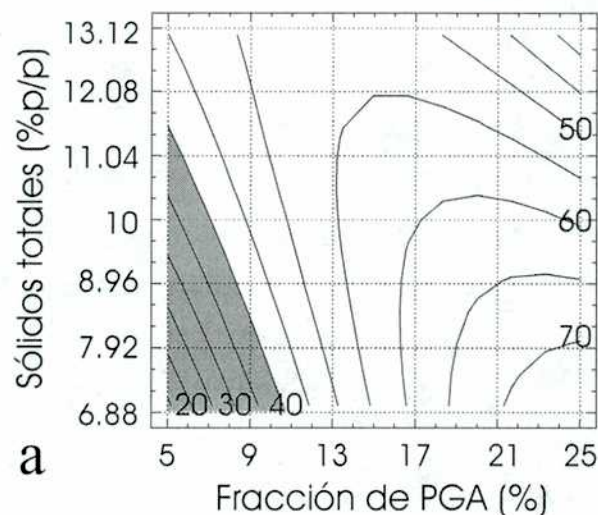
() coeficientes no significativos ($P > 0,05$)

Las variables que más afectaron la elasticidad de los geles fueron principalmente el pH y su interacción con sólidos totales, también F_{PGA} , su interacción con el pH y S^2 . La elasticidad aumentó con el pH y muestra un máximo indicado por el término cuadrático negativo. La fracción de PGA mostró sólo un efecto negativo lineal indicando que la elasticidad se reduce con un aumento en F_{PGA} . Los sólidos totales tuvieron un efecto lineal y cuadrático negativos, mostrando una reducción no lineal de la elasticidad con el aumento en sólidos totales.

El parámetro viscoelástico A fue principalmente afectado por los sólidos totales. El término negativo del coeficiente lineal y positivo del término cuadrático indican que el carácter sólido del gel (menores valores de A) aumenta con un aumento en los sólidos totales hasta alcanzar un valor máximo. Por el contrario, un aumento en la fracción de PGA en la mezcla reduce el carácter sólido (valores positivos de los términos lineal y cuadrático). Los valores altos de los coeficientes de interacción F_{PGA} -S y F_{PGA} -pH indican su gran efecto en la viscoelasticidad de los geles. La interacción entre F_{PGA} y sólidos totales es antagónica respecto de su efecto en la viscoelasticidad de los geles. Contrariamente, el término F_{PGA} -pH muestra una interacción sinérgica.

Se generaron líneas de isorespuesta o de contorno para cada parámetro analizado en función de los sólidos totales y F_{PGA} . Como la variación de las respuestas con el pH fue menor que para las otras variables, se generaron estos gráficos para el valor de pH intermedio (pH 6,5). La **Figura I.4.3.8a** muestra la línea de contorno para la pérdida de agua de los geles. El área sombreada determina las condiciones de sólidos totales y F_{PGA} óptimas para obtener geles de β -lg+PGA con un valor aceptable de pérdida de agua (tomado arbitrariamente $< 40\%$). Cada línea de isorespuesta por debajo del 50 % de P_{H_2O} está caracterizada por tener una concentración aproximadamente constante de PGA y variable de β -lg. Esto indica que la cantidad de PGA en los sistemas es el factor determinante en la pérdida de agua en esta zona. Puede concluirse que los geles con mejores propiedades de retención de agua se obtienen a bajos sólidos totales y baja fracción de PGA.

Las líneas de isorespuesta obtenidas para la dureza (**Fig I.4.3.8b**) muestran que para altos valores de sólidos totales y bajo porcentaje de PGA se obtiene una buena dureza de los geles. Los valores máximos se obtuvieron para soluciones con porcentajes medios o altos de proteína y bajos porcentajes de PGA. La zona sombreada corresponde a las combinaciones de sólidos totales y F_{PGA} que resultan en geles de buena dureza (definidos para >50 g de acuerdo a observaciones visuales y táctiles de las muestras). Esta zona está delimitada por geles formados con un bajo porcentaje de β -lg y PGA (6,5% β -lg/0,35%PGA) y por geles con alto porcentaje de proteína y relativamente alto porcentaje de PGA (11,3% β -lg/1,7%PGA).



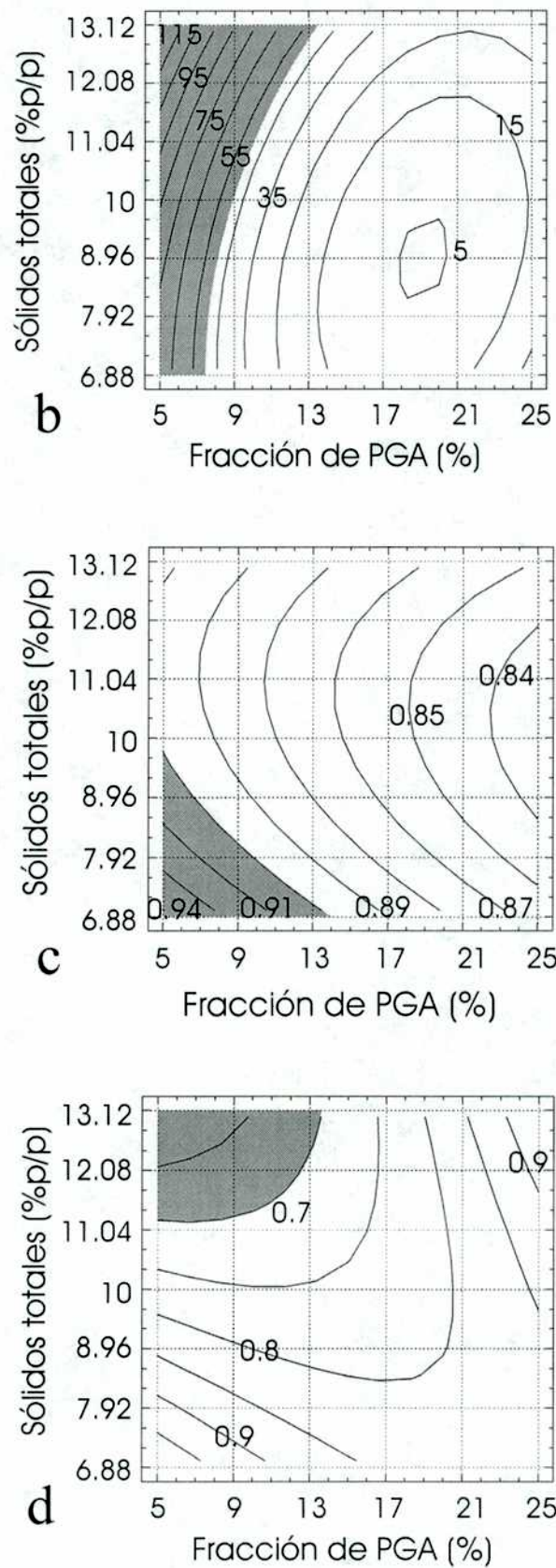


Figura I.4.3.8 Líneas de contorno o isorespuesta para (a) Pérdida de agua, (b) Dureza, (c) Elasticidad (d) Parámetro viscoelástico A. Las superficies fueron generadas para condición constante de pH 6.5

La variable de mayor efecto en la elasticidad fue el pH, aumentando el carácter elástico entre 6,5-7. Las superficies de respuesta para la elasticidad (pH 6,5) mostradas en la **Figura I.4.3.8c**. muestran que los valores máximos para la elasticidad se obtuvieron bajo condiciones de bajos sólidos y baja F_{PGA} y coincide principalmente con la zona de mínima pérdida de agua. El carácter sólido de los geles (parámetro viscoelástico A) aumentó (disminución de A) con una reducción en el pH. La mejor combinación para la obtención de un alto carácter sólido ($A < 0,7$) se logró a pH 6 y 6,5 para altos sólidos y baja F_{PGA} , que coincide principalmente con la zona de óptima dureza de los geles (**Figura I.4.3.8d**).

La **Figura I.4.3.9a** muestra la microestructura de un gel de pH 6,5 con mínima pérdida de agua (14,5%), alta elasticidad (0,914) y un valor medio de dureza (74,5g), correspondientes a las áreas que aparecen sombreadas en las **Figuras I.4.3.9a y c**. Se obtuvo una estructura de tipo irregular, formada por partículas lisas irregulares como escamas fundidas unas con otras, sin poros aparentes en la estructura.

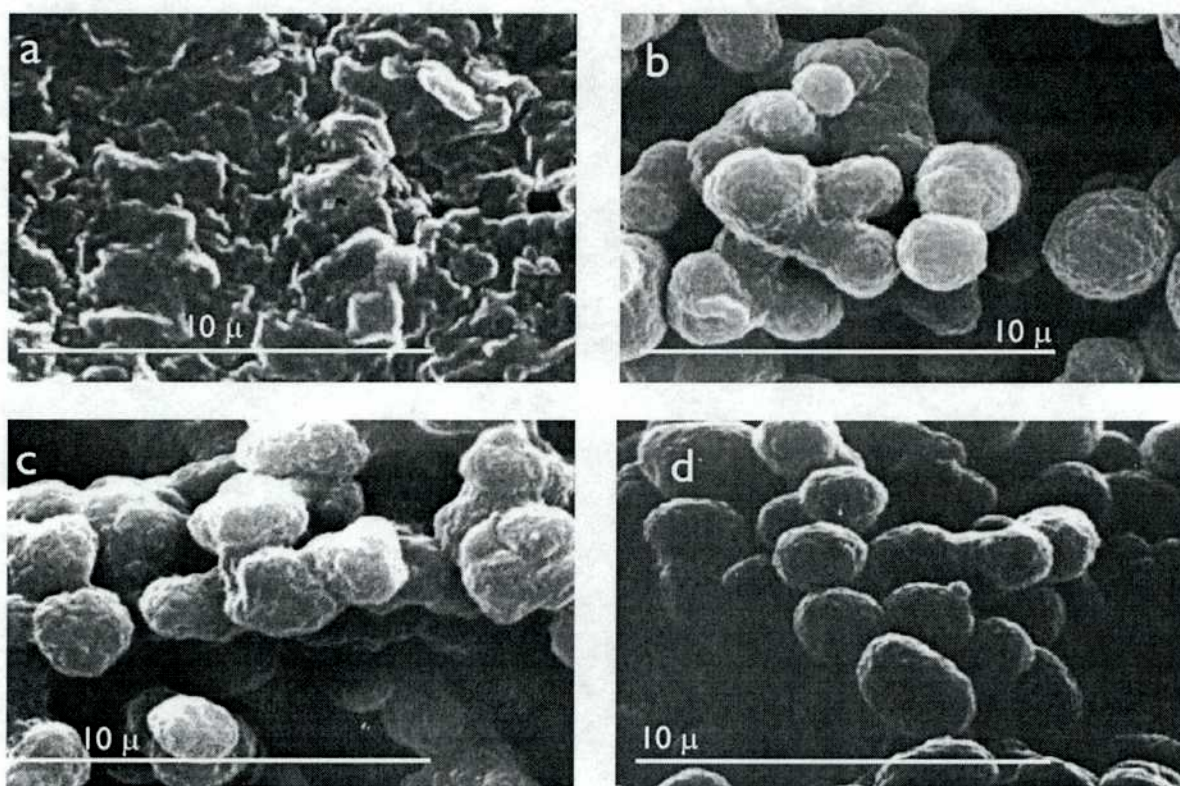


Figura I.4.3.9 Microscopías (SEM) de geles β -lg/PGA a pH 6,5. (a) Sólidos=7,98%, F_{PGA} =6 (7,5% β -lg/0,48%PGA); (b) Sólidos=9%, F_{PGA} =21 (7,08% β -lg/1,92%PGA); (c) Sólidos=12,52%, F_{PGA} =6 (11,77% β -lg/0,75% PGA); (d) Sólidos=12,5%, F_{PGA} =25 (9,5% β -lg/3%PGA)

La **Figura I.4.3.9.b** corresponde a un gel con dureza mínima (18,5g), carácter sólido bajo, elasticidad moderada (0,843) y pérdida de agua alta (66,4 %). La microestructura presentada es totalmente diferente a la de la **Figura I.4.3.9a**. La red del gel consiste en gruesas cadenas formadas por partículas agregadas de forma casi esférica de 2-3 μ m de diámetro dependiendo de la composición. Los geles de las **Figuras I.4.3.9 a y b** presentan una concentración similar de β -lg (7,08-7,5%), pero el gel de la **Figura I.4.3.9b** tiene una concentración más alta de PGA que el de la **Figura I.4.3.9a** (1,92% y 0,48 % respectivamene). Por lo tanto, debe concluirse que el aumento en la concentración de PGA en los sistemas promueve la agregación de la β -lg debido a un fenómeno de incompatibilidad termodinámica entre los biopolímeros en solución. Sin embargo, esta mayor agregación observada disminuye la dureza, elasticidad y capacidad de retención de agua de los geles.

La estructura densa y compacta de apariencia lisa sin poros aparentes (**Fig. I.4.3.9a**) puede explicar la baja pérdida de agua y las buenas propiedades mecánicas. A medida que el tamaño de poros es menor, mejores son las características de retención de agua (Hermansson, 1994). La **Figura I.4.3.9c** muestra la microestructura de un gel a pH 6.5, conteniendo 0,75% de PGA y 11,6% de β -lg. Este gel presenta baja proporción de PGA, como el gel mostrado en la **Figura I.4.3.9a**, pero un mayor contenido en sólidos totales (12,45%) y proteína. La microestructura es similar a la observada en la **Fig I.4.3.9b**, indicando que un aumento en la proporción de polisacárido tiene un efecto similar a un aumento de concentración de proteína. En las mediciones realizadas por DLS se había observado un efecto similar. Sin embargo, las propiedades del gel de la **Fig I.4.3.9c** fueron muy diferentes a las del gel de la **Fig I.4.3.9b**. Los primeros exhiben dureza muy alta (123,8 g) y alto carácter sólido ($A < 0,7$), como se observa en las áreas sombreadas de las **Figuras I.4.3.8b y d**. Además presentan valores intermedios de P_{H_2O} (47,8%) y elasticidad (0,887). La estructura particulada podría ser responsable de las diferencias en las propiedades mecánicas. Las partículas que forman las cadenas observadas en la **Figura I.4.3.9b** no parecen estar tan fundidas unas con otras y muestran partículas de menor diámetro que las observadas en las **Figura I.4.3.9c**. Al realizarse los ensayos de textura los geles en la **Figura I.4.3.9b**, se disgregaban con gran facilidad y mostraban gran pérdida de agua. La **Figura I.4.3.9d** muestra la microestructura de una gel con un contenido alto de sólidos totales, como el gel de la **Figura I.4.3.9c** pero con alta F_{PGA} . La estructura particulada es similar al gel de la **Figura I.4.3.9b**, además de las características similares de dureza (25g), elasticidad (0,832) y pérdida de agua (58,8%).

Se puede concluir que al aumentar la concentración de PGA a altos o bajos sólidos totales, se obtienen geles de tipo esparcibles con poca retención de agua y baja dureza. Al aumentar la concentración de proteínas en geles de β -lg sola se observa un incremento notable en la dureza de los mismos. Sin embargo los resultados obtenidos muestran que si se aumentan conjuntamente las

concentraciones de ambos componentes resulta en un gel de malas propiedades mecánicas y de retención de agua.

CUARTA SECCIÓN

1.4.4 ESTUDIO DEL ROL DEL PGA EN LA GELIFICACIÓN DE LA β -LACTOGLOBULINA

El proceso de gelificación es un mecanismo complejo, en el que se producen simultáneamente un gran número de reacciones. De acuerdo a la temperatura y tiempos de calentamiento, se favorecen diferentes reacciones que resultan en la formación de geles de distintas características. A temperaturas por debajo de la de desnaturalización de la proteína, se ha reportado que en soluciones de β -lg sola el proceso limitante para la formación de geles es la desnaturalización, mientras que a temperaturas más altas el proceso global está limitado por la velocidad de agregación de la proteína (Verheul et al., 1998c).

Por lo tanto, se analizó el efecto del PGA en las diferentes etapas involucradas en el proceso de gelificación: desnaturalización y agregación de la proteína, comparando los procesos con y sin la presencia del polisacárido. La cinética de estos procesos se estudió a diferentes temperaturas y se comparó con la cinética global de formación del gel determinada reológicamente.

Las concentraciones utilizadas en este estudio fueron de 6% de proteína y 0,5 % de polisacárido, Para estos estudios, se eligió nuevamente una concentración de proteína cercana a la mínima necesaria para gelificar en presencia del polisacárido, y una concentración de polisacárido que promueve la agregación de proteína en forma moderada sobre todo a altas temperaturas, donde el tiempo de gelificación se reduce en forma notable. De esta forma puede obtenerse información sobre los procesos que tienen lugar durante la gelificación de los sistemas, evitando una gelificación muy rápida.

1.4.4.1 Cinética de gelificación de geles mixtos β -lg + PGA

La dinámica del desarrollo de la estructura de los geles de β -lg + PGA se realizó mediante el registro de la evolución del módulo elástico (G') y viscoso (G'') en el tiempo de calentamiento a diferentes temperaturas desde temperaturas por debajo de la de inicio de desnaturalización de la proteína (72 °C) hasta temperaturas por encima del pico de desnaturalización (88 °C).

Como ejemplo, en la **Figura I.4.4.1** se muestra la evolución de G' y G'' y el perfil de temperatura durante el calentamiento a 76 °C. El tiempo de gelificación se determinó como el tiempo de cruce de G' y G'' que ocurrió en todos los casos durante el período de calentamiento a temperatura constante. Por lo tanto en las condiciones de estos ensayos se puede asumir una gelificación isotérmica.

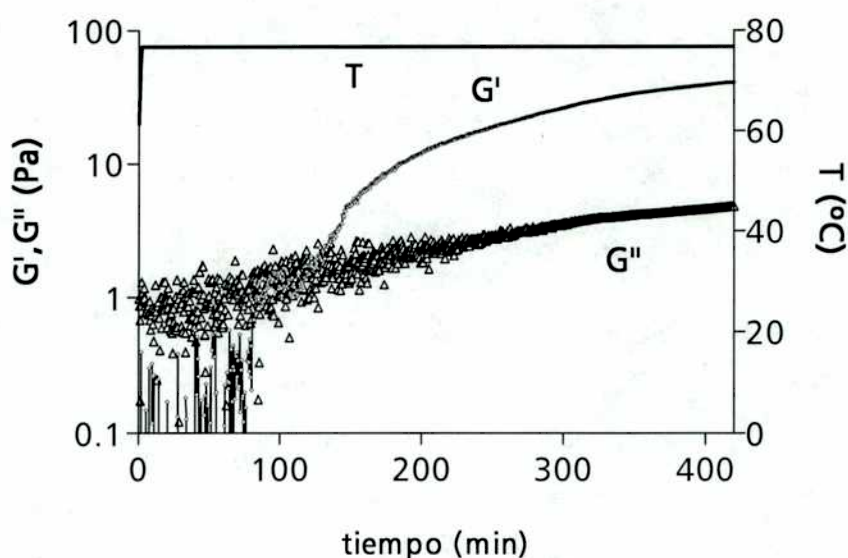


Figura I.4.4.1 Evolución de G' y G'' y perfil de temperatura durante la gelificación de β -lg + PGA a 76 °C.

Como se mencionó en secciones anteriores, en los sistemas de β -lg sola no se observó gelificación, y las curvas de G' y G'' permanecieron siempre en la zona de ruido, aún a largos tiempos de calentamiento. Los tiempos de gelificación en presencia de PGA (t_{gel}), disminuyeron de 160 a 13 minutos cuando se incrementó la temperatura de 72 a 84 °C (**Tabla I.4.4.1**).

Tabla I.4.4.1. Tiempos de gelificación en función de la temperatura de calentamiento obtenidos por ensayos de pequeñas deformaciones (t_{gel}) y ensayo de "tilting" (t_{til}) para sistemas mixtos β -lg/PGA (6%/0,5%). También se indica el porcentaje de β -lg desnaturalizada hasta t_{gel} y t_{til}

$T(^{\circ}C)$	t_{gel} (min)	Proteína desnat. a t_{gel} (%)	t_{til} (min)	Proteína desnat a t_{til} (%)
72	160	3,4	-	-
76	120	13	200	20,3
80	38	20,5	80	37,7
84	13	32,7	50	77,4

En el punto de gel, donde se forma una matriz de masa crítica, queda fijada la estructura espacial primaria del gel. La velocidad de formación de esta estructura primaria del gel puede ser evaluada como $1/t_{gel}$ para cada temperatura de calentamiento.

Graficando los valores de $1/t_{gel}$ vs $1/T$ se obtienen los gráficos de Arrhenius que se muestran en la **Figura I.4.4.2**. De la pendiente de estas rectas ($R^2=99,02\%$) se calculó la energía de activación correspondiente al proceso de formación de la estructura primaria del gel. Dicha energía de activación fue de 256 kJ/mol.

Para todas las temperaturas, tanto G' como G'' se desarrollaron en forma similar. Sin embargo, debido al carácter predominantemente elástico de los geles G' exhibió valores finales alrededor de 10 veces mayores en magnitud que los de G'' . Por lo tanto, sólo los valores de G' se discuten en relación al desarrollo de la estructura gelificada, ya que este parámetro da cuenta del aumento en las características elásticas o sólidas del gel. Los valores de G' aumentaron rápidamente durante el calentamiento a T constante en las primeras etapas del calentamiento, luego aumentaron más lentamente y finalmente se estabilizaron al final del calentamiento. Sin embargo, no fue alcanzado un "plateau" o valor constante de G' durante el tiempo de medición (150-600 min). Luego de la formación de la red primaria en el punto gel, más proteína es incorporada en la red, engrosando las cadenas de la matriz primaria (Verheul et al., 1998b). Como resultado, aumenta la rigidez de la red luego del tiempo de gelificación, observándose un aumento de G' de aproximadamente 100 veces. Los tiempos de calentamiento requeridos para aumentar los valores de G' en un factor de 100 fueron 10-40 veces mayores que los tiempos de gelificación o formación de la matriz primaria. Este fenómeno indica que la formación de grandes agregados en la estructura del gel es un proceso que ocurre lentamente.

La evolución de G' con el tiempo de calentamiento luego del punto de gel fue ajustada con la siguiente ecuación que describe una cinética de primer orden:

$$G' = G'_{\infty} (1 - \exp(-k_G t)) \quad \text{Ec.(I.4.4.1)}$$

donde G'_{∞} es el valor final de G' luego de un tiempo largo de calentamiento y k_G es la constante de velocidad de desarrollo de la estructura. El ajuste de las curvas se realizó a partir del punto gel (t_{gel}), llevando las curvas a cero en la escala de tiempos.

Los altos coeficientes de regresión ($R^2 = 98,8-99,9 \%$) obtenidos indican que la Ec. I.4.41 describe satisfactoriamente la evolución de G' en el tiempo. La influencia de la temperatura en la velocidad de desarrollo de la estructura (k_G) fue baja, considerando el bajo valor de energía de activación obtenido (78 ± 3 kJ/mol) de los gráficos de Arrhenius en la **Figura I.4.4.2**. Por lo tanto, puede concluirse que la temperatura afecta principalmente la velocidad de formación de la estructura primaria del gel, siendo el desarrollo secundario de la estructura menos dependiente de la temperatura.

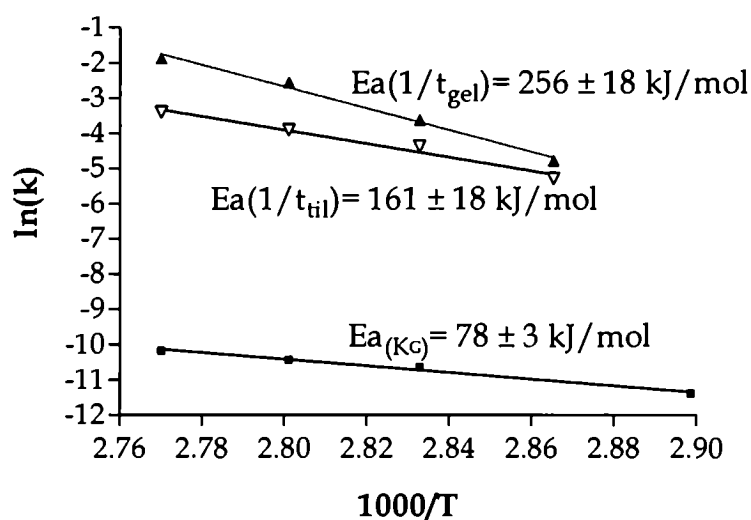


Figura I.4.4.2. Gráficos de Arrhenius para las velocidades de gelificación antes del punto gel ($1/t_{gel}$), luego del punto gel (k_G) y la obtenida a partir de los ensayos de “tilting” ($1/t_{til}$)

Como se describió en la **Sección I.4.2**, durante el proceso global de gelificación ocurren una serie de procesos, que pueden ser separados en los que ocurren en la fase líquida inicial y en fase sólida, luego del punto gel. Los tiempos de gelificación obtenidos por el ensayo de “tilting” fueron mayores que los obtenidos por los ensayos de reología dinámica (**Tabla I.4.4.1**), debido a que es necesario un mayor desarrollo de la estructura del gel para resistir la deformación impuesta al invertir los tubos que contienen el gel. A esos tiempos (t_{til}) el módulo G' se incrementó en 20-50 veces dependiendo de la temperatura de calentamiento. La energía de activación obtenida al graficar $\ln(1/t_{til})$ vs $1/T$ mostró un valor intermedio entre los valores obtenidos para $1/t_{gel}$ y k_G . Estos resultados resultan razonables ya que tanto la etapas de formación de la estructura primaria como la de su desarrollo posterior estarían incluidas en la determinación de la velocidad de gelificación por el método de “tilting”.

I.4.4.2 Cinética de desnaturalización

Los parámetros cinéticos determinados por el método de Borchardt y Daniels (1957) de las curvas calorimétricas para el sistema mixto β -lg (6%) + PGA (0,5%) mostraron que una reacción de orden 2 presentó el mejor ajuste de las curvas de Arrhenius desde el onset hasta el pico de desnaturalización ($R^2=99,7\%$). Este orden coincide con el reportado por Liu et al. (1994) a pH 8. A partir del factor preexponencial A y la E_a , se calculó la constante de velocidad, k_D a cada temperatura, según

$$k_D = A \cdot \exp(-E_a/RT)$$

Ec (I.4.4.2)

La **Figura I.4.4.3** muestra los gráficos de Arrhenius para soluciones de β -lg pura y en presencia de PGA. El valor obtenido de E_a para β -lg pura coincide con los reportados por Liu et. al. (1994) para valores similares de pH y concentración.

El análisis y comparación de los datos cinéticos es complejo debido a la ocurrencia simultánea de los procesos de disociación, desplegamiento y agregación. Los valores de energía de activación para la desnaturalización de β -lg aumentan con la concentración y este incremento es más pronunciado a bajas velocidades de calentamiento (Hoffmann et al., 1995). Relkin (1996) reportó valores de E_a entre 297 y 585 kJ/mol para una variación de 6 a 10% de β -lg a pH neutro, mientras que Hoffmann et al. (1995) obtuvieron valores entre 370 y 630 kJ/mol al variar la concentración entre 5 y 20 % de β -lg.

Bajo estas condiciones, la agregación juega un papel importante en el proceso. E_a aumentó fuertemente en presencia de PGA (411 + 8 kJ/mol) como muestra la **Figura I.4.4.3**, revelando un efecto que puede asemejarse al de aumento de la concentración de proteína. De hecho, en la primera sección se observó que la energía de activación correspondiente a la desnaturalización de soluciones de proteína (15%) o soluciones mixtas β -lg/PS (15%/3%) fue alrededor del doble que las observadas en soluciones al 6%. Este efecto sería debido al fenómeno de incompatibilidad termodinámica entre los biopolímeros a pH neutro, que lleva a un aumento en la concentración efectiva de la proteína en la solución.

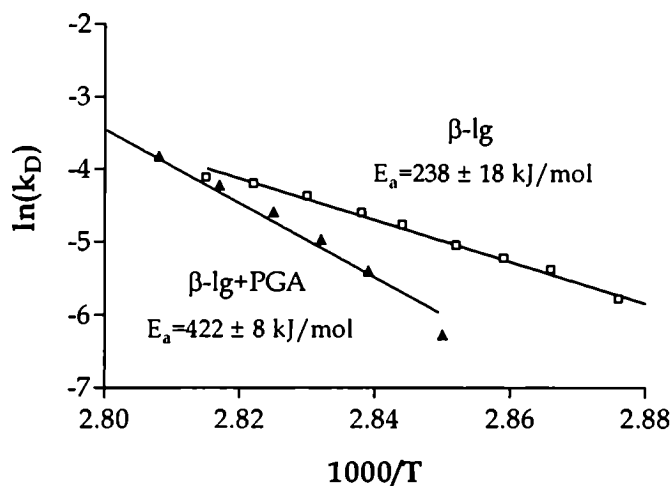


Figura I.4.4.3. Gráfico de Arrhenius para las velocidades de desnaturalización (k_D) de las soluciones de β -lg y β -lg+PGA

La presencia de PGA redujo la velocidad de desnaturalización k_D (**Fig. I.4.4.3**), lo que está de acuerdo con la mayor estabilidad térmica de la proteína mostrada en la Primera Sección..

El porcentaje de proteína desnaturalizada hasta el punto gel obtenido de los ensayos oscilatorios dinámicos (t_{gel}) y hasta el tiempo de gelificación obtenido en los ensayos de “tilting” (t_{til}) puede ser estimado a partir de las constantes de velocidad de desnaturalización para 72, 76, 80 y 84 °C (Tabla I.4.4.1). El porcentaje de proteína desnaturalizada hasta el punto gel varió entre un 3,4 y 32,7 % para temperaturas entre 72 y 84 °C. Estos valores muestran que en el punto de formación de la red primaria, una baja proporción de proteína se encuentra desnaturalizada, aún en condiciones de altas temperaturas de calentamiento. El porcentaje de proteína desnaturalizada al tiempo de obtención de un gel no-deformable de acuerdo al ensayo de “tilting” varió entre 20,3 % para 72 °C y 77,4 % para 84 °C (Tabla I.4.4.1). En ambos casos la proporción de β -lg desnaturalizada mostró un incremento significativo a temperaturas cercanas a la de pico de desnaturalización (aprox. 86 °C). Un bajo porcentaje de proteína desnaturalizada presente en los geles sugiere el predominio de enlaces no-covalentes en la formación de los agregados que conforman la red proteica. Este tipo de agregación ha sido denominada “agregación física” (Stading & Hermansson, 1990). De acuerdo a esto se desprende que los agregados de tipo “físico” predominarían en geles calentados a temperaturas relativamente bajas, cercanas a la T de inicio de la desnaturalización (aprox. 78 °C).

1.4.4.3 Cinética de agregación

En la **Figura I.4.4.4** se muestra la evolución del diámetro hidrodinámico aparente de los agregados de β -lg sola y β -lg/PGA formados durante el calentamiento a diferentes temperaturas. En las soluciones de β -lg sola, los agregados promedio formados fueron pequeños, incluso para las mayores temperaturas de calentamiento, por encima de la temperatura de pico de desnaturalización. Además, en un corto intervalo de tiempo alcanzaron un valor constante. Este “plateau” alcanzado no se debería al agotamiento de toda la proteína nativa, sino a la formación de partículas de un peso medio constante. Durante el calentamiento de las soluciones se produciría la formación de nuevos agregados, pero no un aumento en el tamaño de los mismos con el tiempo. El diámetro promedio de esos agregados a 76 °C fue de aproximadamente 50 nm. No se observó una variación importante en el tamaño de los agregados en soluciones de β -lg a las diferentes temperaturas, variando el diámetro aparente entre 35 y 65 nm. El pequeño tamaño de los agregados formados aún a tiempos largos de calentamiento explica la incapacidad de gelificación de la β -lg a la concentración de 6% observada en ensayos de reometría dinámica y ensayos de “tilting”. La presencia de PGA promovió la formación de agregados de mayor tamaño que continuaron creciendo durante el calentamiento, sin obtenerse un valor constante o plateau al final del tratamiento. Comportamientos similares han sido observados en presencia de otros polisacáridos. Se han reportado la formación de grandes

agregados de β -lg en presencia de polisacáridos tales como goma xántica o pectinas (Zasyppkin et al., 1996; Beaulieu et al., 2001) En particular se mostró que un aumento en la concentración de amilopectina acelera la agregación de partículas de proteína debido a la separación de fases, observándose la formación de cadenas más gruesas en los geles mixtos (Olsson et al., 2000).

La microestructura de los geles mixtos de β -lg+PGA observadas por microscopía de barrido (Sección I.4.2), daban la apariencia de un gel liso, del tipo “fine-stranded”, lo cual concuerda con el tamaño submicrónico de los agregados formados en este sistema, como se muestra en la **Figura I.4.4.4**.

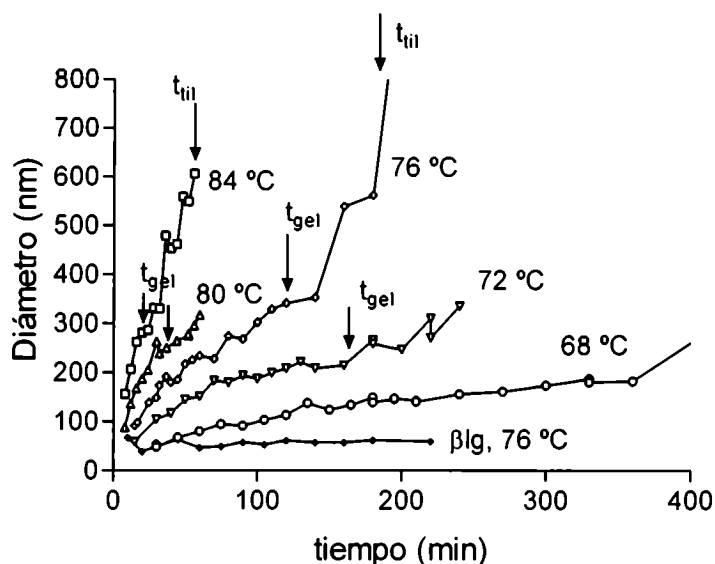


Figura I.4.4.4. Evolución del diámetro aparente de agregados de β -lg (6%) formados en presencia de PGA (0,25%) a diferentes temperaturas de calentamiento. Se incluye el diámetro de los agregados formados a 76 °C en soluciones de β -lg sola.

El diámetro de los agregados de proteína formados en presencia de PGA aumentó con la temperatura, observándose un cambio en la dependencia con la misma alrededor de los 80 °C, valor cercano al onset de desnaturalización (77,9 °C). Por encima de esta temperatura se observó un rápido crecimiento del diámetro de los agregados con la temperatura (**Fig I.4.4.5**).

Las flechas (t_{gel}) en la **Figura I.4.4.4**, indican el tiempo de gelificación determinado por reometría dinámica (**Tabla I.4.4.1**). Puede observarse que en el punto gel en el cual se forma la matriz primaria, los agregados presentan un diámetro promedio de unos 300 nm en los sistemas de β -lg/PGA, independientemente de la temperatura de calentamiento. En cambio en el punto de gelificación determinado por el ensayo de “tilting”, que coincide con la formación de una estructura que no fluye al invertir el tubo (flecha t_{ii}), el tamaño de los agregados es de aproximadamente 600-800 nm (curvas a 76 y 84 °C). En este tiempo la cantidad de proteína

desnaturalizada está entre 20,3 y 77,4 % respectivamente (**Tabla I.4.4.1**). Esto sugiere que la formación de agregados a altas temperaturas involucraría principalmente reacciones de intercambio entre los grupos tiol expuestos al desplegarse la proteína, lo que lleva a una pérdida de la estructura nativa de la proteína. Sin embargo, la baja cantidad de proteína desnaturalizada a 76 °C indicaría que la formación de agregados a temperaturas por debajo de T_p se da tanto por medio de uniones covalentes como físicas.

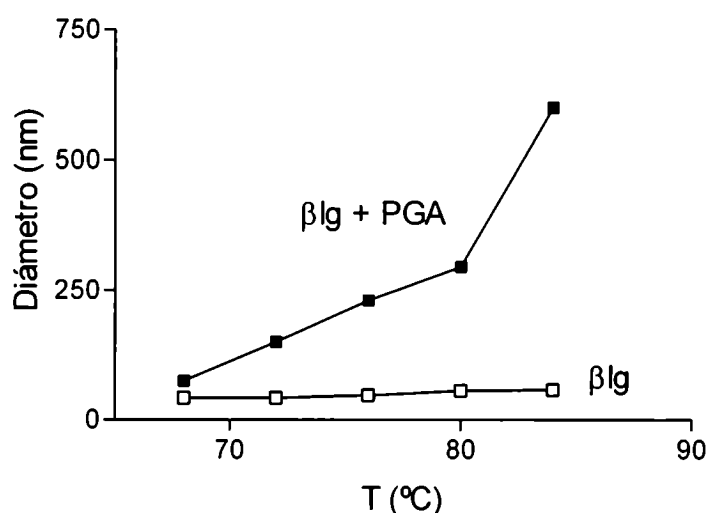


Figura I.4.4.5. Diámetro aparente de agregados formados al calentar (50 min) a diferentes temperaturas las soluciones de $\beta\text{-lg}$ sola y $\beta\text{-lg/PGA}$.

En la **Figura I.4.4.6** se muestra la intensidad de luz dispersada, I_s , en función del tiempo para soluciones de $\beta\text{-lg}$ sola (6%) calentadas a diferentes temperaturas. La intensidad de luz refractada por una partícula en dispersión es, en una primera aproximación, proporcional a la concentración de las mismas y a su masa molar (Hoffman et al., 1996). El comportamiento de las soluciones de $\beta\text{-lg}$ sola fue similar al reportado por Hoffman et al. (1996) para concentraciones de proteína entre 1,5 y 10 % y temperaturas entre 61 y 70 °C.

A diferencia del comportamiento observado para el tamaño de los agregados formados a diferentes temperaturas en soluciones de $\beta\text{-lg}$ sola, donde no se observó un aumento con el tiempo de calentamiento, I_s mostró un importante aumento durante el calentamiento a partir de los 80 °C. Esto estaría indicando un aumento en el número de los agregados en las soluciones de $\beta\text{-lg}$ sola, aunque no se produciría un aumento en el tamaño de los mismos por encima de los 65 nm.

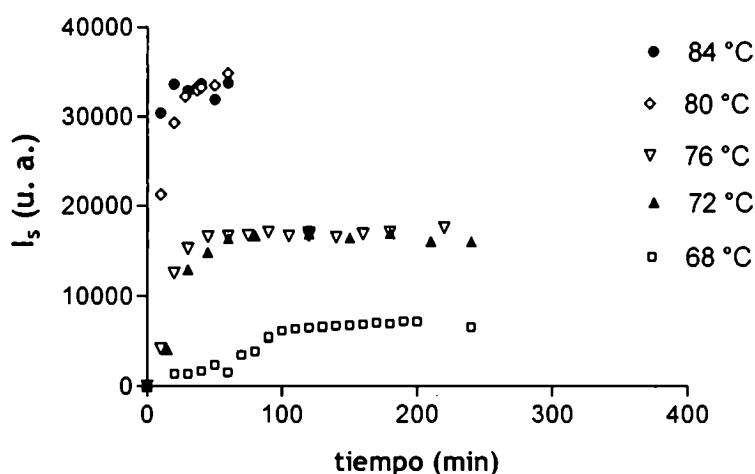


Figura I.4.4.6. Evolución de la intensidad de luz dispersada (I_s) para β -lg sola calentada a diferentes temperaturas.

Las curvas en la **Figura I.4.4.6** muestran un rápido crecimiento de la intensidad con el tiempo al comienzo; posteriormente se obtiene un máximo en las curvas que es proporcional al tamaño de los agregados, manteniéndose éste valor máximo de I_s durante el resto de tiempo de calentamiento. La estabilización de I_s observada en los sistemas de β -lg sola estaría relacionado a la obtención de agregados de un tamaño constante en las soluciones de β -lg.

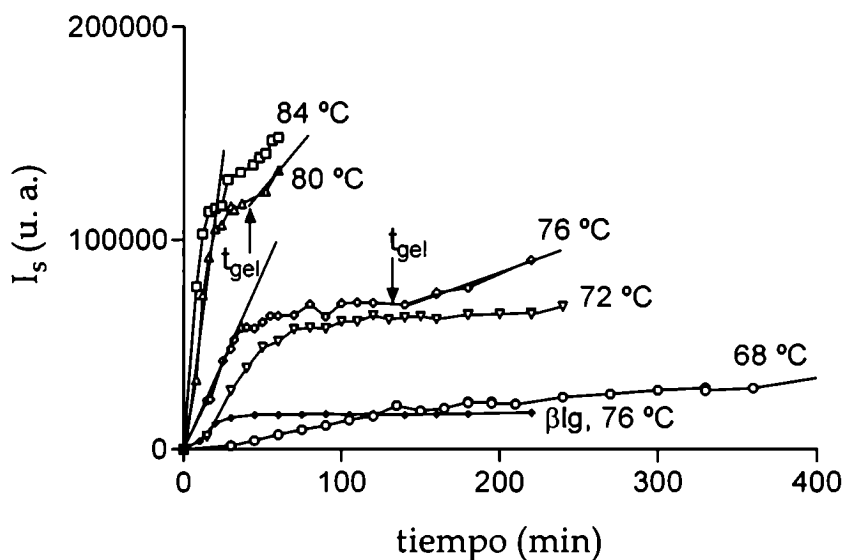


Figura I.4.4.7. Evolución de intensidad de luz dispersada (I_s) para β -lg (6%) en presencia de PGA (0,5%) calentada a diferentes temperaturas. Se incluye la curva de I_s para β -lg sola (6%). Las pendientes de la agregación primaria y secundaria se indican para 76 °C y 80 °C.

I_s aumentó fuertemente en presencia de PGA como se muestra en la **Figura I.4.4.7** donde se grafica a modo comparativo la curva de I_s para la β -lg sola a 76 °C.

A 76 °C se observa que en el sistema con PGA se alcanza un “plateau” a los 100 minutos de calentamiento. Luego de un tiempo equivalente al t_{gel} obtenido por reometría (120 min) se observa un nuevo aumento en la intensidad, probablemente debido a la formación de grandes estructuras agregadas en el punto gel (**Figura I.4.4.7**). A 80-84 °C, debido a la rápida evolución de I_s con el tiempo, se ven dos fases consecutivas con diferentes pendientes, siendo la pendiente del incremento inicial de I_s mayor que la segunda pendiente. El segundo incremento de I_s , parece tener correlación con la agregación secundaria del gel, en la cual el tamaño de partícula muestra un brusco aumento con el tiempo (**Figura I.4.4.4**).

El aumento inicial de la intensidad de luz dispersada $(dI_s/dt)_0$, tomado de la pendiente inicial de las curvas describe la velocidad de agregación de la proteína y depende de la temperatura de calentamiento. Esta velocidad es proporcional al tamaño de las partículas formadas inicialmente y a la velocidad de formación de las mismas (Hoffman et al., 1996). Si bien se observa un rápido aumento inicial de I_s tanto en el sistema de β -lg sola como en el sistemas mixto β -lg/PGA, solo en el último caso la agregación de la proteína llevará a la formación de una matriz primaria del gel, debido al tamaño suficientemente grande de los agregados formados. En la **Figura I.4.4.8** se muestran los gráficos de Arrhenius para las velocidades de agregación inicial para β -lg sola y β -lg + PGA. Puede observarse que el efecto principal del PGA se manifestó en un gran aumento de la velocidad de agregación. La energía de activación aumentó ligeramente en presencia de PGA de 138 ± 5 kJ/mol a 193 ± 15 kJ/mol.

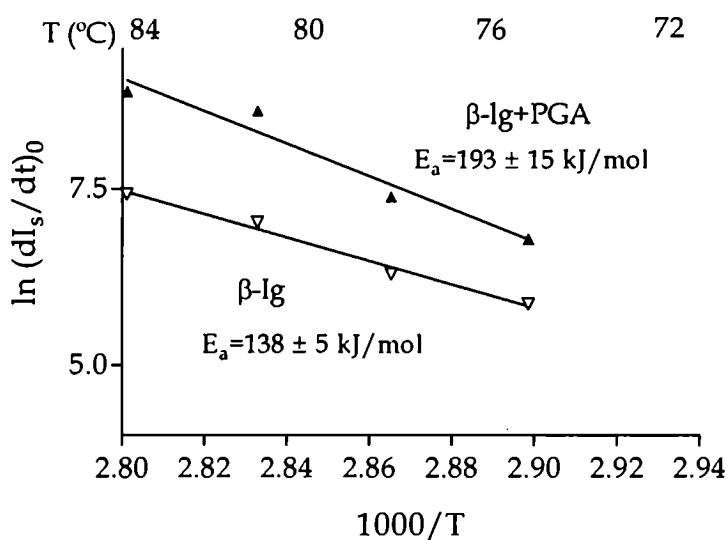


Figura I.4.4.8. Gráficos de Arrhenius para las velocidades de agregación inicial de soluciones de β -lg pura y β -lg + PGA.

El segundo incremento en I_s , que comienza luego del punto gel (t_{gel}), se relaciona a la velocidad de agregación luego de formada la red primaria. El valor de la energía de activación calculado para esta segunda etapa de agregación en función de la temperatura de calentamiento fue de 204 kJ/mol, similar al valor obtenido para la agregación primaria.

1.4.4.4 Análisis de las energías de activación

La gelificación térmica de la β -lg puede ser descrita por un mecanismo simplificado que consta de dos pasos consecutivos: desnaturalización de la proteína seguida de varias reacciones de agregación que involucran uniones covalentes y no covalentes (físicas). La velocidad de los procesos químicos que involucran varias reacciones está generalmente limitada por uno de estos procesos. La energía de activación del proceso global coincide principalmente con la energía de activación del proceso limitante. En el presente estudio, el proceso global es la gelificación, cuya cinética se determinó por reometría dinámica y las reacciones involucradas comprende la desnaturalización y agregación de la proteína.

Comparando los valores de E_a obtenidas para la agregación (193 kJ/mol), desnaturalización (422 kJ/mol) y formación de la estructura primaria del gel ($1/t_{gel}$) (256 kJ/mol) en presencia de PGA, puede concluirse que la etapa limitante en la formación de la estructura primaria del gel sería la agregación de la proteína. A pH neutro y baja fuerza iónica las reacciones de agregación limitan la velocidad de gelificación de soluciones de β -lg sola (Verheul et al., 1998c, Taylor et al, 1994).

Aún sin comparar los valores de energía de activación, podría haberse llegado a la misma conclusión considerando lo siguiente: si la etapa de desnaturalización hubiera sido la etapa limitante, el agregado de polisacárido, que retarda la desnaturalización, hubiera resultado en una disminución en la velocidad de gelificación. Sin embargo, experimentalmente fue observado lo contrario, ya que el agregado del polisacárido promueve la gelificación de soluciones de β -lg al 6%, que no gelifican en ausencia del mismo.

Por lo discutido anteriormente, puede concluirse que a pesar de que el PGA tiene un efecto retardante en la desnaturalización de la proteína (ya que aumenta la estabilidad térmica de la misma), este polisacárido promueve en forma importante la agregación de la proteína, que constituye la etapa limitante en la formación del gel. En presencia del polisacárido se forman agregados suficientemente grandes (300 nm) para la formación de la estructura primaria, que luego se desarrolla con el tiempo de calentamiento hasta alcanzar una estructura gelificada estable.

De forma similar, comparando la energía de activación para los procesos luego del tiempo de gelificación (gelificación en la fase sólida) puede decirse que los valores de E_a correspondientes al desarrollo de la estructura gelificada (78 kJ/mol) son mucho menores que las E_a para las reacciones

de desnaturalización/agregación (422 y 204 kJ/mol) involucradas. Este resultado sugiere que la gelificación en esta etapa es un proceso limitado por la difusión debido a la alta viscosidad de la matriz sólida formada. Por lo tanto en esta etapa, los procesos de transferencia de masa limitarían la velocidad de gelificación, en lugar de las reacciones químicas involucradas (desnaturalización-agregación).

1.4.4.5 Propiedades de los geles

Se estudiaron las características viscoelásticas, la textura, pérdida de agua y microestructura de los geles de β -lg (6%) + PGA (0,5%) en función de las condiciones de temperatura y tiempo de calentamiento a las que fueron sometidos. Varias de estas propiedades ya se habían mostrado en la sección anterior para temperaturas por encima de la temperatura de pico de desnaturalización, y se analizaron en forma comparativa para otros polisacáridos no-gelificantes. En esta parte se analizan fundamentalmente las diferencias observadas entre los sistemas gelificados obtenidos a temperaturas por debajo y por encima de la de desnaturalización, para mostrar el efecto de las diferentes reacciones involucradas en las propiedades de los geles y el efecto del tiempo de calentamiento, principalmente en los geles formados a menores temperaturas.

Tabla I.4.4.2. Propiedades viscoelásticas de geles de β -lg (6%) + PGA (0,5%) calentados a diferentes temperaturas y períodos de tiempo.

T (°C)	Tiempo de calentamiento (min)	G' (Pa) (1 Hz)	G'' (Pa) (1 Hz)	tan δ (1 Hz)
72	600	136	15,5	0,114
76	420	91	12,9	0,141
80	240	400	35,1	0,0878
84	180	424	41,1	0,0969
88	120	455	43,9	0,0964

El tiempo de calentamiento seleccionado para cada temperatura de tratamiento (**Tabla I.4.4.2**) fue suficiente para lograr que el módulo elástico, G' se incremente en aproximadamente 100 veces durante el período de calentamiento. La **Figura I.4.4.9** muestra la dependencia con la frecuencia de G' a 20 °C para los geles β -lg+PGA formados a temperaturas entre 72 y 88 °C. Como fue descripto anteriormente, la dependencia de módulo elástico (G') con la frecuencia provee de información

acerca del tipo de estructura del gel. Para obtener el grado de dependencia de G' con la frecuencia, se ajustaron los datos con la Ec. (I.3.4).

Para todos los sistemas gelificados, fueron obtenidos valores similares de n , que se encuentran indicados en la **Figura I.4.4.9**. El valor de n fue tomado como un índice del carácter viscoelástico de los geles. n es cero para geles puramente elásticos, y toma valores mayores con el aumento en la contribución relativa de la componente viscosa. Los valores de n obtenidos indican la naturaleza predominantemente elástica de los geles.

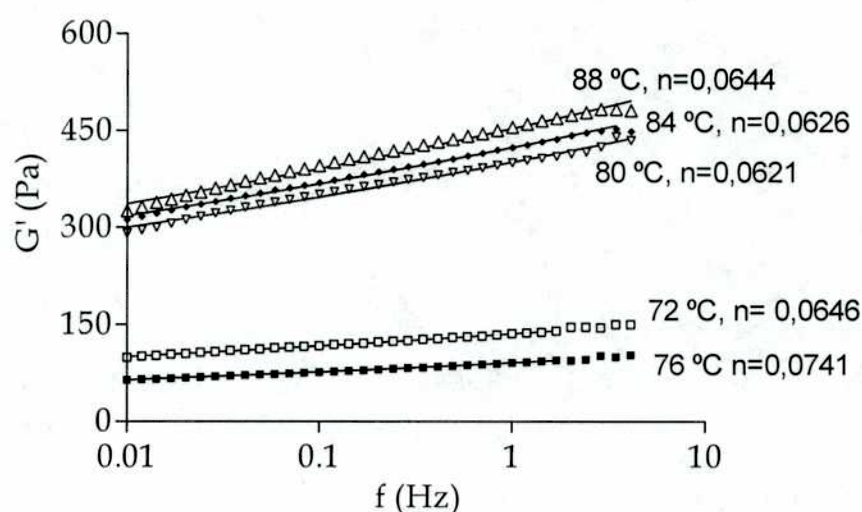


Figura I.4.4.9. Barridos de frecuencia para los geles de β -lg + PGA formados a temperaturas entre 72 y 88 °C

Puede verse que encima de los 76 °C, cerca del inicio (T_{onset}) de la desnaturalización de la proteína, los valores de G' muestran un crecimiento notable. De acuerdo con la teoría de elasticidad, G' debería ser mayor a mayores temperaturas (Ferry, 1975, Bowland et al, 1995b). Los geles de β -lg+PGA exhibieron dicha relación. Un incremento de G' durante el calentamiento y luego del enfriamiento es indicativo de interacciones covalentes e hidrofóbicas que contribuyen a la rigidez de la matriz. Los otros parámetros reológicos mostrados en la **Tabla I.4.4.3** presentaron el mismo comportamiento. Por encima de los 76 °C, G' aumentó abruptamente y se observó una disminución en $\tan \delta$. $\tan \delta$ representa la viscoelasticidad relativa en la red proteica o el carácter sólido de la matriz (Aguilera et al., 1993). De acuerdo a esto, los geles formados a las mayores temperaturas presentaron un mayor carácter sólido (mayor viscoelasticidad), debido a que exhibieron menores valores de $\tan \delta$.

La apariencia visual de los geles mixtos de β -lg+PGA calentados durante 120 min a diferentes temperaturas se muestra en la **Figura I.4.4.10**. Los geles formados a 72 o 76 °C se deformaron completamente al ser desmoldados (geles que no se autosoportan), pero los formados a 84 y 86 °C

tenían la apariencia de geles fuertes. Sin embargo, los geles formados a 72 y 76 °C pudieron desarrollar una estructura más rígida, del tipo autosoportada, al calentarlos durante un tiempo más prolongado (10 y 7 h respectivamente). Como se mencionó anteriormente, este tiempo fue suficiente para el desarrollo de G' según se indicó en la **Tabla I.4.4.3**.

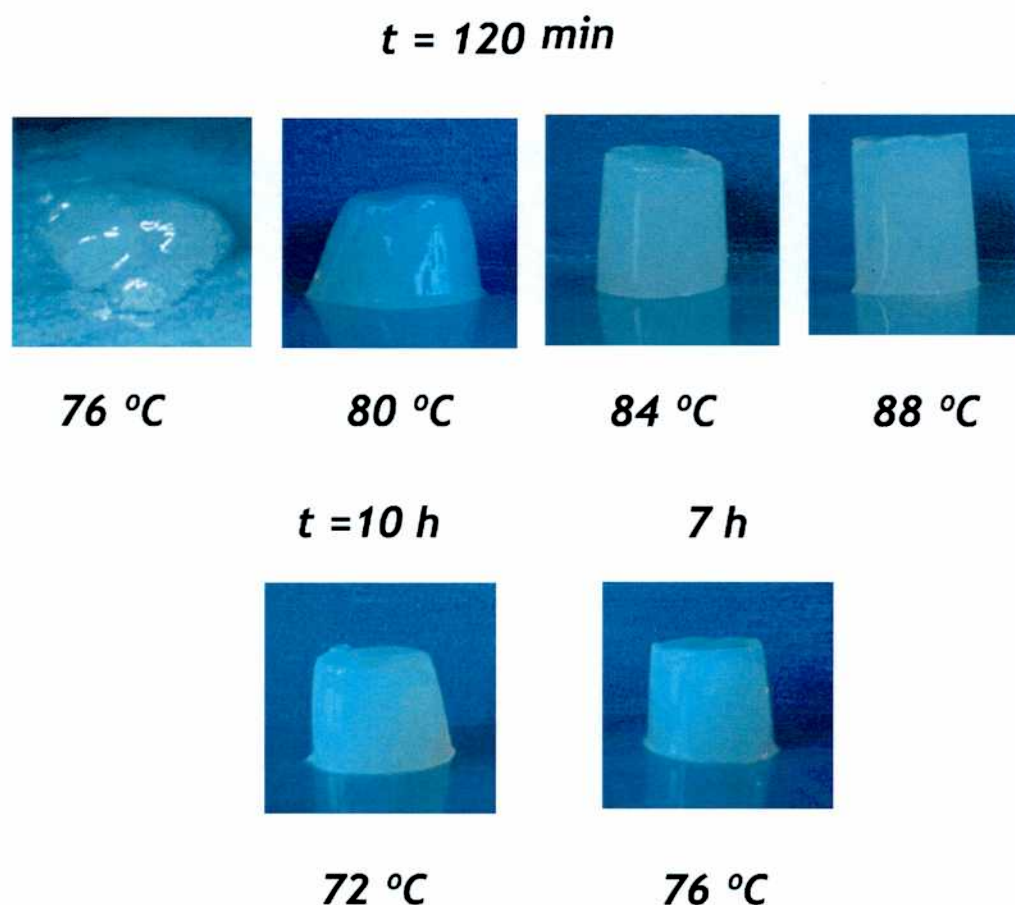


Figura I.4.4.10. Apariencia visual de los geles de β -lg (6%) + PGA(0,5%)

Las propiedades de textura de los geles calentados durante 120 min a diferentes temperaturas se muestran en la **Figura I.4.4.11**. La dureza mostró un gran aumento con la temperatura de calentamiento. El aumento del tiempo de calentamiento modificó fuertemente las características de los geles formados a 76 °C, mostrando mayores valores de dureza que los formados a 80 °C cuando fueron calentados por largos períodos de tiempo. Los geles formados a temperaturas mayores que 80 °C (con calentamiento de 120 min) mostraron una elasticidad y cohesividad casi constante. Las características de los geles no autosoportables formados a 76 °C son responsables del marcado descenso en los parámetros. Sin embargo, con tiempos de calentamiento más largos (7-10 h), los

geles formados a menores temperaturas fueron mucho más elásticos y cohesivos que los formados a 80-88 °C. La pérdida de agua de los geles fue baja para todas las muestras (< 5%), independientemente de la temperatura de calentamiento. Los resultados indican un gran cambio en las propiedades de los geles por arriba de la temperatura de onset de desnaturalización de la proteína. Este comportamiento puede atribuirse al gran incremento en la velocidad de desnaturalización por encima de los 76 °C, que contribuye a la formación de enlaces covalentes en la matriz gelificada por uniones de intercambio tiol/disulfuro.

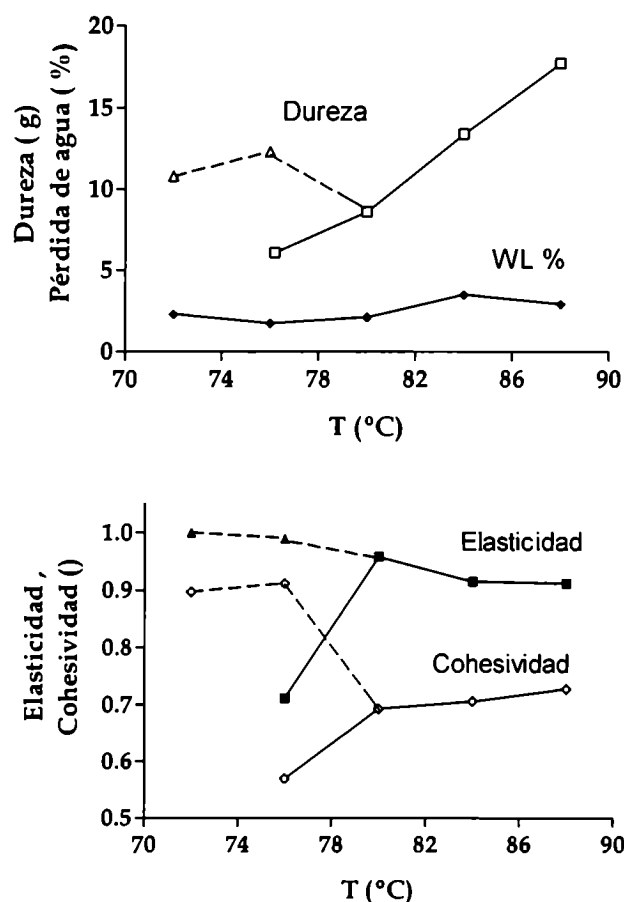


Figura I.4.4.II. Propiedades de textura y pérdida de agua de los geles de β -lg/PGA. Las líneas partidas indican el comportamiento de geles calentados a 72 y 76 °C por 10 y 7h. Los otros puntos corresponden a geles calentados 120 min.

A temperaturas entre 72-76 °C la velocidad de desnaturalización es relativamente baja por lo cual la proteína se desnaturaliza en una baja proporción como se muestra en la **Tabla I.4.4.1**, predominando la formación de agregados físicos. La subsiguiente formación de la matriz vía uniones covalentes entre agregados ocurriría lentamente, permitiendo la formación de estructuras homogéneas de tipo “fine-stranded”. Como se muestra en la **Figura I.4.4.10**, los geles formados a

las menores temperaturas (7-10 h) fueron translúcidos, y exhibieron buenas propiedades de retención de agua, alta elasticidad y cohesividad. A temperaturas $> 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, los geles fueron más opacos y duros, debido al mayor nivel de β -lg desnaturalizada involucrada en la estructura del gel por encima de la temperatura de desnaturalización (**Tabla I.4.4.1**).

La **Figura I.4.4.12** muestra la microestructura de los geles formados entre 80 y $88\text{ }^{\circ}\text{C}$. A pesar de que estos geles fueron tipo “fine-stranded”, la microestructura observada por microscopía de transmisión mostró grandes diferencias entre las muestras. A $88\text{ }^{\circ}\text{C}$, la estructura fue homogénea pero más densa que a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Stading y Hermansson (1992) estudiaron el efecto de las velocidades de calentamiento en las características de geles “fine-stranded” de β -lg formados a pH 7,5. Se encontró que las velocidades más altas de calentamiento llevaron a la formación de redes homogéneas compuestas por gruesos agregados. Los efectos de aumento de velocidad de calentamiento de β -lg son similares a los de aumento en la temperatura de calentamiento (Foegeding et al., 1995). Las microestructuras mostradas en la **Figura I.4.12** confirman estos resultados, observándose la formación de estructuras más densas con una mayor temperatura.

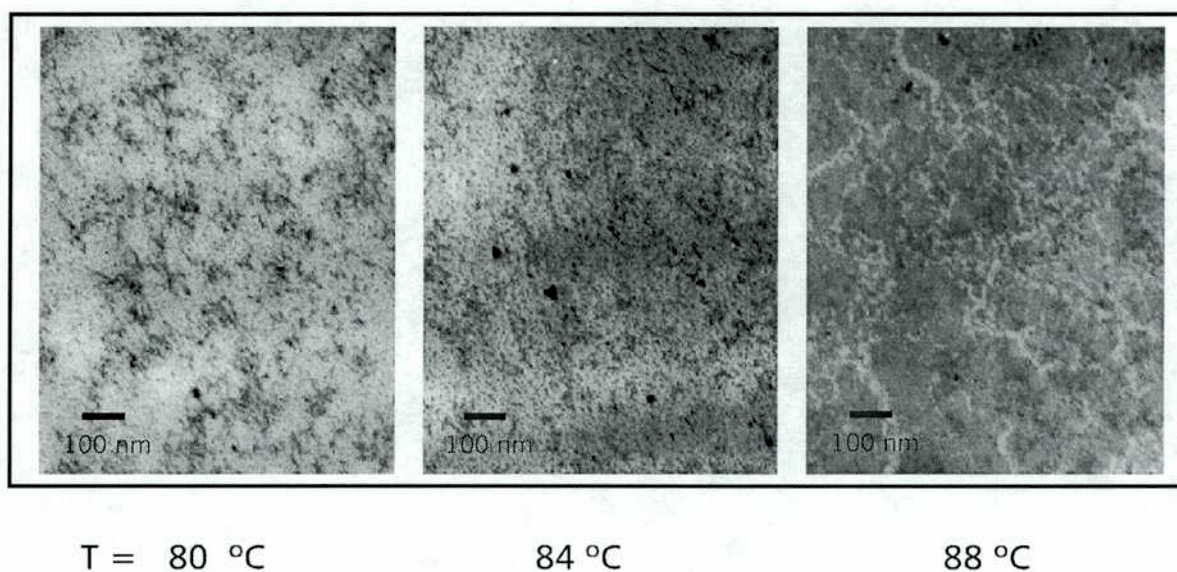


Figura I.4.4.12. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) para geles β -lg (6%) + PGA (0,5%) formados a diferentes temperaturas

Los resultados obtenidos parecen indicar que las propiedades viscoelásticas están relacionadas a la composición de las cadenas del gel. Geles con cadenas más gruesas formados a $88\text{ }^{\circ}\text{C}$ tuvieron mayores valores de G' y dureza. Sin embargo, la mayor elasticidad de los geles formados a 72 - 76

°C (7-10 h) podría relacionarse a la formación de estructuras con cadenas más flexibles y un bajo modulo elástico y dureza.

La elasticidad podría estar determinada por la naturaleza de la uniones involucradas en la formación de agregados que forman el gel primario. Los geles formados a menores temperaturas involucran principalmente agregación física, debido al bajo porcentaje de proteína desnaturalizada previamente a la obtención del punto de gel.

Por los resultados obtenidos puede concluirse que el PGA afecta los procesos de desnaturalización y agregación involucrados en la gelificación de la proteína. Este comportamiento se debería principalmente a los fenómenos de incompatibilidad termodinámica entre los biopolímeros a pH neutro, que aumenta la actividad termodinámica de la proteína. El PGA promueve fuertemente la agregación de la β -lg, que constituye la etapa limitante del proceso de gelificación, de forma tal que permite la formación de agregados lo suficientemente grandes como para que se forme la estructura primaria del gel que luego se sigue desarrollando con el tiempo de calentamiento.

La temperatura y el tiempo de calentamiento tienen un efecto ya sea previamente o posteriormente al punto gel, y determinan la microestructura y las propiedades funcionales de los geles. El grado de agregación y el tipo de interacciones involucradas previamente al punto de gel parece ser muy importante en la determinación de la estructura y propiedades de los geles.

I.5

Conclusiones

I. 5 CONCLUSIONES

➤ En general se puede concluir que los fenómenos observados a pH 7 y en menor medida a pH 6 se deberían a que aún en condiciones en las que no se observa una separación macroscópica de fases en los sistemas mixtos de β -lg y polisacáridos no gelificantes, el efecto de volúmenes de exclusión y la limitada compatibilidad termodinámica entre los biopolímeros en solución lleva a una modificación en la cinética de gelificación, así como en las propiedades micro y macroestructurales de los geles. Además, podrían existir entre los biopolímeros fenómenos de complejamiento durante el calentamiento. En particular ha sido descripta la formación de complejos a $pH > pI$ en sistemas mixtos de PGA y proteínas.

➤ *Para los sistemas a pH neutro se pueden realizar las siguientes conclusiones:*

- Los polisacáridos aumentan la estabilidad térmica de la β -lg lo cual se manifiesta por un aumento en la temperatura de inicio de desnaturalización, un aumento en el cambio de entalpía y en el caso de los sistemas deshidratados en un aumento en la temperatura de pico de desnaturalización.

- Los polisacáridos promueven la agregación de la β -lg, ya sea a través de un aumento del tamaño de los agregados como de la velocidad de formación de los mismos.

Dado que la agregación es la etapa limitante de la velocidad de formación de los geles de β -lg, tal como se demostró en detalle para el sistema PGA/ β -lg, el mencionado efecto (agregación) se traduce en la posibilidad de formación de geles de β -lg, aún en concentraciones donde la proteína por sí sola no puede gelificar.

- Existe un efecto diferencial entre los diferentes polisacáridos en la dinámica de la gelificación de β -lg ya que el tiempo necesario para que ocurra la gelificación y para que se desarrolle la estructura del gel es mucho menor en presencia de λ -C y xántica que en presencia de PGA. Por lo tanto, en presencia de cada polisacárido y dependiendo de la temperatura de calentamiento, se requerirán diferentes tiempos de calentamiento para lograr desarrollar las características finales del gel.

- Los geles obtenidos en presencia de goma xántica presentan una microestructura particulada, la menor viscoelasticidad, carácter sólido y dureza; no obstante su capacidad de retención de

agua es muy elevada debido a las características propias altamente hidrofílicas de este polisacárido.

Los geles obtenidos en presencia de λ -C también presentan una estructura particulada pero son más viscoelásticos y duros que los de xántica, exhibiendo la mayor pérdida de agua.

Los geles con PGA tienen características muy diferentes a los anteriores pudiéndose obtener en condiciones de baja concentración de proteína y PGA una microestructura de tipo “fine-stranded” que en términos macroestructurales se refleja en una mayor elasticidad y viscoelasticidad, alta retención de agua y transparencia óptica.

➤ *Para los sistemas a pH 6:*

- El efecto de los polisacáridos en la estabilidad térmica es mucho menor, prevaleciendo el efecto estabilizante de un pH (6) más cercano al pI de la β -lg.

- Las diferencias entre los diferentes sistemas mixtos en la dinámica de gelificación es menor que a pH neutro, observándose similares tiempos de gelificación y velocidades de desarrollo de la estructura del mismo orden. Sin embargo el sistema con PGA es más susceptible a las variaciones de pH presentando a pH 6 un mayor tiempo de gelificación y mayor velocidad de desarrollo de la estructura.

- Los geles obtenidos a pH 6 son siempre del tipo particulado, presentando una microestructura, viscoelasticidad y propiedades ópticas similares en presencia de los diferentes polisacáridos.

➤ *Para los geles de β -lg/PGA:*

Se identificaron como variables “clave” en el control de las características micro y macroestructurales de los geles a la concentración total de sólidos y a la relación PGA/ β -lg. Se obtuvieron geles de buenas propiedades viscoelásticas, dureza y retención de agua, ya sea a bajas o altas concentraciones de sólidos totales (7-13%) siempre y cuando la fracción de PGA en los sólidos sea baja (5-12%). En cambio para mayores relaciones PGA/ β -lg los geles son más débiles y tienen mayor pérdida de agua, presentando la característica de ser esparcibles.

Segunda Parte

**Interacciones entre β -lactoglobulina y
polisacáridos en interfases y espumas**

II.1

Introducción

II.1 INTRODUCCIÓN

II.1.1 PROPIEDADES INTERFACIALES DE PROTEÍNAS

II.1.1.1 Propiedades moleculares de proteínas que afectan las propiedades interfaciales

Las proteínas se utilizan como agentes surfactantes para la obtención de emulsiones o espumas. debido a su capacidad para ubicarse en la interfase orientando las zonas no-polares hacia la fase no polar y las polares hacia el agua. Debido a su complejidad estructural, la estructuración de las proteínas en la interfase es bastante diferente a la de otro tipo de tensioactivos con bajo peso molecular, como los mono o diglicéridos o fosfolípidos (Phillips et al., 1994a).

Las proteínas poseen flexibilidad molecular y capacidad de alterar su conformación para reorientarse y asociarse en la interfase formando películas estables. En la **Tabla II.1.1** se muestran los principales factores que afectan las propiedades interfaciales de proteínas.

Tabla II.1.1. Factores que afectan las propiedades interfaciales de proteínas

Intrínsecos de la molécula	Extrínsecos
Composición de aminoácidos (aa)	pH
Relación (aa no polares) / (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	

Para describir el comportamiento de las proteínas en la interfase, es esencial un profundo conocimiento de las características físico-químicas de la proteína en solución. Sobre esta base, se ha dado una descripción general del comportamiento interfacial de las proteínas, de acuerdo a la conformación que esta adopta en solución. La conformación que presentan las moléculas proteicas en solución, puede ser englobada en tres categorías (Carrera Sánchez, 2000):

- Moléculas altamente solvatadas y flexibles, que presentan una estructura expandida y en parte enrollada (por ejemplo las caseínas)
- Moléculas que presentan una estructura regular, tipo α -hélice o láminas plegadas
- Moléculas que pueden contener α -hélices, láminas plegadas, y partes de estructuras ordenadas y desordenadas en el interior de una estructura compacta (proteínas globulares)

En las proteínas de tipo globular, como la β -lactoglobulina, los residuos apolares se concentran preferentemente en la superficie.

II.1.1.2 Termodinámica de adsorción de proteínas

En el seno de la solución las moléculas de proteínas se encuentran rodeadas de otras de su misma especie, siendo las fuerzas de interacción iguales o simétricas en todas las direcciones. En la superficie, están sujetas a una fuerza neta, ya que las fuerzas de atracción ejercidas por las moléculas en el seno de la solución son diferentes a las ejercidas por las moléculas en la fase aire que se encuentra sobre el líquido (**Figura II.1.1**). Esta atracción tiende a arrastrar a las moléculas de la superficie hacia el interior del líquido. Este fenómeno se denomina tensión superficial (o interfacial), γ , y es el efecto responsable de la resistencia que un líquido presenta a la penetración superficial.

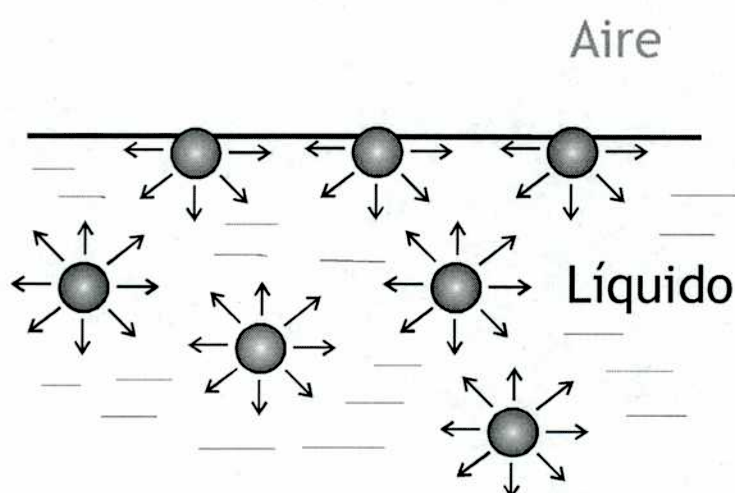


Figura II.1.1. Fuerzas de interacción entre las moléculas de un líquido

El desbalance de las fuerzas en la interfase se traduce en una energía libre superficial o energía libre de Gibbs. Como la energía libre de las moléculas en la interfase es mayor a las del seno de la solución, el líquido tiende a contraerse para minimizar la superficie expuesta. Una expansión del área interfacial (ΔA) requiere de un trabajo proporcional a dicha expansión, según :

$$\Delta G = \gamma \cdot \Delta A$$

donde γ es la tensión superficial si la interfase es aire-líquido y tiene unidades de fuerza/superficie. (Ej: N/m^2), y ΔG es la energía libre requerida para aumentar el área de contacto entre las dos fases inmiscibles (Mc Clements, 1999b). Cuanto menor es γ , menor es el trabajo necesario para aumentar

el área superficial. Las moléculas de proteína se concentran en la superficie formando películas (films), 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 puro y la solución respectivamente. Durante el proceso de formación de la emulsión o espuma se produce un incremento del área interfacial, que depende del número y tamaño de la fase dispersa. Este proceso es dinámico y requiere una gran cantidad de energía. Por esto, una reducción en la tensión interfacial favorecerá la formación de la espuma desde el punto de vista energético.

Las técnicas más comunes para evaluar la tensión superficial incluyen métodos estáticos como medición de volumen de las gotas (estalagmómetro de Traube), caracterización de forma y tamaño de la gota (método de Sessile, anillo de Du Nouy, tensiolaminómetro de la placa Wilhelmy) (Graham y Phillips, 1979a; German et al., 1985), ascenso capilar (Mc Clements, 1999c) y por distintos métodos dinámicos como método de la gota pendiente (Tornberg, 1978 a,b), métodos de máxima presión sobre burbuja, métodos oscilatorios. En los últimos años se han desarrollado metodologías más modernas como las balanzas para películas tipo Langmuir (Herrington et al., 1987, Dynarowicz-Latka et al., 2001).

Las características de las películas que influyen en la estabilidad y propiedades de los sistemas dispersos son entre otras: comportamiento de flujo, dilatación interfacial y elasticidad, concentración superficial, espesor del film, morfología, conformación proteica, interacciones intermoleculares en el film. Entre las técnicas utilizadas para estas determinaciones se encuentran las técnicas de dispersión (luz, rayos X, neutrones), de reflexión (elipsometría, de neutrones), de adsorción de radiación electromagnética (infrarrojo, visible-UV, fluorescencia, NMR, dicroísmo circular), técnicas bioquímicas (inmunoensayos e hidrólisis enzimática) y microscópicas (microscopio de fuerza atómica, microscopía electrónica) (Mc Clements, 1999c).

Algunas de estas técnicas se describirán con más detalle en esta sección.

II.1.1.3 Cinética de adsorción de las proteínas en la interfase

Las moléculas proteicas tienden a acumularse en la interfase debido a su actividad superficial formando en la interfase películas monomoleculares que se denominan *monocapas*.

Los tensioactivos de bajo peso molecular forman monocapas con un alto grado de empaquetamiento en la interfase, lo que los hace muy efectivos en reducir la tensión interfacial (**Fig II.1.2a**). Los biopolímeros flexibles, tales como las caseínas, se ubican en la interfase en una forma expandida, con segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos incluidos en la fase aire y agua

respectivamente en forma de lazos y colas, y las partes neutras ubicadas sobre la interfase aire-agua (**Fig II.1.2 b**). Inmediatamente luego de la adsorción, los biopolímeros compactos (tales como las proteínas globulares) tienden a adoptar una orientación que maximiza el área de contacto entre las zonas hidrofóbicas y la fase no polar (**Fig II.1.2 c**). Luego de la adsorción las moléculas de proteína pueden cambiar su conformación en respuesta a las condiciones del medio (Mc Clements, 1999a).

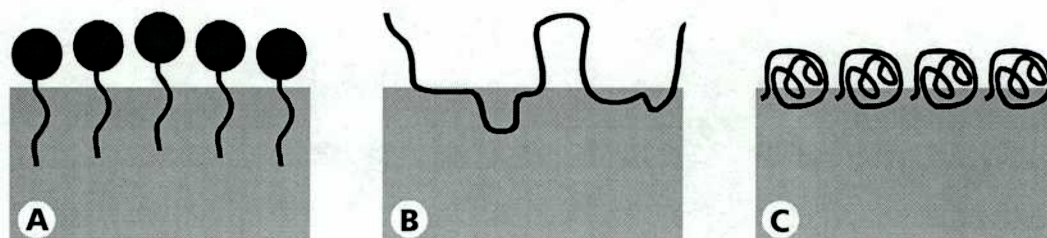


Figura II.1.2 Orientación de tensioactivos en interfaces aire-agua o aceite-agua. A: moléculas de surfactantes de bajo peso molecular, B: biopolímeros flexibles, C: proteínas globulares

Las monocapas formadas por proteínas presentan un grado de empaquetamiento menor que los tensioactivos de bajo peso molecular. Sin embargo, las fuertes interacciones que se establecen entre moléculas de proteína que conforman la monocapa le otorgan características viscoelásticas que las hacen sumamente resistente a deformaciones.

La adsorción de proteínas en la interfase se da por fijación de cantidades variables de segmentos polipeptídicos a la interfase, y en muchos casos, largas porciones de la molécula proteica permanecen en la fase acuosa. El comportamiento que presentan las proteínas dependerá de su solubilidad en las condiciones del medio: pH, fuerza iónica, temperatura y composición de la subfase acuosa.

Es muy importante conocer la velocidad a la que ocurre el proceso de adsorción en la interfase. Dicha velocidad debe ser suficientemente rápida para que las moléculas puedan adsorberse sobre la interfase de gotas o burbujas creadas durante la formación de la espuma o emulsión. Esta característica, junto con la capacidad de disminuir la tensión interfacial y formar una monocapa resistente son las que debe presentar un emulsionante o espumante para que sea eficaz en la estabilidad de una emulsión (Dickinson y Mc Clements, 1995, Walstra, 1996).

La velocidad de adsorción depende de las características moleculares del emulsionante (tamaño, conformación e interacciones), la naturaleza de la fase continua y de las condiciones del proceso, tales como temperatura, método de formación de la dispersión, etc.

Las proteínas en la interfase pueden adoptar las siguientes conformaciones (Carrera Sánchez, 2000), según se observa en la **Figura II.1.3**:

-Filas (trains): son los segmentos (lineales) que están en contacto directo con la interfase.

-Lazos (loops): son los segmentos de polipéptidos entre las filas que están suspendidos en el seno alguna de las fases.

-Colas (tails): se refiere a los segmentos terminales de la cadena de polipéptidos. Como sus grupos terminales están cargados a pH neutro, se espera que las colas estén presentes en el seno de la fase acuosa.

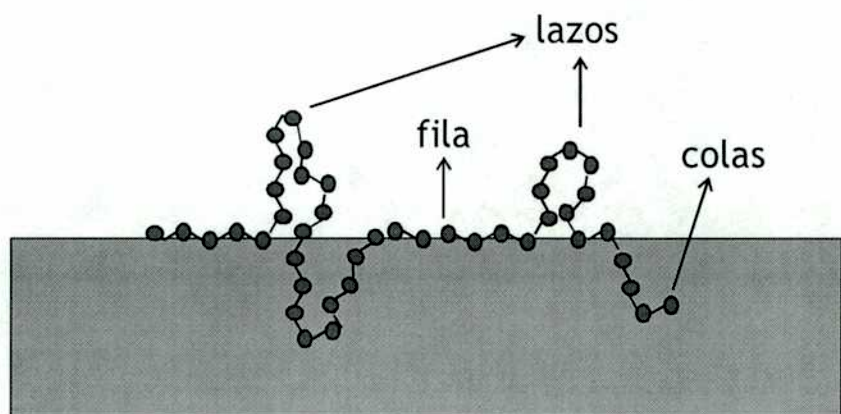


Figura II.1.3. Conformaciones que adoptan las proteínas en la interfase

La distribución de acuerdo a estas conformaciones dependerá de la energía libre de adsorción de los segmentos de la molécula polimérica y de la flexibilidad de las cadenas (Kim et al., 1987). En solución acuosa las proteínas globulares adoptan una conformación tridimensional en la cual los aminoácidos apolares se disponen preferentemente en el interior de la molécula. Cuando la proteína se adsorbe en la interfase puede reducir su energía libre y alterar su conformación, orientando sus aminoácidos hidrofóbicos hacia la fase aire y los hidrofílicos hacia la fase acuosa.

En un sistema acuoso no agitado, inicialmente las moléculas de proteína difunden rápidamente desde el seno de la solución hacia la interfase y el proceso de adsorción está controlado por la velocidad de difusión, que depende del tamaño y la forma de la molécula y de las características del medio acuoso. Las moléculas adsorbidas en la interfase se despliegan y desnaturalizan parcialmente, cubriendo el máximo de área posible. Las moléculas más flexibles pueden rápidamente alterar su conformación, mientras que moléculas más rígidas como las proteínas globulares cambian más lentamente.

Luego de la etapa de difusión, las moléculas de proteína se estructuran, interaccionando entre sí, con un consiguiente aumento en la presión superficial. El reordenamiento de las moléculas adsorbidas en la superficie puede ser retardado 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 (Luchasen-Reynders, 1993).

Cuando la concentración de proteína adsorbida (Γ) se incrementa, se genera una barrera electrostática en el lado acuoso de la superficie debido a la orientación de los grupos proteicos cargados hacia la fase acuosa polar. Las moléculas de proteína requieren de una energía cinética adicional para vencer la barrera electrostática y comprimir las moléculas ya adsorbidas en la interfase, para permitir la adsorción de proteína adicional. En esta etapa del proceso, la velocidad está determinada por la capacidad de las moléculas proteicas para penetrar en la interfase y reacomodarse, creando espacio en el film preexistente (Phillips et al., 1994a). Una vez adsorbidas en la interfase, las moléculas de proteína interactúan en la misma, para lograr un estado de menor energía libre. Con el incremento de proteína adsorbida el reordenamiento de las moléculas en forma extendida disminuye y el film cambia de estado expandido a comprimido (Kinsella y Phillips, 1989). 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).

Los factores que gobiernan la formación de una película 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 (German et al., 1985). La estabilidad de la espuma refleja las propiedades reológicas, eléctricas y de hidratación del film proteico. La formación de una película 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 los segmentos en el film). Deben poseer regiones interactivas (la disposición de diferentes segmentos funcionales facilita las interacciones secundarias en la fase acuosa, en 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).

II.1.1.4 Caracterización de las monocapas

II.1.1.4.1 Tipos de monocapas

Las sustancias simples (por ej. monoglicéridos, tensioactivos de bajo peso molecular) o los biopolímeros pueden formar monocapas o bien por adsorción desde el seno de la solución, o por

esparcimiento sobre la superficie. Así pues, las monocapas pueden clasificarse en dos tipos (Carrera Sánchez, 2000):

-*monocapas adsorbidas*: se forman por acumulación en la interfase de sustancias disueltas en la subfase. Existe un equilibrio entre subfase e interfase.

-*monocapas esparcidas*: se obtienen por deposición o esparcimiento directo en la interfase. En el caso de un tensioactivo de bajo peso molecular se requiere la presencia de un solvente volátil como portador de la sustancia formadora de la monocapa.

II.1.1.4.2 Estructura molecular de las monocapas

Los parámetros más importantes que caracterizan a una monocapa sobre la interfase aire-agua son: presión superficial ($\pi = \gamma_0 - \gamma$), área superficial, número de moléculas presentes en la monocapa y temperatura.

El área ocupada por la monocapa y el número de moléculas presentes en ella se expresan conjuntamente por medio del área molecular (A). De esta forma, se puede expresar la ecuación de estado de una monocapa, a temperatura constante, como:

$$\pi = \pi(A, T)$$

Si la temperatura se mantiene constante, la relación entre la presión superficial y el área molecular se puede expresar gráficamente por medio de la isoterma π -A.

Como las monocapas no forman fases con características totalmente independientes de la solución, la ecuación de estado depende también de la naturaleza de la fase adyacente, es decir de los solutos presentes en la subfase.

La obtención de las isothermas π -A de una monocapa puede realizarse por dos métodos:

-*Método de Langmuir*: La medida de presión superficial se realiza en una balanza de superficie, en la cual un flotador fijo separa una superficie limpia de un área cubierta por monocapa, midiéndose las fuerzas que se originan mediante una derivación situada en el flotador (Langmuir, 1917). En la zona limpia la fuerza medida será la tensión interfacial del agua (γ_0) mientras que en la zona donde hay monocapa la fuerza será la tensión superficial de ésta (γ), por lo que el sensor medirá la resultante entre ambas fuerzas, es decir, la presión superficial ($\pi = \gamma_0 - \gamma$).

-*Técnica de Wilhelmy*: Esta técnica consiste en la medida de la tensión superficial (γ) de una solución de tensioactivo en equilibrio con la superficie. La determinación de la tensión superficial se realiza por medio de láminas de platino colocadas en el centro de una balanza de superficie. Esta posee barreras móviles que permiten la variación del área molecular, conjuntamente con el valor de tensión superficial registrado.

El primero de los dos métodos suele utilizarse para el estudio de monocapas esparcidas. La técnica de Wilhelmy se puede aplicar tanto al estudio de monocapas adsorbidas como al de esparcidas.

Del conocimiento de las isothermas π -A puede obtenerse una amplia información sobre las características de las monocapas, como sus propiedades estructurales (orientación e interacciones entre las moléculas que forman la monocapa) y propiedades reológicas (elasticidad).

➤ Estructura

Al comprimir una monocapa se produce una disminución del área molecular debido a la reducción del espacio ocupado por cada molécula individual, hasta que tiene lugar un cambio de fase. El área molecular total de la película es la suma del área ocupada por cada una de las moléculas, teniendo en cuenta que una fracción de las mismas ocupa un área mayor mientras que el resto se ha trasladado a un área molecular menor. El cambio de fase se produce cuando todas las moléculas de la monocapa están en una u otra de las configuraciones estables.

Los estados de una monocapa pueden definirse por analogía al estado tridimensional. Estos estados van desde un estado gaseoso, en el que no existen interacciones entre las moléculas, a uno sólido, caracterizado por un fuerte empaquetamiento de éstas (Darling et al, 1987). Entre estos dos comportamientos existe una amplia gama de estados intermedios, englobados dentro del estado líquido. Las características principales para cada tipo de monocapa son:

-Monocapas gaseosas: Las moléculas están suficientemente alejadas unas de otras, casi no existen interacciones entre ellas. Las moléculas se encuentran expandidas y ubicadas casi horizontalmente en la interfase. El valor de presión superficial tiende asintóticamente a cero cuando aumenta el área disponible. La viscosidad superficial de estas monocapas es muy baja. Cualquier sustancia formadora de monocapa puede adoptar este estado siempre que las moléculas estén suficientemente alejadas entre sí.

-Monocapas condensadas: En este estado las moléculas se encuentran en su máximo empaquetamiento posible. Las cadenas del tensioactivo se colocan prácticamente en posición vertical con respecto a la interfase, con los grupos polares inmersos en el agua y parte de las cadenas estrechamente empaquetadas. Las moléculas capaces de establecer un contacto íntimo dan lugar a intensas interacciones cadena-cadena y muestran un estado condensado a bajas presiones superficiales. Las monocapas condensadas puede ser de diferentes tipos: fase sólida y fase líquido condensada. La primera presenta una alta pendiente en las isothermas a las menores áreas mientras que en el segundo caso la pendiente es menor. Ambas fases presentan baja compresibilidad.

➤ Elasticidad

A partir de las isothermas π -A puede obtenerse otro parámetro de gran interés desde el punto de vista de la estabilidad de emulsiones y espumas: la *compresibilidad* de la monocapa. Se define como:

$$C_s = -(1/A) \cdot (\delta A / \delta \pi)_T \quad \text{Ec. (II.1.1)}$$

Para definir las propiedades de la monocapa se emplea la inversa de C_s que es la elasticidad:

$$E_s = -A \cdot (d\pi/dA)_T \quad \text{Ec. (II.1.2)}$$

siendo $(\delta \pi / \delta A)_T$ el *módulo de elasticidad* o *módulo dilatacional dinámico*

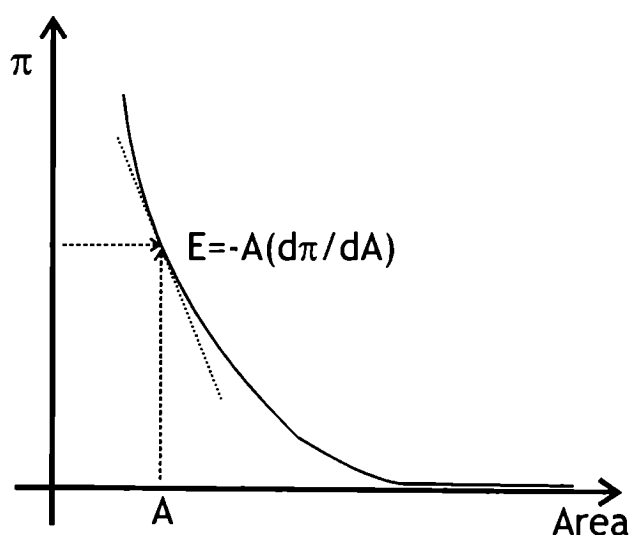


Figura II.1.4 Cálculo de la elasticidad a partir de la isoterma π -A

La elasticidad se define como la resistencia de la monocapa a variar su área molecular. Ésta se puede calcular directamente de las isothermas π -A (**Figura II.1.4**) (Rodríguez Niño et al., 1999). En el estudio de las interacciones entre moléculas, el módulo de elasticidad da una información complementaria a la obtenida por el estado físico de la monocapa, ya que las monocapas con el mismo estado pueden presentar distintos valores del módulo. La extensión del empaquetamiento molecular está íntimamente relacionado con el valor de la elasticidad (Graham y Philips, 1979b).

II.1.1.4.3 Propiedades viscoelásticas

La reología interfacial se define como el estudio de las propiedades mecánicas y de flujo de películas interfaciales. La estructura de una monocapa, una consecuencia de la existencia de interacciones entre las moléculas que la componen, determina las propiedades reológicas de la misma. Es decir, las características reológicas superficiales de la película son muy sensibles a la existencia de tales interacciones (Rodríguez Patino et al., 2002).

Las propiedades viscoelásticas de las películas 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: de corte o de compresión/dilatación.

➤ *Deformación de compresión o dilatación*: Una interfase puede presentar al mismo tiempo características sólidas y fluidas, similarmente a lo descrito para los sistemas tridimensionales. Este comportamiento viscoelástico puede ser caracterizado usando relaciones bidimensionales análogas a las empleadas en la reología de los materiales. La estabilidad de las burbujas en una espuma frente a los mecanismos de desestabilización está gobernada por la resistencia de la interfase a deformarse y romperse. De esta forma, los tensioactivos que forman películas viscoelásticas resistentes a la rotura serán estables frente a desproporción y colapso. Los resultados obtenidos del estudio de las características reológicas dilatacionales superficiales son de importancia práctica dada su relación con la etapa de formación de la dispersión y su estabilidad a tiempos cortos (Rodríguez Patino et al., 2002). En las experiencias de reología interfacial dilatacional, se aplica una deformación sinusoidal del área que ocupa la película y se mide la variación sinusoidal resultante en la presión superficial. La deformación aplicada está caracterizada por una amplitud máxima y una frecuencia de oscilación. La respuesta sinusoidal de la tensión superficial derivada presenta la misma frecuencia que la deformación aplicada, pero estará o no en fase con ésta dependiendo de las características viscoelásticas de la película.

➤ *Deformación en corte o cizalla*: En las experiencias de reología en cizalla no se altera el área superficial global que ocupa la película, sino que se la hace fluir a través de un canal estrecho. Si la película presenta ciertas propiedades de líquido, tenderá a fluir, pero con una resistencia a hacerlo, definiéndose de este modo la *viscosidad de cizalla interfacial*.

II.1.2. ESPUMAS ESTABILIZADAS POR PROTEÍNAS

Muchos alimentos deben su textura característica a la existencia de una estructura espumada (panes, bizcochuelos, bebidas batidas, helados, cerveza, merengues, mousses, etc) (Phillips et al., 1994c). En las espumas alimentarias más típicas, la estructura está estabilizada por la presencia de proteínas adsorbidas en la interfase aire-agua; estas imparten a los alimentos atributos de textura deseables por su capacidad de atrapar, encapsular y retener el gas que generalmente es aire o dióxido de carbono (Dickinson, 1989). Las proteínas que poseen buenas propiedades de espumado

son generalmente de origen animal (huevo o leche), aunque en las últimas décadas se ha difundido también el uso de ciertas proteínas vegetales, como las de soja (Carp, 2001).

II.1.2.1 Estructura de espumas

Una espuma es una dispersión de burbujas de gas en un líquido (Walstra, 1989). Las espumas son sistemas coloidales termodinámicamente inestables, en los cuales una fase dispersa gaseosa es mantenida en una matriz continua, líquida o semisólida, debido a un agente con actividad interfacial. En la dispersión, las burbujas de gas se encuentran separadas por una fase continua de capas delgadas de líquido, las lamelas. Éstas 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 su tamaño, con diámetros que oscilan entre 1 μm a varios milímetros (generalmente de 0,1 a 3 mm) (Walstra, 1989), 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} gotas por ml). Las burbujas en las espumas presentan una compresibilidad cinco órdenes mayor que las de emulsiones, pues el gas es mucho más soluble en agua que el aceite o la grasa. También se observan diferencias con relación a la tensión superficial; en una burbuja de gas se encuentran valores de alrededor de 30 mN/m, la cual es mucho mayor a la tensión interfacial en una gota de emulsión, que puede ser menor a 0,1 mN/m.

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, que puede derivar del drenado excesivo o formarse directamente a valores de Φ bajos, la espuma se transforma en una espuma seca, de burbujas poliédricas. La deformación de las burbujas también se observa cuando Φ es muy alta ($> 0,75$), 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 II.1.5**) (Kim, 1985; Damodaran, 1997).

II.1.2.2 Formación de espumas

Durante la formación de las espumas, el transporte de proteína a las nuevas interfases que se forman ocurre principalmente por convección 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).

Una espumas puede ser formada de dos maneras (Walstra, 1989):

i) Por sobresaturación del líquidos con gas, ya sea por disolución del gas bajo presión y luego liberando a presión (como en las bebidas carbonatadas) o permitiendo la formación del gas en el interior del sistemas (como en la fermentación de masas). La nucleación de burbujas de gas es la etapa crítica del proceso.

ii) Por métodos mecánicos, ya sea por inyección de gas a través de dispersores o por agitación (formación de burbujas de aire mediante un violento movimiento del líquido). La agitación se realiza con diferentes tipos de agitadores mecánicos, utilizando altas velocidades de giro. El primer método es preferido industrialmente, ya que permite un control de la proporción de gas en la espuma. El segundo método es el usado comúnmente en preparaciones caseras o a nivel de laboratorio.

II.1.2.3 Estabilidad de las 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, 1982). El término estabilidad de una espuma se refiere a la habilidad de ésta a resistir cambios en sus propiedades con el tiempo.

La desestabilización de espumas ocurre por diversos mecanismos simultáneamente. En las espumas recién formadas y diluidas, predominan los mecanismos de drenaje y flotación, en tanto que en las espumas poliédricas predominan la desproporción y el colapso (Wagner, 2000). Generalmente, la espumas requieren un tiempo de estabilidad menor que las emulsiones alimentarias. Por ejemplo, en un merengue se requiere que el producto se mantenga estable durante el proceso de cocción y en una cerveza durante varios minutos durante el consumo.

Es importante diferenciar entre los conceptos termodinámicos y cinéticos de estabilidad. La termodinámica informa si un proceso ocurrirá o no, mientras que la cinética da idea de la velocidad a la que ocurre en condiciones determinadas. Todas las espumas alimentarias son sistemas termodinámicamente inestables y tienden hacia la separación de fases en un tiempo suficientemente largo.

II.1.2.4 Procesos de desestabilización

Tan rápido como se ha formado la espuma, comienzan a ocurrir diferentes procesos que llevan a una desestabilización:

1. Las burbujas más pequeñas se disuelven, mientras que las más grandes aumentan de tamaño por difusión de gas a través de la fase continua. Esto es llamado desproporción o maduración de Ostwald.
2. Las burbujas pueden ascender rápidamente, causando una segregación en una capa de burbujas en la parte superior, sobre la fase líquida (en espumas de baja viscosidad).
3. Las burbujas se deforman entre sí, llevando a la formación de espumas poliédricas.
4. El líquido drena desde la espuma hacia la fase líquida (espumas blandas)
5. Las lamelas entre las burbujas adelgazan, llevando al colapso de la espuma.

Estos eventos que se esquematizan en la **Figura II.1.5** pueden ocurrir simultáneamente y en forma cooperativa.

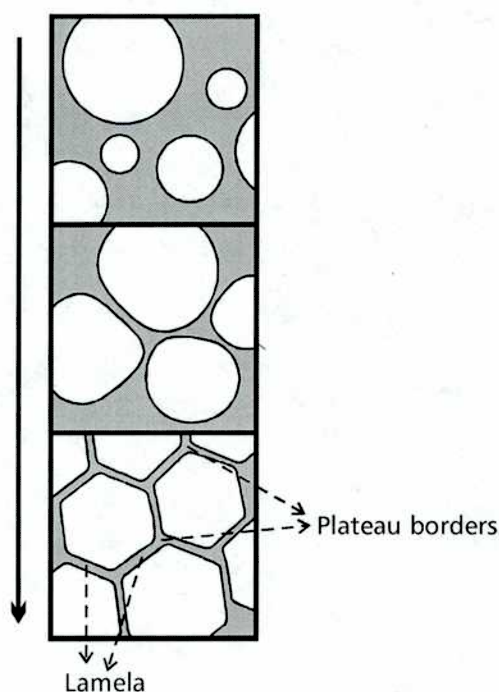


Figura II.1.5. Procesos que tienen lugar formación de una espuma

Los fenómenos mencionados se describen a continuación:

Cremado

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 $v=2g\delta R^2/9\eta$, donde g es la aceleración de la gravedad, δ y η son la densidad y la viscosidad de la fase continua respectivamente (la densidad del gas se considera despreciable) y R es el radio de la burbuja (Walstra, 1989).

Si la viscosidad de la fase continua es relativamente alta, el cremado puede ocurrir muy lentamente. Una forma de detener el proceso de cremado es mediante la adición de un agente espesante con umbral de fluencia. Sin embargo, luego de la agitación pueden transcurrir varios minutos hasta que la fase líquida recupere este umbral de fluencia, con lo que el proceso de cremado puede haberse producido en gran medida antes de este punto (Walstra, 1989).

Drenaje de líquido

A altas ϕ las burbujas pasan de esféricas a poliédricas, el líquido drena de la espuma. Dicho drenado ocurre por: a) efecto de la gravedad, b) pasaje de líquido desde la región laminar entre dos burbujas hacia el plateau border (PB) situado en la intersección entre tres burbujas, debido a la succión capilar del PB provocada por una diferencia de 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 de 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: $v_{av}=d^2 \cdot g \cdot \delta / 8\eta$ donde d es la distancia entre los platos (Kim, 1985).

El proceso de drenado puede ser retardado en gran medida mediante un incremento en la viscosidad de la fase continua, sobre todo si ésta posee un umbral de fluencia.

Desproporción o maduración de Ostwald

Es el fenómeno por el cual se produce el crecimiento de las burbujas de gas más grandes a expensas de las más pequeñas. La fuerza impulsora para que ocurra este fenómeno es la diferencia de presión de Laplace Δp , a través de la superficie de la burbuja:

$$\Delta p = 2 \gamma / r$$

donde γ es la tensión superficial y r es el radio de la burbuja (Prins, 1987).

La presión dentro de una burbuja es mayor a menor radio de las mismas. 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 pequeñas. 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.

Naturalmente, la desproporción o maduración de Ostwald se detiene si la fase continua es o se convierte en un sólido. Esto puede ocurrir en presencia de un agente gelificante, pero la solución inicial debe presentar un índice de fluencia relativamente alto.

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 (del 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 poliédricas y esto podría iniciar la ruptura de la lamela (Halling, 1981).

Cuando la superficie de dos burbujas se aproximan, las fuerzas atractivas y repulsivas 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 absorbidas (Kim, 1985). Los efectos de las fuerzas coloidales en las interacciones energéticas de dos superficies que se aproximan, fueron analizadas en la teoría de DLVO (Deryagi 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 los 10 nm) un mínimo de energía secundario podría dar lugar a una floculación reversible (Halling, 1981).

Otros mecanismos de desestabilización incluyen configuraciones inestables, evaporación y efecto Gibbs-Marangoni entre otros.

II.1.3 INTERACCIONES PROTEÍNA-POLISACÁRIDOS EN INTERFASES Y ESPUMAS.

Los polisacáridos junto a las proteínas constituyen las dos clases de biopolímeros más utilizados como ingredientes en emulsiones y espumas alimentarias (Dickinson, 1992, Mc Clements, 1999b).

El rol principal de las proteínas en productos espumados es estabilizar la interfase aire-agua debido a su capacidad para disminuir la tensión superficial del agua (Damodaran y Paraf, 1992). En particular, la β -lactoglobulina (β -lg), proteína mayoritaria del suero lácteo, exhibe buenas propiedades de espumado (Tornberg, 1979). Las propiedades estructurales y dinámicas de la β -lg en la interfase aire-agua han sido estudiadas extensivamente en los últimos años (Horne y Rodríguez Patino, 2003, Rodríguez Niño et al., 2001, Rodríguez Patino et al., 1999 a, b)

Los polisacáridos son utilizados ampliamente para la estabilización de emulsiones alimentarias y espumas (Renard et al., 2002). Muchos polisacáridos de alto peso molecular, debido a su hidrofiliidad, no poseen una gran tendencia para adsorberse en la interfase aire-agua, pero pueden mejorar enormemente la estabilidad de espumas proteicas actuando como agentes espesantes o gelificantes (Dickinson, 2003).

Muchas veces para lograr una alta estabilidad frente al drenado de los sistemas espumados se utilizan polisacáridos gelificantes, que forman un gel en las lamelas, bajo adecuadas condiciones de temperatura, generalmente por debajo de la temperatura de gelificación del polisacárido. En estudios realizados en sistemas mixtos de proteínas globulares (WPI y aislados de soja) y κ -carragenano se observó un importante incremento en la estabilidad de espumas frente al drenado, desproporción y colapso de las espumas proteicas en presencia del polisacárido, por una gelificación del líquido contenido en las lamelas. Además se observó que el comportamiento

térmico de las espumas mixtas está afectado por fenómenos de volúmenes de exclusión que se producen en estos sistemas (Carp, 2001).

Sin embargo, existe cierta evidencia de que algunos polisacáridos intervienen en la formación de la película interfacial. La formación de complejos proteína-polisacárido en interfases ha sido relacionada a la mejora en las propiedades de películas estabilizadas por proteínas (Dickinson, 2003) y el fenómeno de volúmenes de exclusión a una mayor adsorción de proteína en la interfase (Tsapkina et al., 1992, Dickinson y Mc Clements, 1995).

Las propiedades reológicas de la goma xántica, junto con su conocida estabilidad en un amplio rango de pH y temperatura de trabajo, hacen de este polisacárido un agente espesante ideal en emulsiones alimentarias y espumas. La goma xántica es un polisacárido aniónico que desarrolla altas viscosidades a bajas concentraciones (Imeson, 1992). La gran hidratación que se logra es atribuida a las cadenas laterales de carácter aniónico que consisten en unidades de α -D manosa, β -D glucurónico y piruvato, que ocurren periódicamente en la cadena de celulosa que forma la estructura principal de la goma. Este polisacárido, de gran hidrofiliidad y sin una importante cantidad de uniones de tipo hidrofóbicas, no se adsorbe en la interfase aire-líquido (Yilmazer et al., 1991).

En estudios realizados en espumas formadas a partir de soluciones mixtas de aislados de proteínas de soja y goma xántica, se observó un notable incremento en la estabilidad de las espumas. Este comportamiento no pudo ser explicado sólo debido a un aumento en la viscosidad de la fase continua, sugiriéndose la presencia de interacciones más específicas entre polisacárido y proteína en la interfase aire-agua (Carp et al., 2001). Además, por estudios electroforéticos de las proteínas presentes en la interfase se observó que la goma promovía la agregación de la proteína en la interfase aire-agua (Carp et al, 1999). Una posible interpretación de estos resultados es que la goma se adsorbe en la proteína, formando una estructura combinada con una capa primaria de proteína predominantemente en contacto con la fase gaseosa. Siguiendo esta última hipótesis, la tensión superficial debiera ser dominada por la capa primaria de proteína, cubierta por la capa de polisacárido en un fuerte contacto electrostático, que dominaría el comportamiento reológico (Galazka y Dickinson, 1995). En presencia de muy bajas concentraciones de goma xántica, se ha observado la desestabilización de emulsiones estabilizadas por proteína, mientras que a mayores concentraciones se produce una gran estabilización de los sistemas, atribuida a la inmovilización de las partículas cubiertas por proteína en una estructura de tipo gel (Dickinson, 2003).

La adición de grupos hidrofóbicos en polisacáridos hidrofílicos permite lograr que posean actividad interfacial. La metilcelulosa es un polisacárido neutro utilizado en productos alimenticios como emulsificante, espesante y gelificante (Gullot et al., 2002). Este polisacárido se adsorbe en la

interfase aire-agua debido a su naturaleza parcialmente hidrofóbica. Otros polisacáridos con actividad superficial son los derivados de la metilcelulosa, como la carboximetilcelulosa e hidroximetilcelulosa, los alginatos de propilenglicol (PGA) y pectinas con alto grado de acetilación (Dickinson, 2003). En ciertos polisacáridos que no presentan una considerable hidrofobicidad, la actividad superficial observada se debería a la presencia de bajos porcentajes de proteína asociada (2-3%) a las cadenas de polisacáridos. Este efecto ha sido observado principalmente en galactomananos (goma guar y algarroba) y en goma acacia (Dickinson, 2003, Huang et al., 2001).

Los ésteres del ácido algínico (PGA), constituyen un grupo especial de polisacáridos con actividad interfacial. Estos polisacáridos son lineales, de alto peso molecular, compuestos por ácido D-manurónico y L-gulurónico unidos en las posiciones 1,4 (Sarker y Wilde 1999). Estas gomas son producidas en un amplio rango de viscosidades y grados de esterificación. Al aumentar el grado de esterificación se reduce el carácter hidrofílico de las moléculas que adquieren actividad superficial. La habilidad de los PGA para reducir la tensión superficial del agua, así como el aumento en la viscosidad de la fase acuosa los hacen convenientes como agentes estabilizadores en espumas. La sustitución de más del 50% de los grupos carboxilo produce también en el PGA una mayor tolerancia a la acidez y a la presencia de iones calcio que otros alginatos. Debido a su actividad superficial, en presencia de proteínas podrían ocurrir fenómenos de competencia por la adsorción en la interfase. Las interacciones entre PGA y proteínas de la leche fueron estudiadas por Ahmed & Dickinson (1991) quienes observaron que las propiedades de espumado mejoraron a valores de pH por encima de 7, donde ambos biopolímeros poseen cargas negativas, revelando la posibilidad de formación de complejos electrostáticos por interacción a través de zonas cargadas positivamente en la proteína y los grupos carboxilo del PGA. Los datos de viscosidad superficial de las películas en sistemas mixtos de PGA y caseinato, proteínas del suero y α -lactalbúmina, constituyen un indicio más cuantitativo de la formación de complejos no-covalentes entre los biopolímeros (Dickinson & Euston, 1991). Más recientemente, se encontró que la estabilidad de espumas en sistemas mixtos de albúmina de suero bovina/Tween 20 a pH 4,2 fue aumentada significativamente en presencia de PGA (Sarker & Wilde, 1999).

Se han llevado a cabo algunos estudios que demuestran la formación de complejos o interacciones electrostáticas entre proteína y polisacáridos en interfases. Interacciones electrostáticas a $\text{pH} > \text{pI}$ de la proteína han sido reportadas en numerosos sistemas mixtos de proteínas y polisacáridos, principalmente aniónicos: BSA/alginatos (Imeson et al., 1977), Caseína/PGA (Dickinson y Euston, 1991), BSA/PGA (Sarker y Wilde, 1999), BSA/carragenanos (Dickinson y Pawlowsky, 1998), WPC/pectinas (Mishra et al., 2001).

La formación de estos complejos electrostáticos se atribuye a las interacciones existentes entre zonas cargadas positivamente en la proteína aún a pH por encima del pH isoelectrico y grupos con

carga negativa de los polisacáridos aniónicos (Schmitt et al., 1998, Dickinson y Galazka, 1991, Euston et al., 2002). En las películas mixtas donde están presentes este tipo de complejos, se ha sugerido que la proteína se encontraría adsorbida en la interfase y que el polisacárido complejo actuaría como una barrera estérica, impidiendo la agregación electrostática entre proteínas que cubren la superficie de burbujas o gotas (Dickinson & Euston, 1991). Este efecto produce además un engrosamiento del film, por lo que aumenta la viscoelasticidad del film y por lo tanto la estabilidad de la espuma o emulsión.

II.2

Objetivos

II.1 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar las propiedades interfaciales aire-agua de la β -lg en presencia de polisacáridos con y sin actividad interfacial y su relación con la estabilidad de las espumas.

El estudio se realizará a pH 7, en condiciones de concentración de β -lg (2% máximo) y polisacáridos (0,5% máximo) donde si bien no hay separación de fases, pueden existir fenómenos de volúmenes de exclusión en el seno de la fase.

Para el estudio de las propiedades interfaciales se utilizarán dos enfoques experimentales diferentes:

- (a) Estudio de monocapas esparcidas (Balanza de superficie tipo Wilhelmy)
- (b) Estudio de monocapas adsorbidas (Tensiómetro de gota)

OBJETIVOS PARTICULARES

1) Estudiar el efecto del grado de esterificación y viscosidad/peso molecular del alginato de propilenglicol (seleccionado como polisacárido con actividad superficial) en su actividad en la interfase.

2) Determinar si existen fenómenos competitivos o cooperativos entre la β -lg y polisacáridos con actividad interfacial (PGA) a nivel de las películas interfaciales.

3) Estudiar si los polisacáridos sin actividad interfacial (χ ántica y λ -C) tienen algún efecto a nivel de la películas de β -lg, que pueda contribuir a la estabilización de espumas más allá del carácter espesante que poseen.

4) Analizar qué tipo de interacciones se establecen entre la β -lg y los diferentes polisacáridos a nivel de la interfase.

5) Identificar cuáles propiedades de las interfases tienen más influencia en el comportamiento macroscópico de las espumas (drenado, desproporción, colapso).

II.3

Materiales y Métodos

II.3 MATERIALES Y MÉTODOS

II.3.1. Materiales

➤ Se utilizó un aislado de proteínas del suero con alto contenido en β -lactoglobulina. El mismo fue suministrado por *Danisco Ingredients*.

Composición:

Contenido proteico	92 $\pm$ 2 %
β -lactoglobulina	> 95 %
α - lactalbúmina	< 5 %
grasa	< 1 %
lactosa	< 0,2 %
humedad	5,5 %

➤ Se estudió el efecto de polisacáridos no gelificantes, con y sin actividad interfacial, en las propiedades interfaciales y de espumado. Los polisacáridos utilizados fueron:

λ - carragenano y goma Xántica, de Sanofi Bioindustries

Alginato de Propilenglicol, de ISP Alginates.

Se utilizaron diferentes tipos de alginato de propilenglicol con distinto grado de esterificación y viscosidad. Los datos suministrados por el proveedor (ISP Alginates) se muestran en la **Tabla II.3.1**

Tabla II.3.1 Propiedades de los distintos tipos de PGA

Propiedades	Manucol Ester E/RK	Kelcoloid LVF	Kelcoloid 0
pH	3 - 5	3.4 - 4	3.5 - 4.4
Grado de esterificación (valor típico)	78-85%	48-62%	78-85%

La firma fabricante de estos productos ha informado que si bien las especificaciones indican el mismo rango de grado de esterificación típico para el Manucol ester y Kelcoloid 0, el Manucol Ester suele presentar un porcentaje de esterificación menor que el Kelcoloid 0. En el caso del Manucol, éste desarrolla mayores viscosidades debido su mayor peso molecular y a que posee un mayor nivel de calcio, que reacciona con los grupos no esterificados del polisacárido dando una “falsa” viscosidad. Por lo general no se suelen realizar mediciones de peso molecular de los diferentes productos, debido a que es un procedimiento que demanda tiempo y realmente la

información obtenida no es de gran relevancia en las aplicaciones de estas gomas. Las diferencias en los pesos moleculares se observan como diferencias en viscosidades de las soluciones acuosas de los alginatos.

➤ El agua utilizada en las mediciones de propiedades interfaciales fue obtenida en una unidad Millipore (Milli QTM), con una resistividad de 18 MΩ.cm.

II.3.2 Preparación de las soluciones de proteína y polisacáridos

Las soluciones de proteína fueron preparadas disolviendo la cantidad pesada de aislado en agua destilada bajo constante agitación. Luego de la disolución, se determinó el pH y se ajustó a pH neutro con HCl o NaOH 0.1N.

Las soluciones de proteína a utilizarse en la medición de propiedades interfaciales y de espumado fueron preparadas por lo menos 24 hs. antes de las mediciones, y fueron conservadas en heladera (5 °C) por un máximo de una semana. Las soluciones de polisacárido fueron preparadas disolviendo la cantidad necesaria de polisacárido en agua bajo constante agitación. No fue necesario el calentamiento de las soluciones de polisacáridos durante la preparación, debido a que todas las gomas utilizadas son solubles en frío. En el caso de los sistemas mixtos, las soluciones de proteína y polisacárido se prepararon al doble de la concentración final en la mezcla, de modo que las soluciones mixtas fueron preparadas mezclando ambas soluciones en relación 1:1.

II.3.3 Métodos

Se estudiaron las propiedades interfaciales y las características de las espumas de los sistemas de proteína pura, de los polisacáridos puros y de los sistemas mixtos. Para ello se utilizaron diferentes técnicas y equipos, los que se encuentran descriptos a continuación.

TÉCNICA	DISPOSITIVO EXPERIMENTAL	APLICACIÓN
Tensiometría	-Balanza de superficie tipo Wilhelmy -Tensiómetro de gota	-Estructura de monocapas esparcidas -Estabilidad de monocapas esparcidas -Elasticidad de monocapas -Cinéticas de adsorción (formación del film interfacial) -Presiones de equilibrio

Reología interfacial	-Balanza de superficie tipo Wilhelmy -Tensiómetro de gota	Propiedades reológicas de la monocapas esparcidas y adsorbidas en sistemas de proteína sola y mixtos (G' , G'' , $\tan\delta$)
Formación y estabilidad de espumas	-Viscosímetro Brookfield. Aplicación del método reológico (Carp et al., 1997c)	-Viscosidad aparente de soluciones y comportamiento reológico -Capacidad de espumado -Estabilidad de las espumas frente al drenaje, deproporción y colapso.

Los métodos utilizados para la medición de la tensión interfacial utilizados en el presente trabajo se clasifican en:

- Procedimientos basados en la medida de una fuerza: método de la placa de Wilhelmy.
- Procedimientos basados en una medida geométrica: gota pendiente

II.3.3.1 Balanza de superficie tipo Wilhelmy

II.3.3.1.1 Principio de funcionamiento

La técnica de medición de este equipo y de otros tales como el tensiómetro de tipo Wilhelmy, se fundamenta en que las moléculas formadoras de monocapa o interfase están sujetas a un esfuerzo. Cuando un cuerpo sólido se pone en contacto con la interfase, la tensión interfacial actúa a lo largo de la línea de mojado.

El sistema de medida está formado por dos láminas de platino rectangulares, suspendidas verticalmente. El borde inferior de cada lámina se pone en contacto con el líquido en cuya superficie se encuentra la interfase y de ese modo se moja. La fuerza F con que es empujada la lámina mojada hacia el líquido puede medirse (**Fig II.3.1**). Si L_b es la longitud mojada:

$$\gamma = \frac{F}{L_b \cdot \cos \vartheta} \quad \text{Ec. (II.3.1)}$$

donde ϑ es el ángulo de contacto es decir, el ángulo entre la superficie de la lámina y la tangente de la línea de mojado. Cuando el mojado es total, el ángulo de contacto es cero. Este es el caso de las láminas de platino rugoso, que son las que se utilizan generalmente en los equipos de medición.

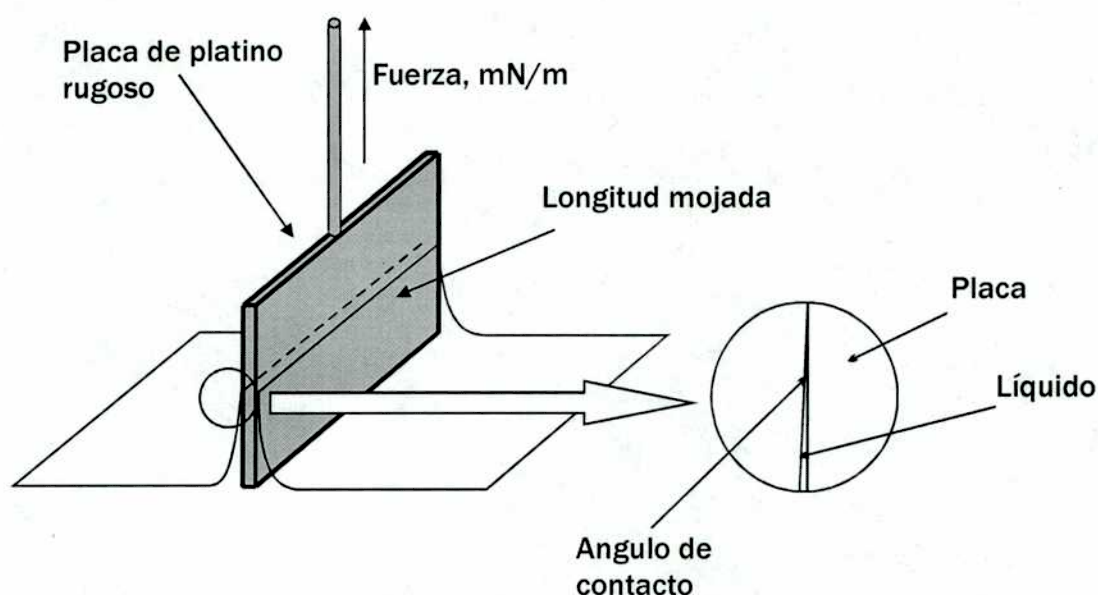


Figura II.3.1 Plato de Wilhelmy en posición de medida

II.3.3.1.2 Descripción del equipo

Como se dijo anteriormente, esta balanza posee dos platos de platino rugoso como sistema de medida. El área disponible para la película del tensioactivo queda determinada entre dos barreras móviles. Este área varía continuamente por el movimiento de las barreras.

Para la realización del presente trabajo se utilizó una balanza de superficie tipo Wilhelmy KSV, modelo 3000 (Finlandia). Esta se encuentra conectada a una interfase que actúa como conexión entre la balanza y la computadora, a través de la cual se controlan las operaciones que se desean realizar. La balanza posee también un control manual, que permite mover las barreras cuando el sistema no se encuentra realizando medidas, sobre todo para las operaciones de esparcimiento de la proteína y de limpieza del equipo. La balanza se termostatiza mediante un baño (*Pselecta Frigiterm*) que impulsa el agua de recirculación por la base de la batea. Toda la unidad de medida se encuentra en el interior de una vitrina de vidrio, con el fin de proteger el sistema de la contaminación ambiental y mantener en lo posible la humedad del sistema constante. Además, durante las medidas y debido a la alta sensibilidad del equipo es importante evitar corrientes de aire que puedan mover los dispositivos y afectar la mediciones.

Las partes fundamentales de la balanza KSV3000 (Figura II.3.2) se describen a continuación:

-*Sistema sensor*: está formado por dos platos de platino rugoso. El rango de medida es de 0-100 mN/m.

-*Batea*: consta de una base de aluminio termostatizada recubierta por teflón (1,5mm de espesor). Es de forma rectangular, de dimensiones 560 x 150 mm, aunque al colocar las barreras móviles ésta se reduce a 515 x 150 mm.

-sistema de control de área disponible para la película: el área se encuentra regulada por el movimiento de dos barreras realizadas en teflón. Estas pueden moverse en el mismo sentido o en sentido contrario. Dicho movimiento está controlado por un motor de alta precisión. Cada una de las barreras puede moverse en un rango de velocidades de 0,01-400 mm/min.

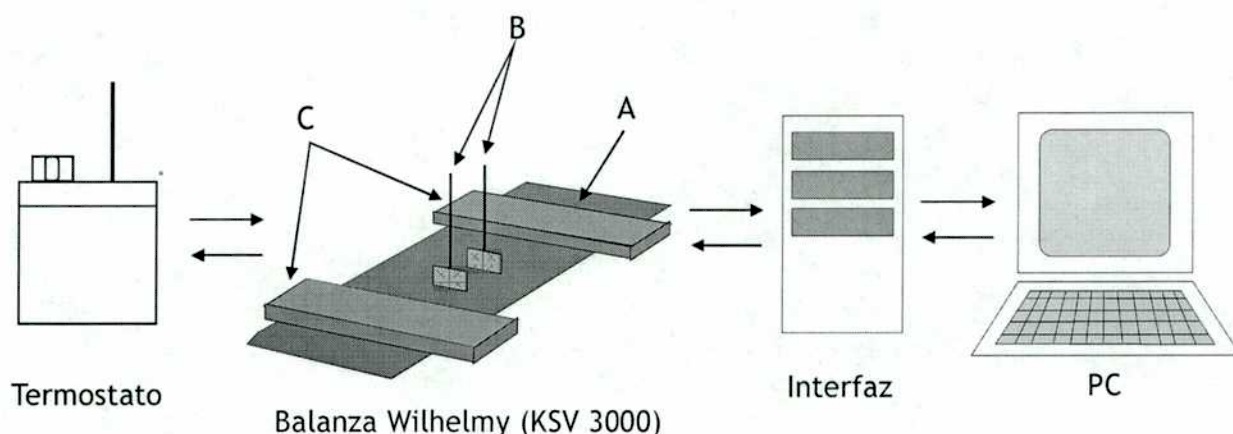


Figura II.3.2 Dispositivo experimental (Balanza Wilhelmy): A: Batea, B: sistemas sensores, C: Barreras móviles.

Todas las operaciones de la balanza se controlan mediante una computadora, provista de un software mediante el que se programan las condiciones a las cuales se desea realizar la experiencia (sentido de movimiento de las barreras, velocidad de movimiento, presión superficial máxima a alcanzar, amplitud de las oscilaciones). La gran versatilidad de este equipo permite obtener tanto isotermas de presión como realizar experiencias de reología interfacial.

II.3.3.1.3 Procedimiento experimental

Primeramente debe llenarse la batea con la subfase deseada (aproximadamente 1280 ml) y termostatar a 20 °C. A continuación se colocan las placas de platino, de forma tal que la parte inferior de cada placa entre en contacto con la subfase, observándose un buen mojado. Las placas se colocan enfrentadas y paralelas entre sí. Posteriormente se procede a tarar la presión superficial de manera que en ausencia de monocapa ésta valga cero. No es necesario realizar este procedimiento cada vez que se realiza una experiencia. Por lo general esta calibración se realiza cada 6 meses o cuando el equipo es transportado de lugar.

A continuación, para comprobar la ausencia de impurezas en la superficie se realiza un ciclo de compresión-expansión a la temperatura de calibrado, durante el cual el indicador de fuerza debe

permanecer con un valor inferior a 0,1 mN/m. En caso de que hubiese alguna impureza que elevara el valor de presión por encima de 0,1 mN/m, se realizan pequeñas aspiraciones en la superficie del líquido con una manguera conectada a una bomba de vacío, y se repite el ciclo de compresión expansión hasta lograr una superficie libre de impurezas. Luego las barreras se mueven de forma tal de quedar totalmente expandidas y se procede al esparcimiento de la proteína.

El esparcimiento de proteínas globulares se realiza con la ayuda de una varilla de vidrio (método Trurnit) (Trurnit, 1960), lo cual facilita el desplegamiento de estas proteínas mejorando el proceso de esparcimiento. Esta operación se realiza depositando gota a gota la cantidad de solución de proteína que se va a esparcir sobre un extremo de la varilla, a unos 10 cm de la superficie y con una inclinación de ésta de aproximadamente 50 °. En las mediciones realizadas en la Balanza de superficie, se esparcieron 400 µl de una solución diluída de proteína ($1.6 \cdot 10^{-4}$ mg/µl). Esta cantidad esparcida asegura el cubrimiento total de la interfase por una monocapa de β -lg. Para asegurar el esparcimiento cuantitativo de la proteína se verifica mediante la reproducibilidad de las isotermas π -A.

Tanto para la obtención de las isotermas π -A como para la reología dilatacional, se procedió de forma diferente para la realización de las experiencias en sistemas mixtos con polisacáridos con y sin actividad interfacial.

En las experiencias realizadas con alginato de propilenglicol (PGA) con diferente grado de esterificación (Kelcoloid 0, Kelcoloid LVF y Manucol Ester) se procedió al llenado de la batea con agua destilada, luego se esparció la proteína y finalmente se agregó con una jeringa una solución de polisacárido concentrada. Esta solución se agrega por detrás de las barreras que limitan la monocapa, de modo de no afectar la monocapa de proteína que se encuentra formada entre las barreras.

En las experiencias realizadas con goma xántica y λ -carragenano, se llenó la batea con la solución del polisacárido, se realizó la verificación de ausencia de impurezas y luego se esparció la proteína sobre la subfase de polisacárido. Cabe aclarar que por tratarse de polisacáridos sin actividad interfacial, en el ciclo de compresión-expansión en ausencia de proteína no se registró un aumento de presión con la subfase al 0,05% de polisacáridos.

Obtención de las isotermas π -A

Como se ha mencionado anteriormente, se realiza un ciclo de compresión-expansión sobre la subfase limpia. Luego se realiza el esparcimiento de la proteína y se espera 30 minutos para lograr una desplegamiento total de la misma en el área máxima de la balanza.

Se setean las condiciones de la experiencia mediante el software instalado en la computadora que actúa de unidad de control. Las experiencias se realizan mediante el movimiento de las barreras a una velocidad de 15 mm/min en sentido contrario de manera que se va reduciendo el área disponible de las moléculas de proteína esparcidas. Por lo tanto, el área se varía desde el área máxima, de 772 cm² hasta un área tal que corresponde a una presión de aproximadamente 29 mN/m. Este valor de presión fue elegido en base a datos previos de las condiciones de colapso de monocapas de β -lactoglobulina (Carrera Sánchez, 2000), correspondiendo dicho valor a la presión de colapso de la monocapa. Luego del colapso de la monocapa, se formarían multicapas de proteína, y estos cambios podrían ser en parte irreversibles, lo que impediría seguir trabajando con la misma película.

Mediante este procedimiento se obtienen los gráficos de presión versus área de la película.

Para obtener en el eje de abscisas valores de área molecular o densidad molecular se calculan los miligramos de proteína contenidos en la cantidad esparcida. En todas las experiencias de obtención de isothermas y de reología interfacial se esparcieron 400 μ l de proteína de una solución de 0,16 mg/ml, lo que resulta en una cantidad de proteína esparcida de 0,064 mg. Por lo tanto, los valores de área y densidad molecular se calculan como:

$$\text{Área molecular (m}^2\text{/mg)} = \text{Área disponible (m}^2\text{)} / 0,064 \text{ mg}$$

$$\text{Densidad molecular (mg/m}^2\text{)} = 1 / \text{área molecular}$$

Elasticidad de la película

De las isothermas π -A, la elasticidad se puede evaluar como $E = -A \cdot (\delta\pi/\delta A)_T$. La elasticidad definida de este modo es la elasticidad a velocidad nula de deformación (Rodríguez Niño et al., 1999) y una medida de la resistencia del film a un cambio en el área y puede ser calculada directamente de la pendiente de las isothermas π -A a temperatura constante.

A partir de las tablas de datos de π vs A de cada isoterma se calculó $(\delta\pi/\delta A)$ en cada punto mediante el programa Origin.3, y luego se multiplicó por A, para obtener la elasticidad.

Obtención de parámetros reológicos dilatacionales

Las técnicas de reología interfacial dilatacional se basan en el principio de medir la tensión superficial mientras la interfase es sometida a algún cambio en su área. Los principales métodos son: métodos de batea, donde una película macroscópica es contenida entre dos barreras que definen el área disponible para ésta y los métodos de gota, donde las medidas son realizada en gotas de líquido o burbujas de gas. En los métodos de batea la tensión interfacial es medida

mediante un plato de Wilhelmy, mientras que en los métodos de gota se utilizan las variaciones en el tamaño de las gotas para medir los cambios en la tensión superficial. En el presente trabajo se han utilizado ambos métodos para la obtención de los parámetros reológicos.

En los ensayos reológicos dilatacionales se aplica una deformación sinusoidal del área que ocupa la película y se mide la variación sinusoidal resultante en la presión superficial. La deformación aplicada está caracterizada por una amplitud máxima y una frecuencia de oscilación (ω). La respuesta sinusoidal de la tensión superficial derivada presenta la misma frecuencia que la deformación aplicada, pero estará o no en fase con ésta dependiendo de las características viscoelásticas de la película (**Figura II.3.3**).

El módulo dilatacional superficial derivado de la variación en la presión superficial (*esfuerzo dilatacional*) (Ec. II.3.2) como consecuencia de una pequeña variación en el área superficial (*deformación dilatacional*) (Ec II.3.3) puede ser descrita por la Ec. II.3.4 (Luchasen y van den Temple, 1972):

$$\pi = \pi_0 + \pi_{\text{amplitud}} \cdot \text{sen}(\omega t + \delta) \quad \text{Ec (II.3.2)}$$

$$\ln A = \ln A_0 + \ln A_{\text{amplitud}} \cdot \text{sen}(\omega t) \quad \text{Ec (II.3.3)}$$

$$E = \frac{d\gamma}{dA/A} = - \frac{d\pi}{d \ln A} \quad \text{Ec (II.3.4)}$$

donde π_{amplitud} y A_{amplitud} son las amplitudes del esfuerzo y la deformación respectivamente, y ϕ es el ángulo de desfase entre el esfuerzo y la deformación.

El módulo dilatacional es una magnitud compleja que está compuesta por una parte real y una imaginaria.

$$E = |E| \cdot (\cos \delta + i \text{sen} \delta) = E_d + i \cdot E_v \quad \text{Ec(II.3.5)}$$

La parte real del módulo dilatacional, también denominada componente de almacenamiento, es la elasticidad dilatacional, E_d :

$$E_d = |E| \cdot \cos \delta \quad \text{Ec (II.3.6)}$$

La parte imaginaria del módulo dilatacional o componente de pérdida es la viscosidad dilatacional superficial, E_v :

$$E_v = \eta_d \omega = |E| \cdot \text{sen} \delta \quad \text{Ec (II.3.7)}$$

donde ω es la frecuencia de oscilación, medida en ciclos por segundo; y η_d es la viscosidad dilatacional.

La relación entre amplitud del esfuerzo y la amplitud de deformación es el módulo absoluto, $|E|$, el cual representa una medida global de la resistencia dilatacional que presenta un material a ser deformado; es decir, es una medida de su carácter viscoelástico. De esta forma, en un material puramente elástico el esfuerzo y la deformación se encuentran en fase ($\delta = 0$), de forma que la parte imaginaria es cero. En el caso de un material perfectamente viscoso, existirá un desfase de 90° , siendo por lo tanto la parte real nula. De esta forma, el ángulo de desfase aporta información acerca del carácter viscoelástico de un material. Las películas más elásticas darán lugar a menores ángulos de desfase y por lo tanto a una menor cantidad de energía disipada por ciclo. Dicho ángulo de desfase suele expresarse de la siguiente forma:

$$\text{tg } \delta = E_v / E_d$$

En todos los casos las experiencias de reología se realizan una vez obtenidas las isothermas π -A de los sistemas. Se esperaron aproximadamente 30 minutos desde la última isoterma realizada dejando las barreras totalmente extendidas de modo de tener el área máxima disponible al comienzo de la experiencia. En este estudio las condiciones de las experiencias fueron

Amplitud de deformación: 5%

Frecuencia: 50 mHz

Los parámetros reológicos fueron estudiados en función de la presión superficial. Para ello, las barreras se van comprimiendo de manera de lograr el valor de presión deseado al comienzo de las oscilaciones sinusoidales, realizando las mediciones en orden de presiones ascendentes. El rango de las presiones fue entre 0 y 30 mN/m. La presión inicial a la que se realiza el primer ciclo de deformaciones depende del sistema, ya que en algunos sistemas se observan valores de presión que alcanzan los 10 mN/m con las barreras totalmente extendidas. En estos ensayos dilatacionales se realizaron mediciones de cinco oscilaciones, a partir de las cuales se obtuvieron los parámetros reológicos característicos de las películas interfaciales: E , E_d , E_v y $\text{tg } \delta$ (**Figura II.3.3**).

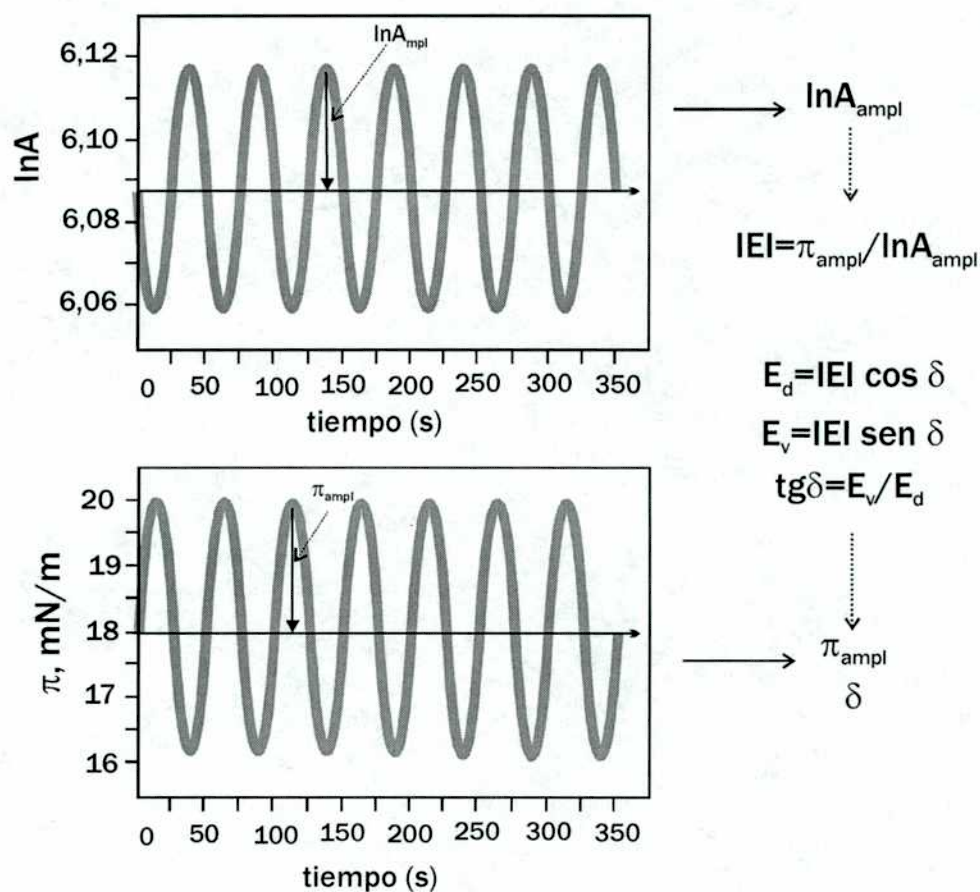
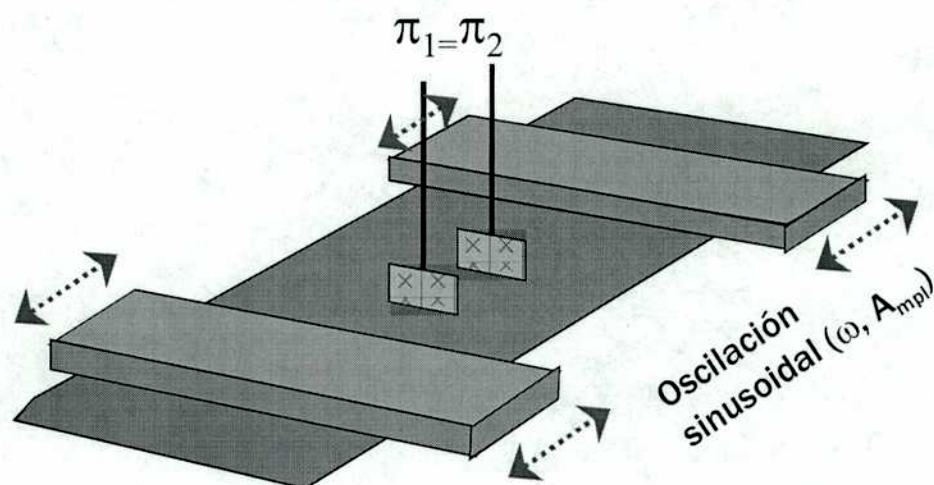


Figura II.3.3 Experiencia de reología interfacial dilatacional. De los gráficos de π vs t y $\ln A$ vs t se obtienen los parámetros reológicos por medio del ajuste de los datos a las ecuaciones II.3.2 y II.3.3 respectivamente.

II.3.3.1.4 Limpieza del equipo.

Antes de realizar las experiencias, tanto de reología interfacial como de obtención de las isotermas, se realiza la limpieza de la balanza con etanol en todas las superficies de contacto con la subfase o monocapa, esto es, la superficie de la batea y de las barreras. Luego de realizar las experiencias en la balanza se realiza el vaciamiento de la misma por medio de la succión de la subfase con una manguera conectada a una bomba de agua. Además, como norma general en todas las experiencias realizadas en la balanza, los platos de platino se calientan a rojo a la llama de un mechero de Bunsen, con el fin de eliminar cualquier impureza que pueda contaminar la superficie.

II.3.3.2 Tensiómetro de gota

II.3.3.2.1 Principio de funcionamiento

Los métodos de gota montada o pendiente pueden ser empleados para determinar las tensiones superficiales o interfaciales de líquidos. La forma de una gota de líquido depende de un balance entre fuerzas gravitacionales y superficiales. Las fuerzas superficiales favorecen la forma esférica de la gota ya que ésta minimiza el área de contacto entre el líquido y su alrededor. Las fuerzas gravitacionales tienden a ocasionar un elongamiento (si la gota es pendiente) o un aplastamiento (si se encuentra sobre una superficie). La forma de equilibrio adoptada por la gota está determinada por su volumen, densidad y su tensión superficial (o interfacial) (Mc Clements, 1999c).

El método dinámico se basa en la obtención de la medida de tensión superficial debido a variaciones en la geometría de una gota de líquido suspendida en aire.

El perfil de la gota es procesado de acuerdo a la ecuación fundamental de Laplace para obtener la tensión interfacial o superficial,

$$\frac{1}{x} \frac{d}{dx} (x \cdot \sin \theta) = \frac{2}{b} - C \cdot z \quad \text{Ec (II.3.8)}$$

donde x y z son las coordenadas cartesianas en una posición dada del perfil de la gota, b es el radio de curvatura de la gota, θ es el ángulo de la tangente del perfil de la gota y C es una constante de capilaridad, $C = g \cdot \Delta \rho / \sigma$, donde σ es la tensión interfacial, $\Delta \rho$ es la diferencia entre las densidades de las dos fases y g es la aceleración de la gravedad. El software empleado calcula tres parámetros característicos de la gota, que son área, A , volumen, V y tensión interfacial, σ . La exactitud promedio en la tensión interfacial con el equipo utilizado en este trabajo es de 0,1 mN/m. Sin embargo, la reproducibilidad de los resultados se encuentra en un rango de entre 0,5 y 1,5 %, con la reproducibilidad mínima correspondiendo a altas temperaturas (Rodríguez Patino et al., 1999b).

II.3.3.2.2. Descripción del equipo

Dependiendo de la densidad relativa entre los dos fluidos entre los cuales se encuentra la interfase a estudiar, la gota puede estar montada (gota de aceite en agua) o colgante (gota de agua en aire). En este trabajo se utilizó el sistema de gota pendiente en aire. La gota se forma con una jeringa tipo Hamilton, cuyo extremo se coloca en la posición adecuada de modo de obtener la visualización completa de la gota en cada experiencia dentro de la pantalla de video.

Una vez formada la gota, su perfil es digitalizado y analizado a través de una cámara CCD acoplada a un digitalizador de perfil de imágenes conectado a un procesador. Para mantener el control visual de la gota, la imagen de la misma es visualizada en forma permanente en un monitor de video. El esquema del equipo utilizado se muestra en la **Figura II.3.4**.

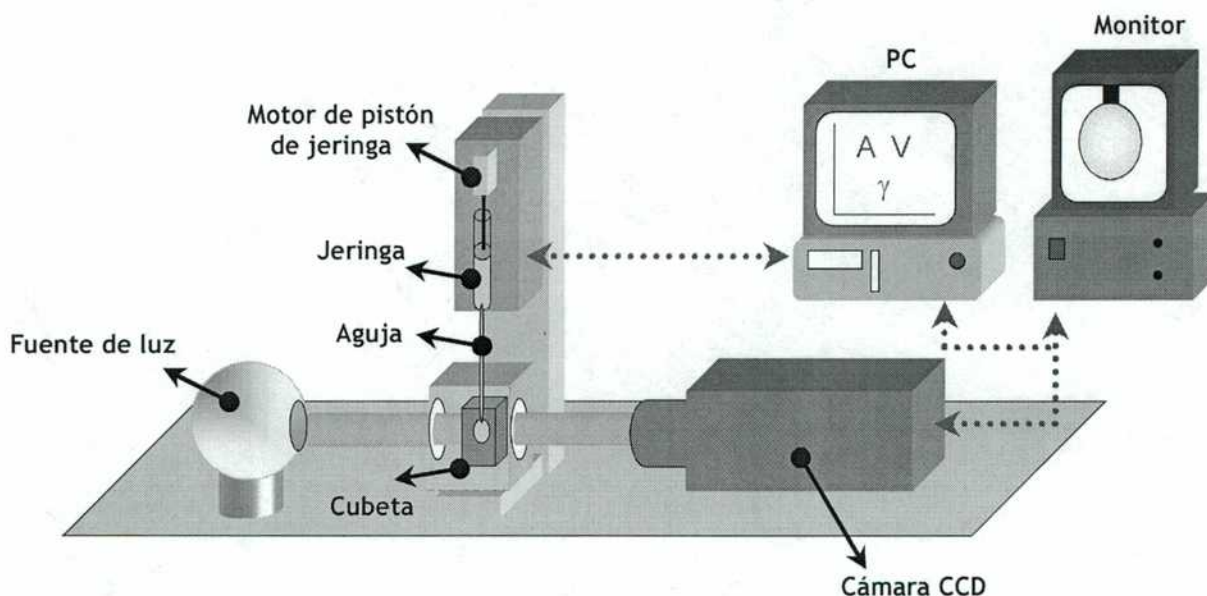


Figura II.3.4 Esquema del Tensiómetro dinámico de gota utilizado para la determinación de propiedades superficiales, reológicas y cinética de adsorción en la interfase aire-agua.

II.3.3.2.3 Procedimiento experimental

Para la preparación de la medida, primero se procede a la limpieza de la jeringa para eliminar todo resto de impurezas o sustancias tensioactivas. Se toma con cuidado una cantidad de solución y se limpia la punta de la jeringa. Luego ésta se coloca verticalmente en el dispositivo y se afirma con los tornillos de ajuste. Posteriormente se visualiza en la pantalla el borde del extremo de la jeringa y se mueve la misma de forma tal que quede ubicada en el extremo superior y centrada en la pantalla.

La formación de la gota puede producirse automáticamente una vez que comienza la medición, indicando en el programa la cantidad de microlitros a descargarse para su formación, o bien manualmente desde el programa, para lo cual se va descargando lentamente unos pocos microlitros hasta llegar al tamaño de gota deseado. Dependiendo del tipo de sistema, sobre todo de acuerdo a la viscosidad del mismo, se ha procedido en forma diferente para lograr la formación de la gota. El inconveniente con los sistemas de mayor viscosidad es que se “trepan” al borde de la jeringa, con lo que en varios casos ha sido necesario limpiar el borde de la jeringa y repetir el procedimiento de formación de gota varias veces. Una vez formada la gota se comienza inmediatamente a adquirir los datos de tensión superficial en función del tiempo. Luego del período de rápido decaimiento de tensión superficial que se produce a tiempos cortos, como se verá en la parte de resultados, comienzan a inducirse las oscilaciones sinusoidales para la obtención de los parámetros reológicos. Los parámetros reológicos superficiales, módulo complejo (E), viscoso (E_v), elástico (E_d) fueron medidos en función del tiempo t , para unas dadas condiciones de amplitud ($\Delta A/A$) y frecuencia angular (ω). El método de medición comprende una serie de compresiones y expansiones periódicas sinusoidales con incremento y disminución del volumen de la gota a la amplitud deseada ($\Delta A/A$). El módulo dilatacional superficial derivado de un cambio sinusoidal en la tensión interfacial, σ resultante de un pequeño cambio sinusoidal en el área superficial, puede ser descripto como.

$$\sigma = \sigma_0 \cdot \text{sen}(\omega \cdot t + \delta) \quad \text{Ec (II.3.9)}$$

$$A = A_0 \cdot \text{sen}(\omega \cdot t) \quad \text{Ec (II.3.10)}$$

$$E = \frac{d\sigma}{dA/A} = - \frac{d\pi}{d \ln A} \quad \text{Ec (II.3.11)}$$

Donde σ_0 y A_0 son las amplitudes del esfuerzo y deformación, δ es el ángulo entre deformación y esfuerzo, $\pi = \sigma_0 - \sigma$ es la presión interfacial y σ_0 es la tensión interfacial en ausencia de tensioactivo (tensión interfacial de agua pura). El módulo elástico es la parte real del modulo dilatacional superficial, se obtiene como $E_d = |E| \cdot \cos \delta$. La parte imaginaria es el módulo viscoso, $E_v = |E| \cdot \text{sen} \delta$. De la misma forma que lo descrito para la reología interfacial por el método de la balanza, la tangente del ángulo de pérdida queda definida como $\text{tg} \delta = E_v/E_d$.

Todos los experimentos fueron realizados a una temperatura de 20 °C, la cual fue mantenida constante con una variación de 0,1°C por circulación de agua desde un baño termostatzado.

II.3.3.2.4 Limpieza del equipo

Una vez terminada la medición, se retira la jeringa y se descarga la solución no utilizada. La limpieza de la misma se realiza con etanol, por carga y descarga de la misma varias veces, y una limpieza final con hexano.

II.3.3.3 Determinación de la viscosidad de las soluciones y comportamiento reológico

Se determinó la viscosidad de las soluciones de polisacáridos (0,5%), proteína (2%) y sistemas mixtos proteína + polisacáridos (0,5% + 2%) en un viscosímetro Brookfield DV-LVT con cono y plato a 20 °C (conos 41 y 52, 24 mm y 48 mm de diámetro respectivamente) en el rango de velocidad de deformación de 0 a 120 s⁻¹. Se obtuvieron los valores de esfuerzo de corte frente a las velocidades de deformación.

Las curvas de flujo fueron ajustados mediante la ecuación de Herschel Burkley, según:

$$\tau = \tau_0 + K \cdot (\dot{\gamma})^n \quad \text{Ec (II.3.12)}$$

donde τ es el esfuerzo de corte, $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación, K es el coeficiente de consistencia, n es el índice de flujo y τ_0 es el umbral de corte para velocidad de deformación nula. Esta ecuación es utilizada para modelar el comportamiento reológico de sustancias con relación no lineal entre esfuerzo de corte y velocidad de deformación. En caso de no presentar umbral de corte, se aplica la misma ecuación, con $\tau_0 = 0$.

II.3.3.4 Propiedades de espumas de β -lg y β -lg/PS formadas por el método de batido

Para la formación de las espumas se colocaron 40 ml de solución en una probeta graduada de 3 cm de diámetro (110 ml de capacidad total) , y se utilizó un agitador Griffin & George con una paleta de 4 divisiones, conectado a un reóstato para la regulación de la velocidad de agitación.

El tiempo de agitación debe seleccionarse de manera de obtener el máximo volumen de espumado (Kitabake & Doi, 1982). La formación de espuma se produjo por agitación durante 3 minutos, tiempo suficiente para alcanzar el máximo de espuma a 2000 rpm.

II.3.3.4.1 Capacidad de espumado

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

$$\%FE = \frac{(V_E - V_{sn}) \cdot 100}{V_{sn}} \quad \text{Ec (II.3.13)}$$

donde V_E es el volumen final de espuma obtenido y V_{sn} es el volumen de solución a partir del cual se produjo la espuma.

II.3.3.4.2 Método para la determinación simultánea de velocidades de drenado, desproporción y colapso.

Se utilizó el método desarrollado por Carp et al.(1997c) para la evaluación de las propiedades de las espumas, el cual permite medir simultáneamente el líquido drenado, la viscosidad aparente y el volumen de la espuma en función del tiempo. Estas características servirán luego para la obtención de las velocidades de los diferentes procesos y la evaluación y comparación de estabilidad de las diferentes espumas frente al drenado, desproporción y colapso.

Este método posee la ventaja de que puede ser aplicado a sistemas con alta concentración proteica. El estudio de los fenómenos de desestabilización tales como drenado o colapso el espumas de altas concentraciones proteicas es de suma importancia ya que pueden ser relacionados a la estabilidad de espumas alimentarias reales (Heil et al., 1990).

En este estudio se trabajó con soluciones de proteína al 2%, de ciertos polisacáridos al 0.5% y soluciones mixtas proteína-polisacárido (2%/0.5%).

Descripción del equipo

La determinación de la viscosidad aparente de las espumas se realizó utilizando un viscosímetro Brookfield DV-LVT con sensor en forma de T (spindle T-C). El equipo está acoplado a una computadora, de modo que el control de las experiencias se realiza por medio del software Dvloader y Wingather. Estos programas fueron utilizados para la programación de las condiciones de las experiencias (velocidad, intervalo de toma de datos, tipo de sensor utilizado) y para el registro de las mediciones.

Procedimiento experimental

Para la implementación del método se procede de la siguiente manera.

Previamente a la formación de la espuma, se prepara el dispositivo de medida y las condiciones en las que se realizará el experimento. Se seleccionan el programa de medición a utilizarse al viscosímetro y el programa para el registro de datos. Ya que las características de las espumas son fuertemente afectadas por la temperatura, todas las mediciones se realizan a temperatura

controlada. Para ello se utilizó un baño termostático Hakee, manteniendo el sistema a 19.7 °C. Se coloca una probeta especial graduada dentro de un recipiente por donde circula el líquido refrigerante y se sella el sistema para evitar pérdidas y asegurar un contacto total entre la superficie de la probeta y el líquido refrigerante.

Luego se debe ajustar la posición del sensor T, de modo que esté varíe su posición entre los 45 y 50 ml de la probeta graduada. Una vez realizados estos procedimientos el sistema se encuentra preparado para la medición.

La formación de la espuma se realiza según lo descrito anteriormente por batido durante 3 minutos. Luego de 1 minuto de formada la espuma, se toma con pipeta de punta truncada y se coloca en la probeta de medición, evitando la formación de huecos dentro de la misma. Se carga un volumen de espuma entre 75-80 ml, y se coloca dentro de la misma el sensor T. Luego se comienzan a registrar los datos, los cuales se realizan automáticamente para la medición de la viscosidad aparente y manualmente en el caso del volumen de espuma y el volumen drenado.

En la **Figura II.3.5** se muestra un esquema del dispositivo de medición utilizado.

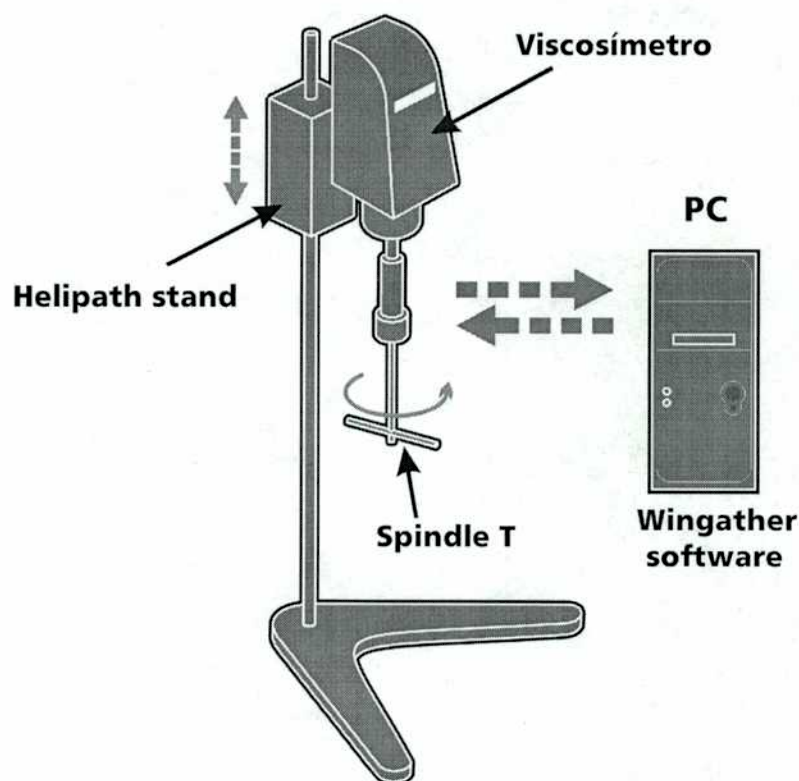


Figura II.3.5 Viscosímetro provisto de sensor tipo T (spindle T) acoplado al "helipath stand", que permite al sensor describir un movimiento helicoidal.

La probeta utilizada para el estudio de las espumas posee una geometría especialmente diseñada para medir simultáneamente las diferentes características de las espumas (**Figura II.3.6**). En su parte superior posee un diámetro de 36 mm, que permite el libre desplazamiento del sensor T-C (2,6 cm). Luego posee una parte cónica para la reducción del diámetro de la misma. La parte inferior (10 mm de diámetro) es utilizada para la medición del líquido drenado. La reducción en el diámetro respecto de la parte superior da mayor sensibilidad a la medición del volumen drenado y permite la utilización de menor cantidad de muestra. La probeta se encuentra termostatzada dentro de un tubo externo por el que circula un fluido termostatzado proveniente del baño. En todas las mediciones se utilizó una velocidad de giro del sensor T de 0,3 rpm.

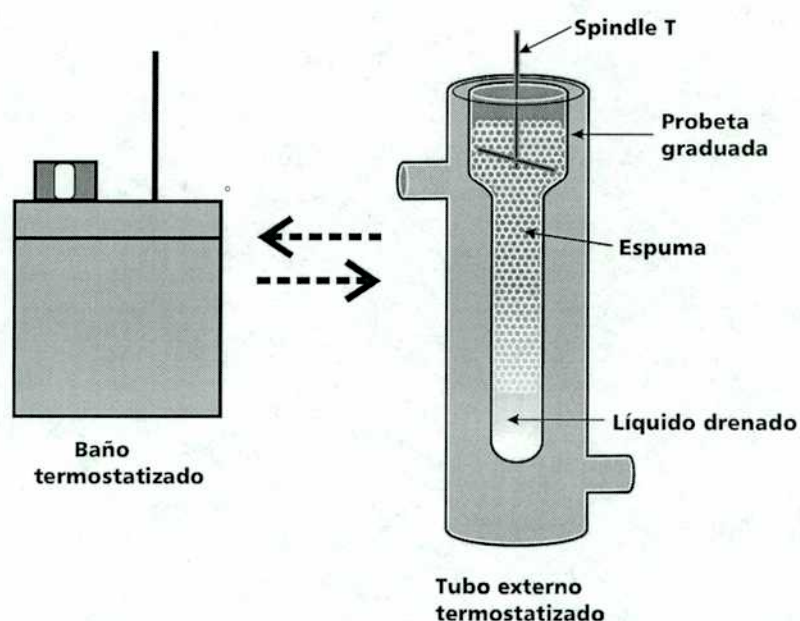


Figura II.3.6 Probeta especialmente diseñada para la medición simultánea de viscosidad aparente (por medio del spindle T conectado a viscosímetro), líquido drenado y volumen de espuma.

En la **Figura II.3.7** se muestran las curvas típicas obtenidas para la evolución de la viscosidad aparente de las espumas, el líquido drenado y el volumen de espuma en función del tiempo.

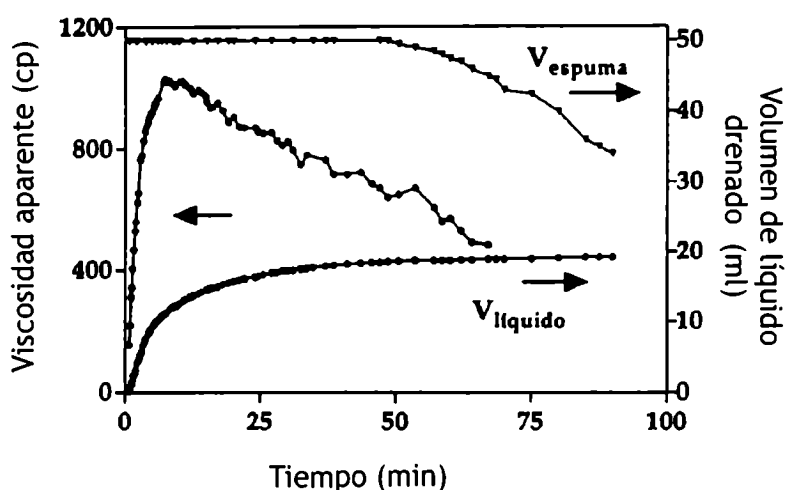


Figura II.3.7 Viscosidad aparente, líquido drenado y espuma colapsada en función del tiempo para una espuma proteica

II.3.3.5 Propiedades de espumado de polisacáridos

Debido a la relativamente baja capacidad de formación de espuma y estabilidad de las espumas formadas en presencia de polisacáridos solos, no fue utilizado el método reológico para la determinación de las velocidades de drenado y desproporción.

Para la evaluación de las características de las espumas en estos sistemas, se realizó la formación de espuma a partir de 40 ml de solución de los polisacáridos (0,5%), en una probeta de 3 cm de diámetro, obteniéndose la capacidad de espumado de la Ecuación II.3.13. Posteriormente, se registraron en la misma probeta los volúmenes de líquido drenado y descenso del volumen de espuma (colapso).

II.4

Resultados

PRIMERA SECCION

II.4.1 EFECTO DE LOS POLISACÁRIDOS EN MONOCAPAS DE β -LACTOGLOBULINA ESPARCIDAS SOBRE LA INTERFASE AIRE-AGUA

II.4.1.1 Características estructurales de las monocapas de β -lg en presencia de polisacáridos

Las características estructurales de las monocapas pueden ser obtenidas a partir del análisis de las isothermas π -A. Las isothermas π -A para la película de β -lg esparcida sobre una subfase acuosa a pH neutro puede observarse en la **Figura II.4.1.1**. En la misma se observan el ciclo de compresión y expansión de la monocapa de β -lg. Las monocapas de β -lg presentan una estructura líquido expandida (Rodríguez Patino et al, 2001a). En general, la presión superficial sube inicialmente en la isoterma de forma suave, se observa un aumento más pronunciado de la presión con la disminución en el área, a medida que se comprime la monocapa. En ensayos realizados por Rodríguez Patino et al. (2001a) se observaron presiones de colapso de alrededor de 29 mN/m. Debido a esto, en este ensayo no se aumentó la presión por encima de este valor (27-29 mN/m), ya que un aumento mayor podría ocasionar cambios irreversibles en la monocapas debido al colapso de la misma. Puede observarse en la **Figura II.4.1.1** una histéresis entre los ciclos de compresión-expansión. Este comportamiento no es debido a un fenómeno de pérdida de moléculas por desorción, sino que está asociada a procesos de reestructuración y organización de las moléculas en la interfase durante la expansión (Carrera Sánchez, 2000). Este fenómeno de histéresis que presentan las monocapas de proteína es mucho más notable que por ejemplo para sustancias de bajo peso molecular, debido a que la complejidad molecular y estructural de la proteína hace más lenta la reorganización de las monocapas. Los residuos de aminoácidos situados en la subfase interactúan entre sí provocando la formación de redes entre moléculas de manera que se dificulta la rápida recuperación de la estructura inicial. Durante la compresión de la monocapa se produciría un aumento del espesor de la misma, que durante la expansión permanece mayor al presentado inicialmente. La repetitividad de los ciclos de compresión-expansión realizados con un suficiente tiempo de espera entre cada uno (**Figura II.4.1.2**), es una prueba de que el fenómeno de histéresis observado no se debe a una pérdida de moléculas durante la compresión, sino a una reestructuración de la monocapa. De esta forma, la reorganización molecular es un proceso reversible, es decir, la monocapa vuelve a su estado inicial, siempre y cuando se deje transcurrir el tiempo suficiente (por ejemplo 30 min) antes de realizar otro ciclo de compresión-expansión.

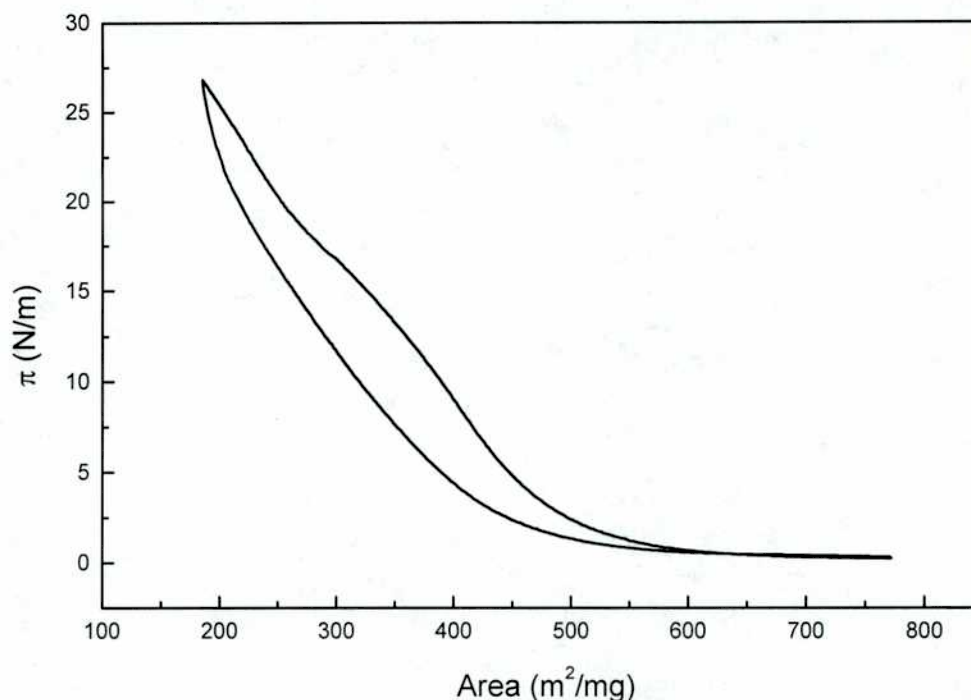


Figura II.4.1.1. Isoterma π -A de monocapa de β -lg esparcida en la interfase aire-agua. Se muestra en ciclo de compresión-expansión.

Según puede observarse en la **Figura II.4.1.2**, podría existir una presión y concentración superficial críticas en las que se produciría un cambio significativo en las propiedades del film. El valor de presión crítico es de aproximadamente 12 mN/m, y representa la transición entre una monocapa con una estructura más expandida (estructura 1) hacia una monocapa con una estructura más condensada (estructura 2). Sin embargo, de acuerdo a lo descrito por Graham & Phillips (1979b), la β -lactoglobulina retendría parcialmente elementos de su estructura nativa no desplegada totalmente durante el esparcimiento en la superficie aire-agua, incluso en la configuración más expandida (Rodríguez Patino et al., 2001a).

Cuando los polisacáridos con actividad superficial (PGA) fueron agregados en la subfase a una concentración de 0,05%, las isothermas π -A presentaron un corrimiento a mayores presiones superficiales con el tiempo, debido a la adsorción y penetración del polisacárido en la monocapa de β -lactoglobulina (**Figuras II.4.1.3-5**).

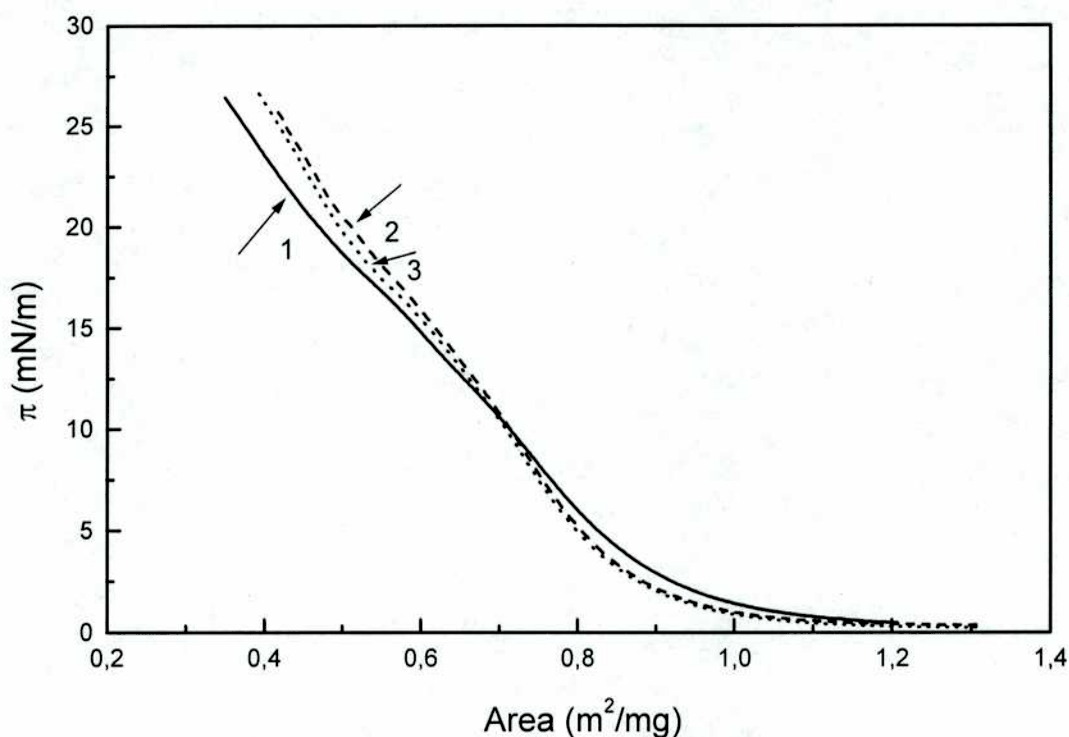


Figura II.4.1.2. Isotermas π -A de monocapas de β -lg esparcida en la interfase aire-agua a diferentes tiempos de adsorción, a 20 °C y pH 7. (1) 1h, (2) 2h, (3) 3h

La reproducibilidad de las isotermas luego de ciclos consecutivos de compresiones y expansiones fue seguida durante 18 a 22 hs, lo que indica que la adsorción y penetración de los PGA en la monocapa de proteína y su subsiguiente reacomodación es un proceso lento.

En presencia de los polisacáridos sin actividad superficial, se observaron diferentes resultados. La presencia de goma xántica produjo un notable corrimiento de la isoterma π -A a presiones más altas en las sucesivas mediciones realizadas a diferentes tiempos (**Figura II.4.1.6**). En presencia de λ -C sólo se observó una pequeña modificación en las isotermas respecto de la de β -lg sola (**Figura II.4.1.7**).

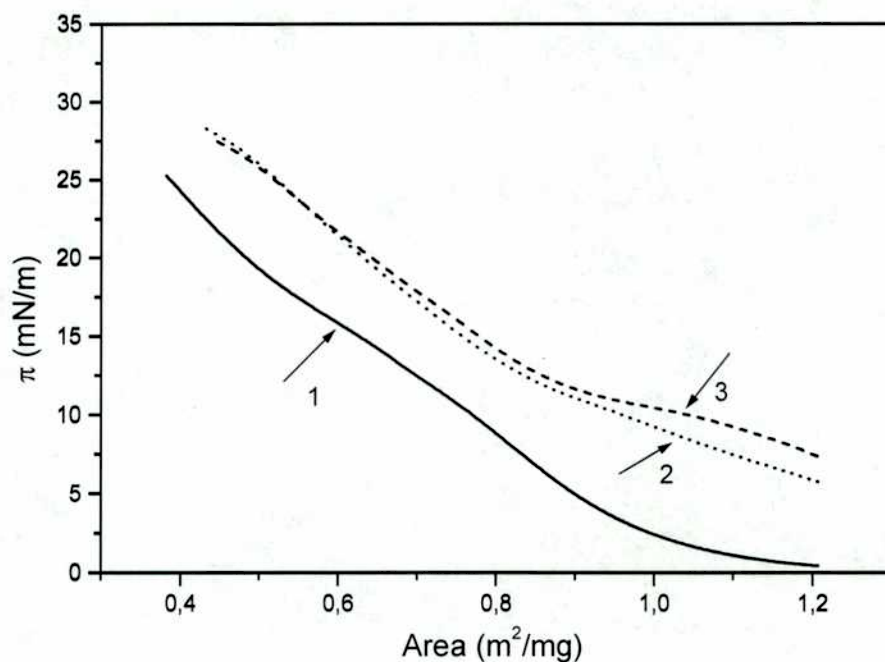


Figura II.4.1.3. Isothermas π -A de monocapas de β -lg esparcida en agua pura (1), y a diferentes tiempos luego del agregado de Kelcoloid 0 a la fase acuosa: (2) 16h, (3) 18h.

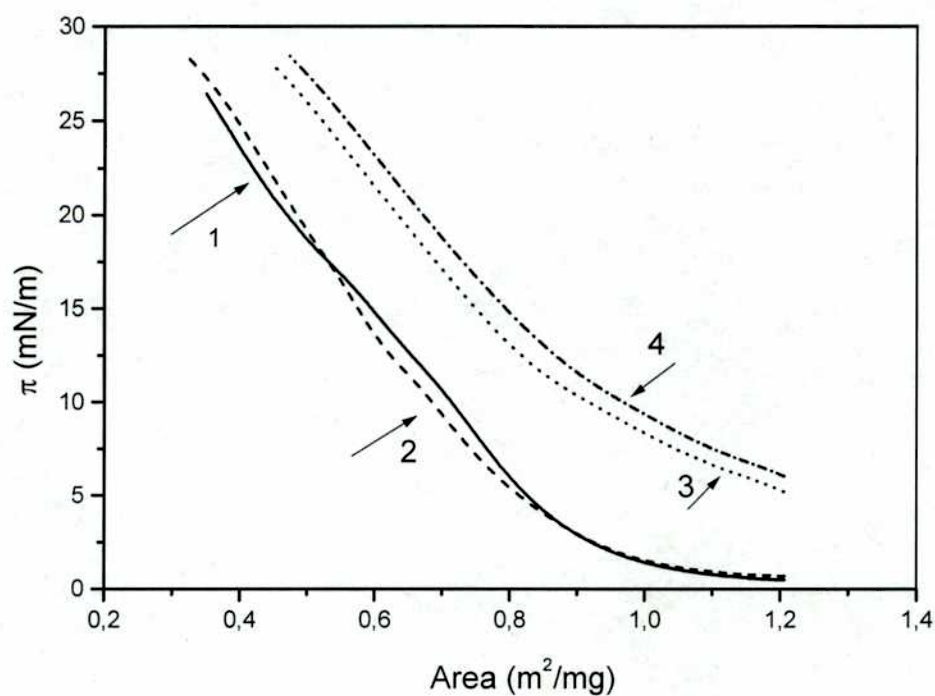


Figura II.4.1.4. Isothermas π -A de monocapas de β -lg esparcida en agua pura (1), y luego de diferentes tiempos del agregado de Kelcoloid LVF a la fase acuosa: (2) 2h, (3) 4h, (4) 22 h .

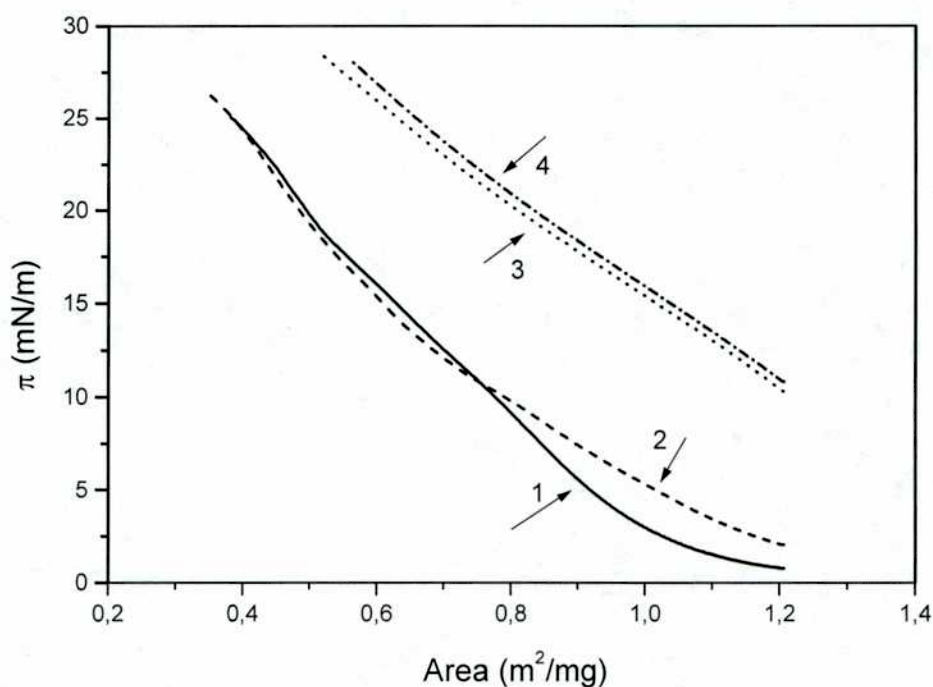


Figura II.4.1.5. Isotermas π -A de monocapas de β -lg esparcida en agua pura (1), y a diferentes tiempos luego del agregado de Manucol a la fase acuosa: (2) 1h, (3) 18h, (4) 22 h

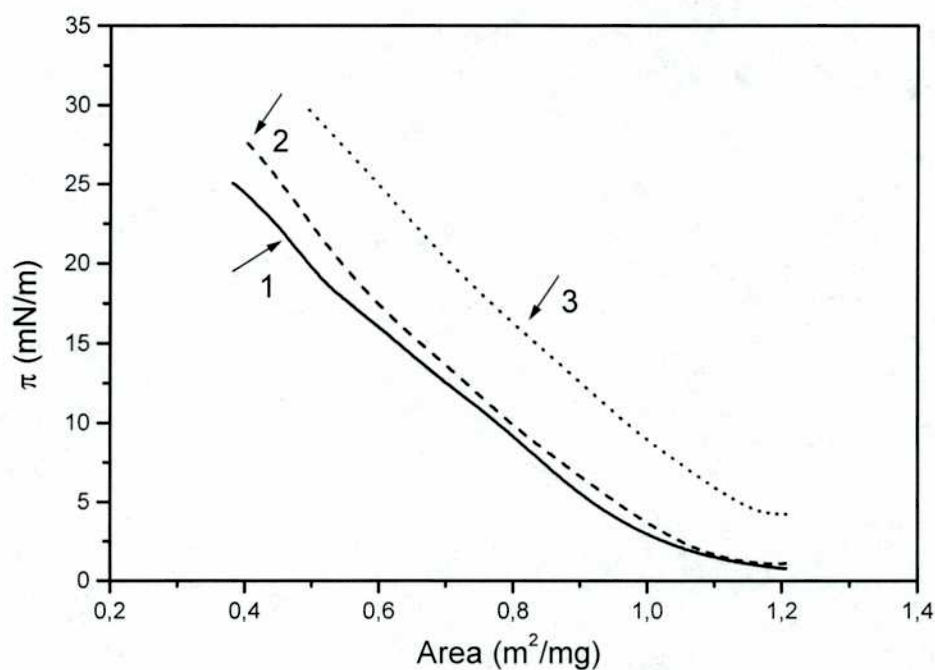


Figura II.4.1.6. Isotermas π -A de monocapas de β -lg esparcida en agua pura (1), y a diferentes tiempos luego del agregado de Xántica a la fase acuosa: (2) 1,5h, (3) 13h

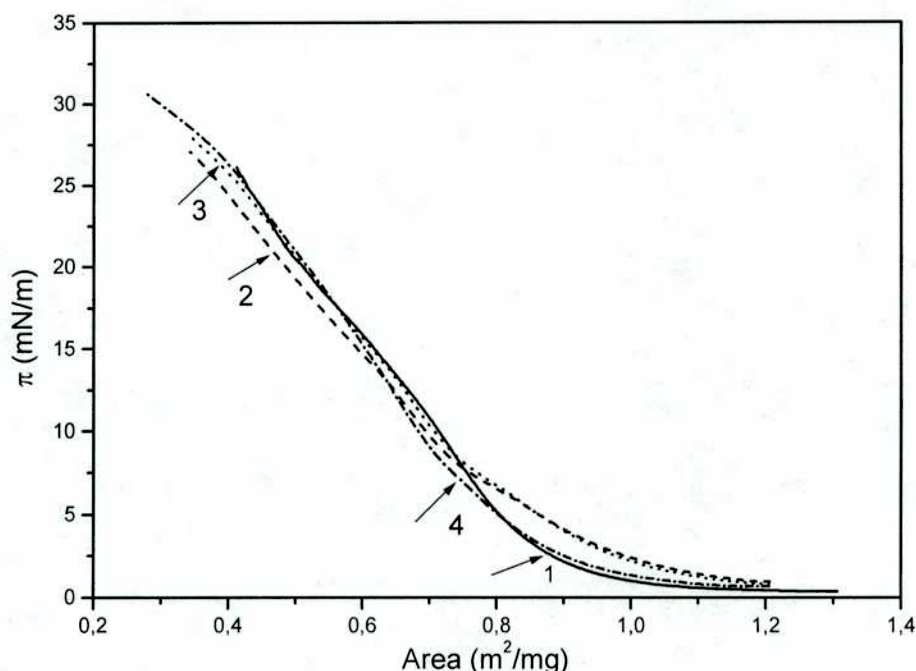


Figura II.4.1.7 Isothermas π -A de monocapas de β -lg esparcida en agua pura (1), y a diferentes tiempos luego del agregado de λ -C a la fase acuosa: (2) 0,5h, (3) 1,5h, (4) 5 h.

En la **Figura II.4.1.8** se muestran las isothermas π -A a tiempos máximos de adsorción (estado de pseudo-equilibrio de las isothermas π -A) para monocapas de β -lg y sistemas mixtos de β -lg + polisacáridos. Las isothermas π -A en presencia de PGA y goma xántica se encuentran separadas del eje de presiones superficiales, indicando una estructura de monocapa aparentemente menos condensada, debido a que en el cálculo de área molecular se asumió que sólo las moléculas de β -lg se encontraban esparcidas en la interfase. Considerando que las proteínas una vez en las interfase no se desorben (Carrera Sánchez, 2000) al adsorberse los PS con actividad interfacial el número de moléculas totales en la interfase podría ser mayor, lo cual redundaría en una menor área molecular. Entre los diferentes PGA, el Manucol Ester (MAN) mostró mayor actividad superficial, ya que indujo el mayor aumento en la presión superficial. El K-LVF y K-0 produjeron un aumento mucho menor en la presión superficial. Las diferencias entre estos dos PGA fueron mayores a valores bajos de área superficial, donde el K-LVF exhibió una actividad superficial levemente superior. A pesar de que la goma xántica no exhibe propiedades tensioactivas por sí sola, en sistemas mixtos con la β -lg se observó un comportamiento similar al mostrado por los PGA. A bajas áreas moleculares, XAN indujo mayores valores de presión superficial que con K-LVF o K-0. En

presencia de λ -C, se observó un leve aumento de las presiones superficiales a bajas áreas moleculares.

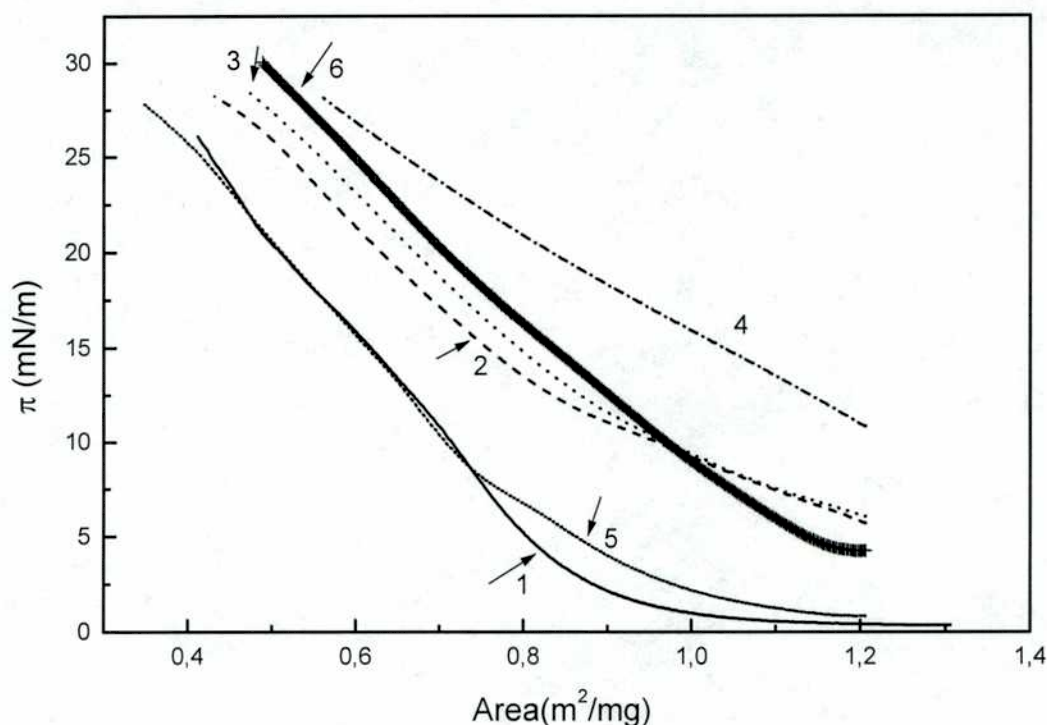


Figura II.4.1.8. Isotermas π -A de β -lg en estado de pseudoequilibrio (20 °C, pH 7). Se observan las isotermas de β -lg esparcida sobre (1) agua pura y sobre soluciones acuosas de (2) Kelcoloid 0, (3) Kelcoloid LVF, (4) Manucol ester, (5) λ -carragenano, (6) goma xántica

La elasticidad definida previamente a velocidad de deformación nula es una medida de la resistencia del film a un cambio de área y se calcula directamente de la pendiente de las isotermas π -A en el equilibrio (Luchasen y van den Tempel, 1972). Por lo tanto, un alto valor de elasticidad está asociado con un film de estructura fuertemente cohesiva. En la **Figura II.4.1.9 a-b** se muestra la elasticidad de monocapas de β -lg sola y sistemas mixtos en función de la densidad superficial o molecular. La elasticidad de la monocapa de β -lg sola muestra una fuerte dependencia con la densidad molecular de proteína en la superficie. La elasticidad aumenta con la densidad superficial, alcanza un máximo en el pasaje de las estructuras 1 a 2 y luego tiende a un valor constante a mayores áreas superficiales, en la zona de colapso de la monocapa, donde tiene lugar la formación de multicapas (Rodríguez Niño et al., 1999).

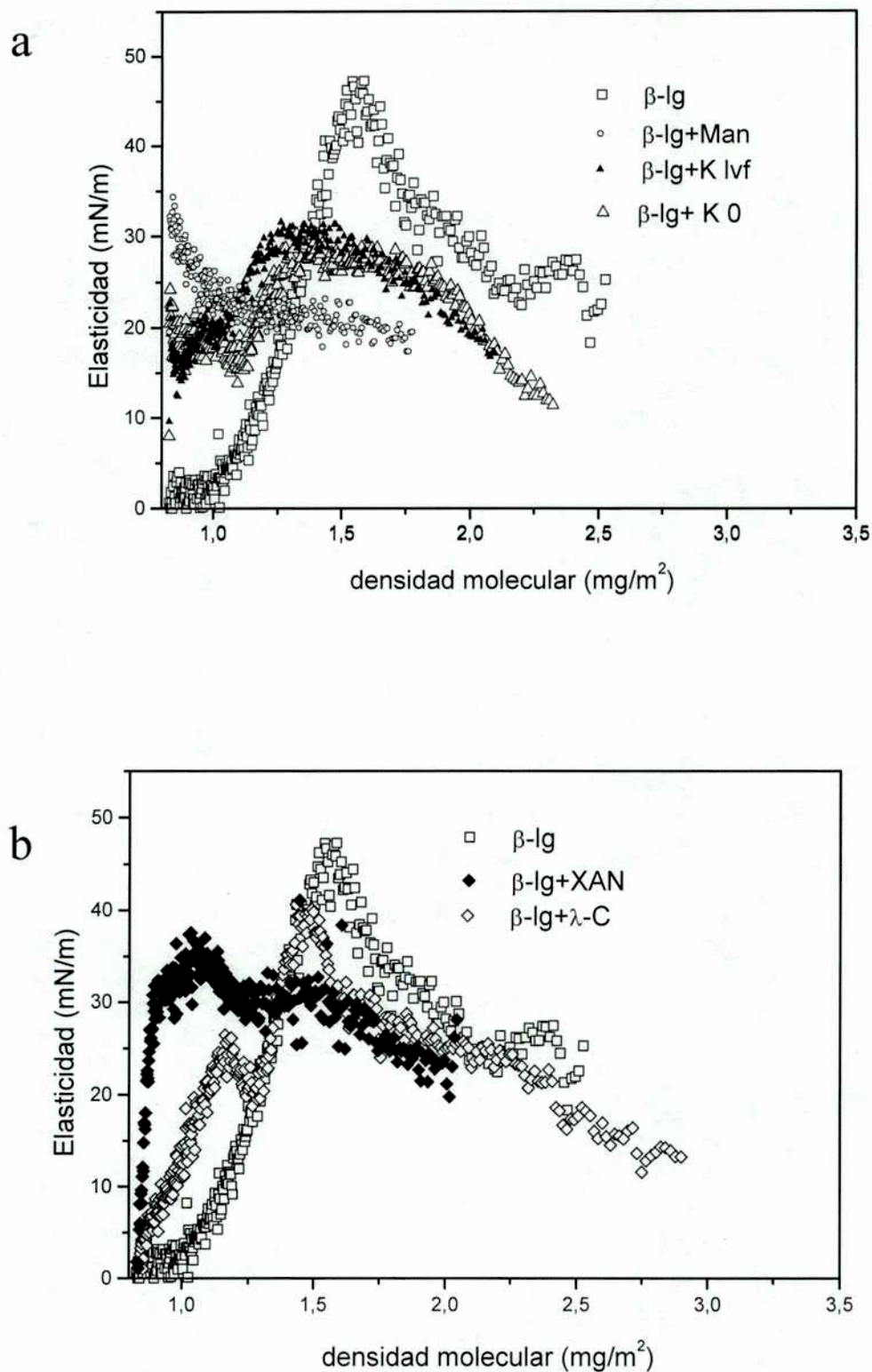


Figura II.4.1.9. Dependencia de la elasticidad con la densidad molecular, para monocapas de $\beta\text{-Ig}$ esparcidas sobre agua, y sobre soluciones acuosas de polisacáridos. (a) Polisacáridos con actividad superficial: K-0, K-LVF y MAN. (b) Polisacáridos sin actividad superficial: $\lambda\text{-C}$ y XAN

En presencia de los polisacáridos la elasticidad máxima del film disminuyó. Este efecto podría ser debido a la penetración de los polisacáridos en el film proteico y a las interacciones entre proteína y polisacárido que afectan la estructura de la monocapa de proteína.

La máxima elasticidad fue alcanzada a menores densidades moleculares en presencia de goma xántica, K-0 y K-LVF. En presencia de Manucol ester, la máxima elasticidad fue obtenida a los valores más bajos de densidad molecular, en la zona representada al comienzo de la gráfica de elasticidad. Este corrimiento observado hacia menores densidades superficiales sería por lo menos en parte aparente, como fue mencionado en el caso de las isothermas π -A, debido a que para la construcción de los gráficos sólo se tuvo en cuenta la densidad molecular de moléculas de proteína esparcidas en la interfase. Sin embargo la magnitud del corrimiento indicaría el grado de penetración de los polisacáridos en la monocapa de β -lg.

Una vez en la interfase, las moléculas de proteína presentan una gran estabilidad; sin embargo, la adsorción y penetración de los polisacáridos en la monocapa de proteína podría forzar la formación de lazos formados por segmentos de aminoácidos de la molécula de β -lg en la solución acuosa subyacente a la superficie, lo que podría resultar en un corrimiento de la transición entre las estructuras 1 y 2 hacia menores concentraciones superficiales. Los resultados obtenidos en presencia de Manucol ester sugieren que la proteína adoptaría una estructura de tipo 2 en presencia de este polisacárido, incluso a muy bajas densidades superficiales. Del mismo modo la goma xántica, a pesar de su carácter no tensioactivo, produce un corrimiento de la transición a menores densidades superficiales.

Al graficar la elasticidad en función de la presión superficial para la monocapa de β -lg sola y en sistemas mixtos (**Figura II.4.1.10 a-b**), se observa una evidencia más clara de los cambios de estructura de la monocapa y la elasticidad del film. En la **Figura II.4.1.10** pueden observarse las diferentes zonas de presión superficial que indican cambios en la estructura de la monocapa. La primera, a $\pi < 12$ mN/m, corresponde a la estructura 1, en la cual las moléculas de β -lg existen principalmente como filas con la mayoría de los segmentos de aminoácidos localizados en la interfase. La segunda región, entre $12 < \pi < 25$ mN/m corresponde a la estructura 2 y la última región se observa a $\pi > 25$ mN/m, en la que la monocapa colapsa (Rodríguez Patino et al., 2001a).

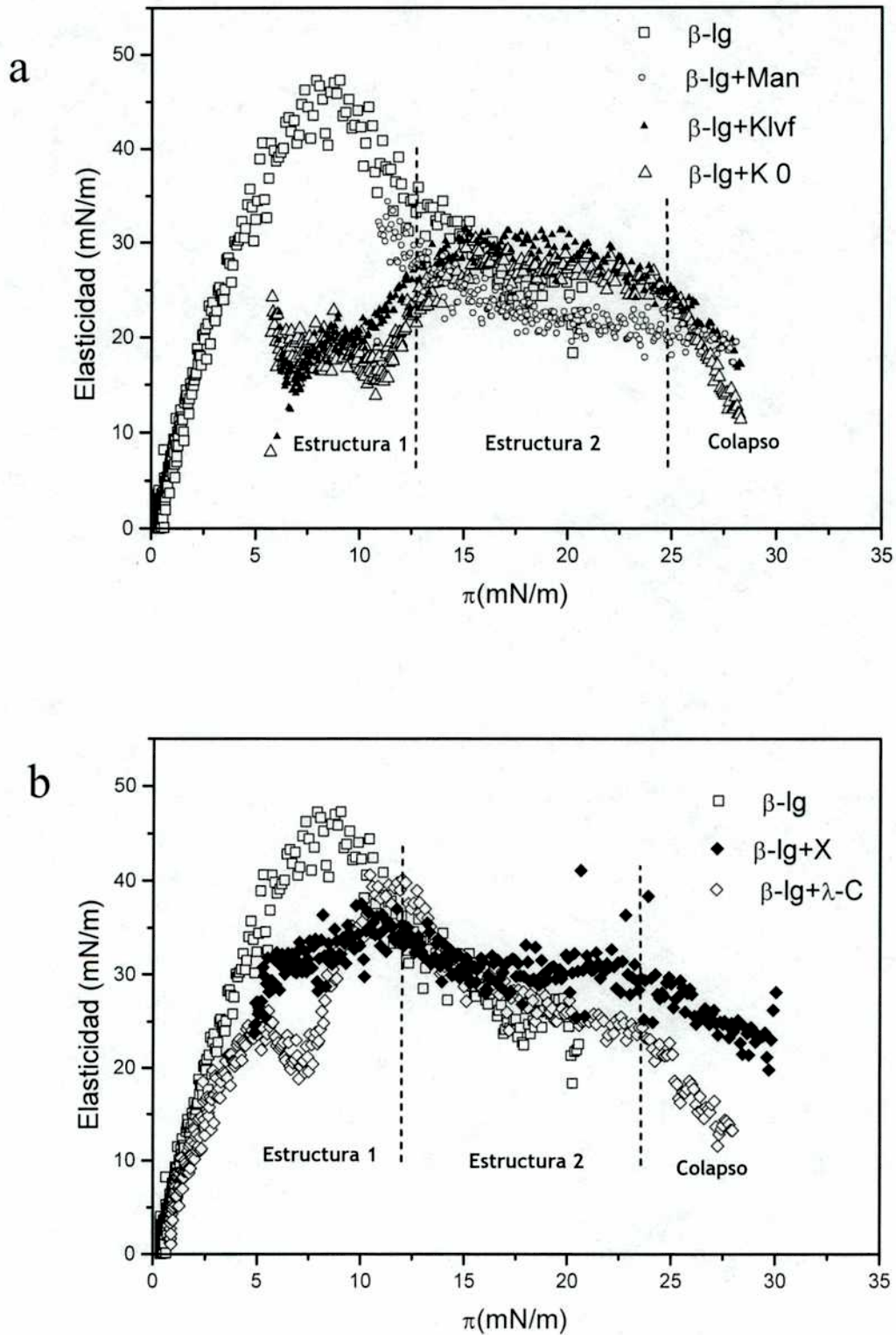


Figura II.4.1.10. Dependencia de la elasticidad con la presión superficial, para monocapas de β -lg esparcidas sobre agua, y sobre soluciones acuosas de polisacáridos. (a) Polisacáridos con actividad superficial: K-0, K-LVF y MAN. (b) Polisacáridos sin actividad superficial: λ -C y XAN

Una descripción más detallada de las estructuras que prevalecen en los distintos rangos de presiones superficiales se da a continuación: a presiones bajas, las moléculas de proteína adoptan una conformación más desplegada que la que presenta en solución, aunque esta desnaturalización o desplegamiento de la proteína es parcial, debido a la presencia de enlaces intramoleculares y a la gran cantidad de regiones estructuradas (hélice y lámina), lo que hace que mantenga gran parte de su estructura ordenada en la interfase. Esto da lugar a que incluso a presiones superficiales no tan elevadas aparezcan conformaciones de tipo lazo. Al aumentar la presión superficial se incrementa el número de lazos y colas, con lo que ocurre un pasaje de la estructura 1 a la 2 mencionado anteriormente. Un aumento mayor de la presión superficial produce el colapso de la monocapa, donde ocurre la formación de multicapas de proteína. En la **Figura II.4.1.11** se representan las estructuras descriptas en cada rango de presión superficial.

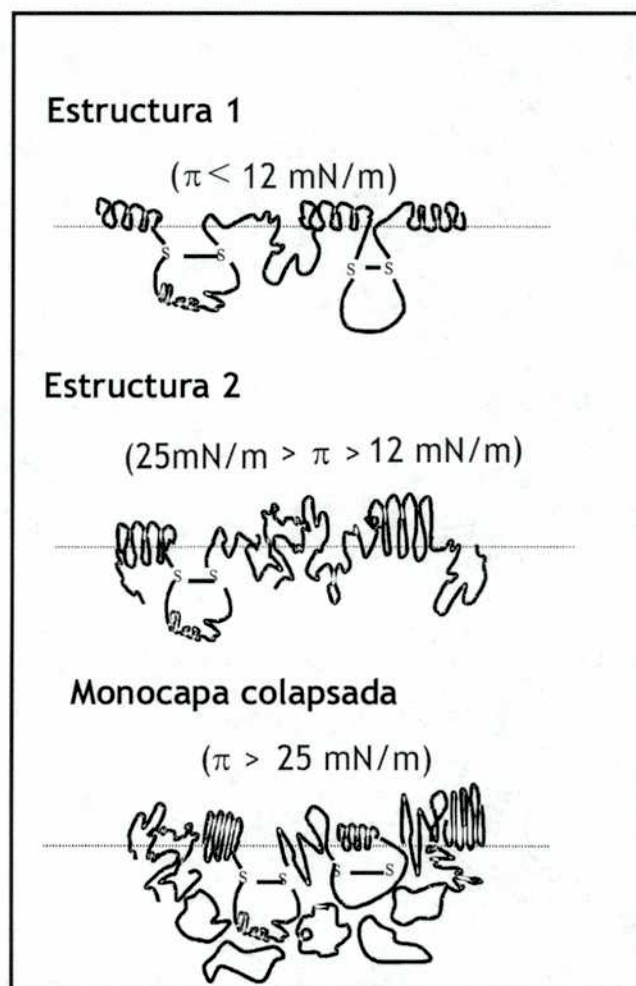


Figura II.4.1.11. Estructuras que presentan las monocapas de β -lg en distintos rangos de presión superficial

La **Figura II.4.1.10** muestra que el efecto de los polisacáridos prevalece a bajas presiones superficiales ($\pi < 12$ mN/m). En esta región la elasticidad del film se redujo hasta en un 50 % en presencia de K-0 y K-LVF (**Figura II.4.1.10 a**). Este efecto puede ser debido a la penetración del polisacárido en el film proteico, interfiriendo en las posibles interacciones entre segmentos de aminoácidos de la proteína. En la región en donde la proteína adopta la estructura 2 ($12 < \pi < 25$ mN/m), la elasticidad es menor y se observan menos diferencias entre los sistemas (la elasticidad varió entre 20 y 30 mN/m). Por encima de 25 mN/m, en la región de colapso de la monocapa, la elasticidad tiende a disminuir, en presencia de todos los polisacáridos.

II.4.1.2 Características superficiales dilatacionales

Resulta de especial interés el estudio de las propiedades reológicas de las películas de proteína,, debido a que la disminución en la tensión interfacial causada por la adsorción de la misma no explica la alta estabilidad que presentan los sistemas dispersos estabilizados por proteínas. La explicación a este fenómeno radica en que estas monocapas poseen una alta viscoelasticidad capaz de soportar grandes esfuerzos debido a interacciones intermoleculares complejas que brindan gran rigidez a la película (Sarker et al., 1995).

Los valores de módulo dilatacional complejo (no mostrado) fueron muy similares a los de la elasticidad dilatacional (E_d), lo que confirma el carácter fuertemente elástico de los films. La elasticidad dilatacional (E_d) de la monocapa de β -Ig sola mostró un comportamiento similar al reportado previamente por Rodríguez Patino et al (2001a), mostrando un aumento con la presión superficial hasta un máximo que ocurre cerca del valor de presión superficial al cual la monocapa colapsa (**Figura II.4.1.12 a**).

La presencia de λ -C en la subfase modificó levemente la elasticidad dilatacional de la monocapa, observándose una pequeña disminución de E_D a bajas presiones superficiales y cerca del punto de colapso. En presencia de PGA se observó una disminución importante de E_D en todo el rango de presiones superficiales, siendo el manucol ester el que produjo el mayor descenso en el carácter elástico del film especialmente a altas presiones superficiales. La goma xántica mostró un fuerte efecto, produciendo la mayor disminución en E_D , principalmente a presiones superficiales menores a 20 mN/m.

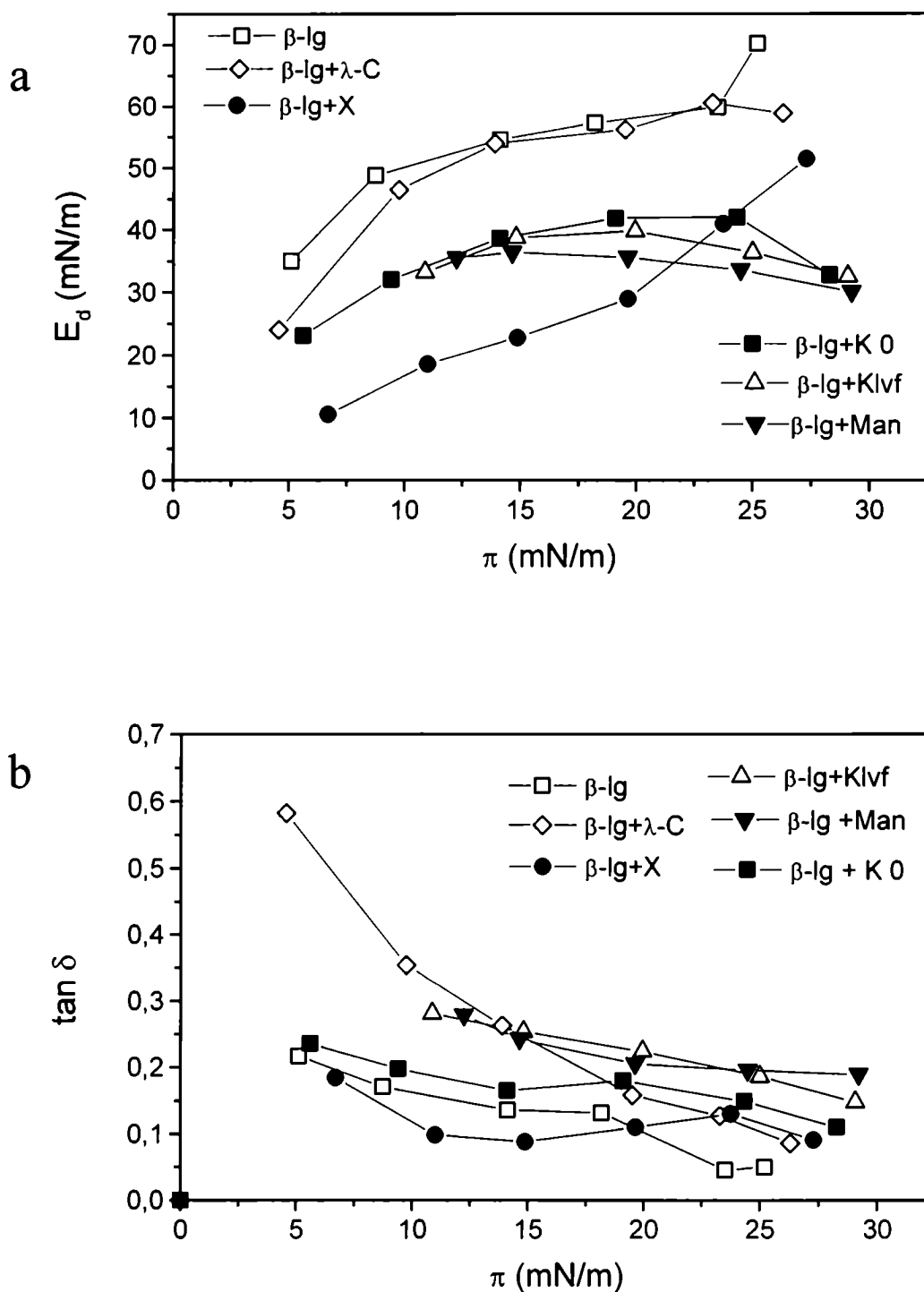


Figura II.4.1.12. Dependencia de los parámetros superficiales dilatacionales con la presión superficial, en monocapas de β -lg esparcida sobre agua pura y sobre soluciones acuosas de polisacáridos. (a) Módulo superficial dilatacional (E_D), (b) Tangente del ángulo de pérdida ($\tan \delta$)

La monocapa de β -lg presenta alta viscoelasticidad, con una tangente de ángulo de pérdida ($\tan\delta$) entre 0,05 y 0,2 (**Figura II.4.1.12 b**). Estos bajos valores indican un carácter sólido tipo gel de las monocapas (Tung y Dynes, 1982). $\tan\delta$ disminuyó con un incremento en la presión superficial, en concordancia con la existencia de fuertes interacciones proteína-proteína con el aumento en la concentración superficial de proteína. Excepto para la goma xántica a bajas presiones superficiales, la presencia de los otros polisacáridos disminuyó la viscoelasticidad de las películas. Entre los PGA, K-0 fue el que menos afectó el carácter viscoelástico de la monocapa y MAN y K-LVF mostraron un comportamiento similar entre sí.

Los polisacáridos sin actividad superficial mostraron un efecto opuesto en el carácter viscoelástico del film. A bajas presiones superficiales (en la región donde la proteína adopta la estructura 1), el λ -C disminuyó notablemente la viscoelasticidad. Contrariamente, la goma xántica produjo un aumento en este parámetro. La fluidificación del film en presencia de λ -C puede ser atribuida al gran aumento en la componente viscosa del módulo dilatacional complejo en el sistema mixto en comparación a la proteína sola. Sin embargo, en presencia de xántica se produjo una gran disminución en la componente viscosa del módulo, resultando en un aumento en el carácter elástico del film.

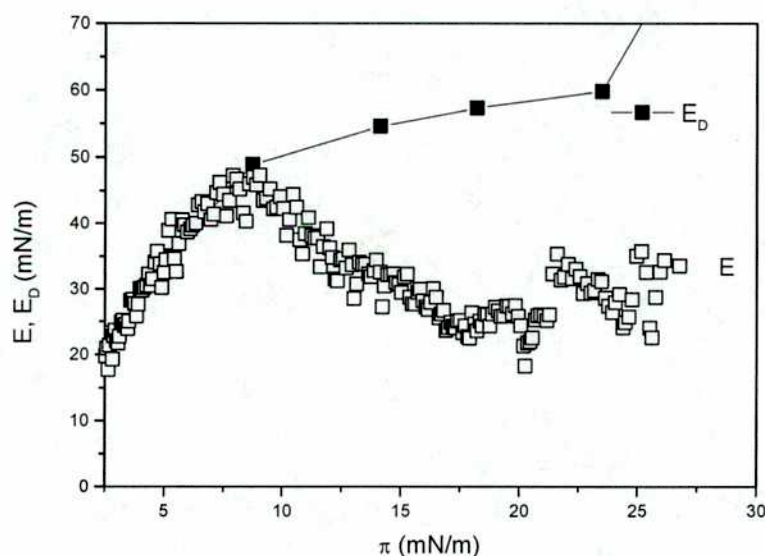
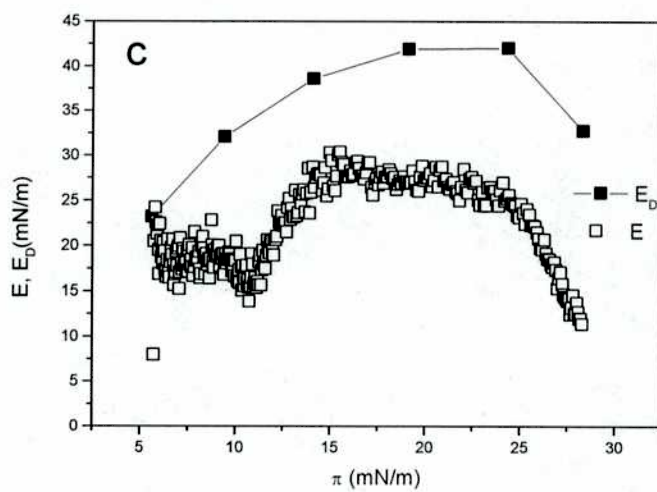
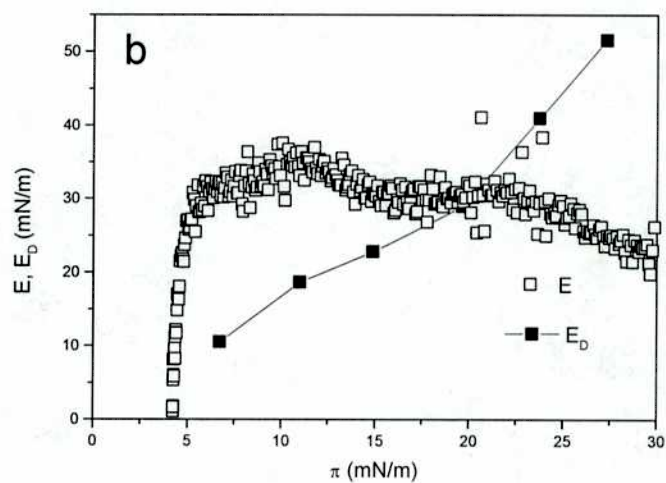
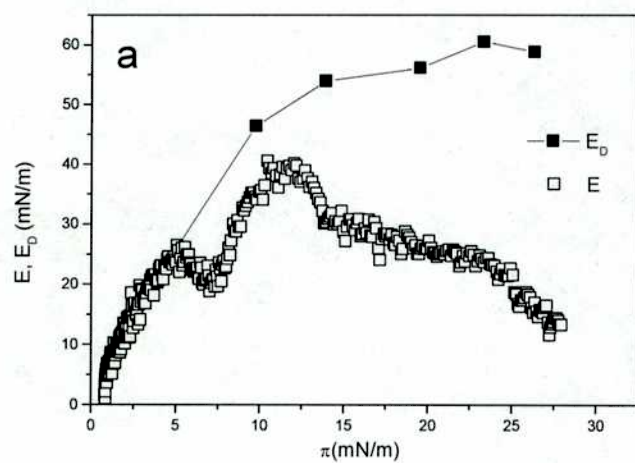


Figura II.4.1.13 Comparación entre los valores del módulo dilatacional superficial (E_D) y elasticidad (E) en función de la presión superficial para monocapa de β -lg esparcida sobre agua pura

En la **Figura II.4.1.13** se muestra una comparación de los gráficos obtenidos para los parámetros Elasticidad, E (calculado a partir de las isothermas π -A) y el módulo elástico superficial E_D para la monocapa de β -lg sola. Se observa que los valores de E siguen la misma tendencia que el módulo de elasticidad a valores bajos de presión superficial. A partir de los 10 mN/m se produce un aumento de E_D respecto de la Elasticidad. A mayores presiones superficiales la monocapa presenta mayor rigidez por un fuerte empaquetamiento de las moléculas de proteína, mostrando un constante incremento de E_D con la presión superficial. Esto indicaría una fuerte relación de este parámetro con el carácter sólido y rigidez del film. La elasticidad E a presiones superficiales mayores a 10 mN/m se vería disminuida debido a que la fuerte interacción existente entre las moléculas de proteína haría difícil la recuperación del sistema hacia los estados iniciales, en donde las moléculas se encuentran más desplegadas o expandidas en la superficie.

Una comparación entre los valores de elasticidad y módulo elástico dilatacional para las monocapas de proteína en presencia de polisacáridos se muestra en la **Figura II.4.1.14**. En presencia de los polisacáridos sin actividad interfacial (λ -C y XAN) se observa un aumento constante de E_D , mientras que la elasticidad E presenta un máximo a presiones superficiales alrededor de 10 mN/m y luego disminuye a mayores presiones, de la misma forma que lo observado en la monocapa de β -lg (**Figura II.4.1.14 a-b**). En presencia de estos polisacáridos se produciría un aumento en el grado de empaquetamiento de la proteína causada por efectos de volúmenes de exclusión e incompatibilidad entre los polisacáridos disueltos en subcapas próximas a la interfase y la proteína adsorbida. Esto produciría un aumento en el carácter sólido de la monocapa de β -lg con la presión interfacial (aumento en E_D) por una mayor interacción entre las moléculas en la interfase, lo que a su vez provoca la pérdida de elasticidad (disminución en E) a altas presiones superficiales debido al fuerte empaquetamiento y a la pérdida de movilidad de las moléculas en la interfase por la relativamente alta viscosidad de la subfase.

En presencia de los polisacáridos con actividad interfacial (**Figura II.4.1.14 c-e**) no se observan diferencias significativas en la forma de las curvas de E y E_D . A medida que aumenta la presión superficial se observa un aumento de E_D y E debido a la condensación de la monocapa. La posterior disminución en ambos parámetros estaría relacionada a la disminución en el grado de interacción entre las moléculas de proteína debido probablemente a la penetración de los polisacáridos o complejos polisacárido-proteína en la interfase, lo que disminuiría la viscoelasticidad del film. En el caso del Manucol (**Fig. II.4.1.13**) ambos parámetros disminuyen en todo el rango de presiones superficiales.



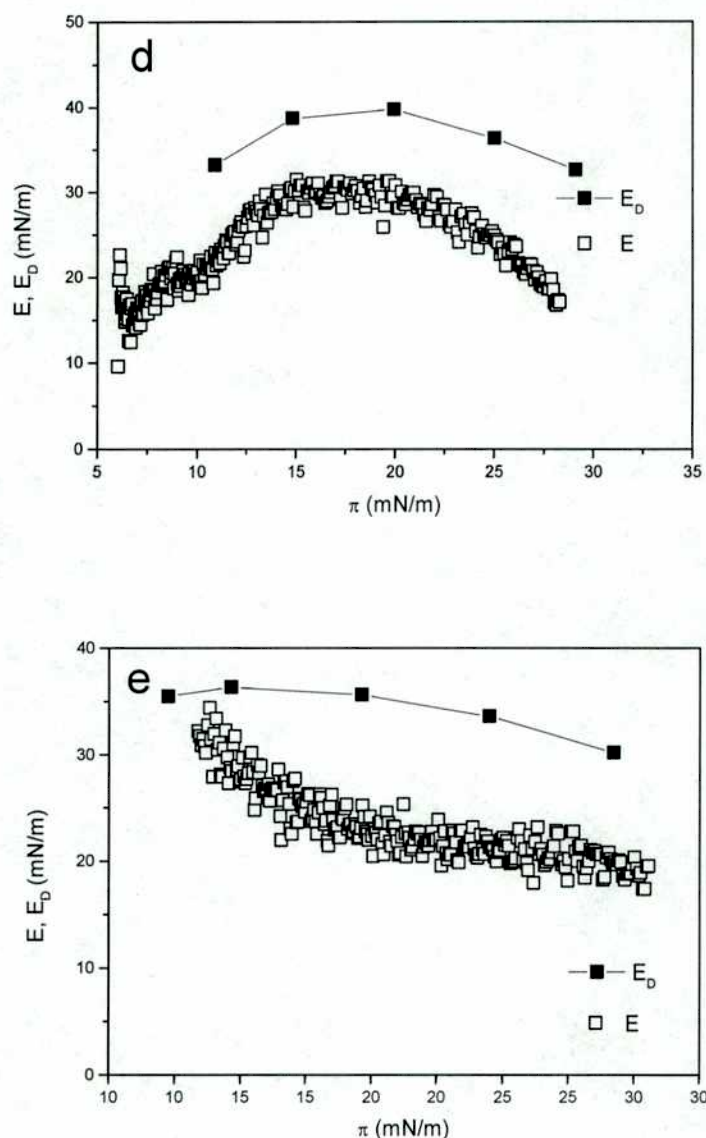


Figura II.4.1.14. Comparación entre los valores de módulo dilatacional superficial (E_D) y elasticidad de Gibbs (E) en función de la presión superficial para monocapa de β -Ig esparcida sobre soluciones acuosas de polisacáridos. (a) λ -carragenano, (b) goma xántica (c) Kelcoloid 0, (d) Kelcoloid LVF, (e) Manucol ester

II.4.1.3 Discusión

Los resultados obtenidos revelan el gran efecto de los polisacáridos en las monocapas de β -Ig, incluso de los que no poseen actividad superficial. Para explicar los efectos observados, deben considerarse los siguiente fenómenos: (1) la habilidad de los polisacáridos para adsorberse en la interfase y aumentar la presión superficial, (2) la posibilidad de que ocurra complejamiento con la proteína adsorbida en la interfase y (3) la existencia de una limitada compatibilidad termodinámica entre proteína y polisacáridos.

La fijación de los polisacáridos en el film superficial puede ocurrir por los mecanismos (1) o (2), dependiendo de la estructura química de los polisacáridos y el pH del medio. Una vez que los polisacáridos han penetrado o se han complejoado en la interfase, los fenómenos de volúmenes de exclusión entre ambos biopolímeros a pH neutro podría llevar a una aumento en el potencial químico o actividad termodinámica de la proteína en la interfase (Pavlovskaya et al., 1993). Por lo tanto, la proteína en la superficie podría comportarse como si estuviera más concentrada (con una estructura más condensada), llevando a un aumento en la presión superficial de acuerdo a los resultados de la **Figura II.4.1.8**. Ha sido demostrado que la adición de goma xántica en soluciones de proteína de soja a pH neutro tiene un efecto similar al observado con un aumento en la concentración de proteína (Carp et al., 1999), derivado del efecto de volúmenes de exclusión. La presencia de ciertas zonas de la proteína en interacción electrostática con xántica o λ -C o la penetración de los PGA en la interfase, interfieren en las interacciones entre moléculas de β -lg en la película resultando en una disminución en las propiedades reológicas superficiales (**Figura II.4.1.12**). La disminución en la elasticidad a $\pi < 12$ mN/m, donde la β -lg adopta el estado 1 y la disminución en la elasticidad dilatacional en todo el rango de presiones revela la disminución en el grado de asociación de la proteína en la interfase. Además, el aumento en la fluidificación del film (aumento en $\tan\delta$) es consistente con la existencia de menores interacciones entre proteína-proteína en presencia de polisacáridos.

Films de β -lg esparcida en soluciones acuosas de polisacáridos sin actividad superficial

La adsorción de la xántica y λ -C en la interfase es improbable. La xántica no causa una disminución en la tensión superficial (Carp et al., 2001), lo que resulta consistente con resultados reportados previamente (Yilmazer et al., 1991), y el λ -C se comporta de forma similar. Este comportamiento será descrito en secciones siguientes donde se estudiará la cinética de adsorción en la interfase aire-agua a partir de soluciones acuosa. Por lo tanto, la modificación en la presión superficial y en las propiedades reológicas de la monocapa de proteína sugieren la participación de la xántica y el λ -C en la interfase mediante el mecanismo (2).

En las condiciones de pH en las que se realizó el estudio (pH neutro), se espera una repulsión electrostática entre los distintos biopolímeros en solución. La β -lg se encuentra cargada negativamente y la goma xántica es un polisacárido con cadenas laterales de fuerte carácter aniónico que consisten en unidades de α -D-manosa, β -D-acido glucurónico y piruvato, que se encuentran periódicamente unidas a la cadena de celulosa principal. Por otro lado, el λ -carragenano es un polisacárido altamente sulfatado, con lo que se encuentra cargado negativamente a pH 7. En el seno de la solución, las propiedades de los sistemas mixtos obtenidos al mezclar

soluciones de proteínas del suero con xántica o λ -C parecen estar gobernadas por fenómenos segregativos o de limitada compatibilidad (Sánchez et al., 1997). Sin embargo, pueden ocurrir interacciones atractivas locales entre zonas cargadas opuestamente en los biopolímeros. Cuando la proteína se encuentra adsorbida en la interfase las interacciones entre los biopolímeros son diferentes que en el seno de la fase debido a una alteración en la conformación de la proteína en la interfase.

Resultados reportados previamente dan clara evidencia de interacciones sinérgicas entre goma xántica y proteínas de soja en la interfase aire-agua, según lo observado en mediciones de viscosidad superficial de corte de las películas y análisis electroforético de la agregación proteica en la interfase (Carp et al., 1999b). Una posible interpretación de estos resultados es que la goma se adsorbe sobre la proteína, formando una estructura combinada con una película primaria de proteína en contacto con la fase gaseosa. Según esta hipótesis, la tensión superficial de este film estaría dominada por la película de proteína, mientras que la presencia del polisacárido adsorbido sobre la proteína se vería reflejado en las propiedades reológicas del film. Sin embargo, el gran incremento observado en la presión interfacial en presencia de xántica puede ser tomado como una evidencia del “efecto concentración” (condensación de la estructura de la monocapa de β -lg) derivado de la incompatibilidad termodinámica entre los biopolímeros en solución. Esta asociación de la proteína con la xántica a través de ciertas regiones de la molécula modificaría la asociación entre las moléculas proteicas en la interfase con la consiguiente disminución en la elasticidad y módulo elástico dilatacional de las monocapas.

Una de las propiedades más importantes que diferencian a los carragenanos de otros hidrocoloides es su habilidad para complejarse o interactuar con proteínas lácteas. Los polisacáridos sulfatados forman complejos reversibles con proteínas, incluso a pH neutro (Dickinson, 2003). Un resultado interesante obtenido en este estudio fue que el λ -C es el polisacárido que presenta el menor efecto en la estructura y propiedades reológicas de la monocapa de β -lg, pero contrariamente, produce una fluidificación del film (aumento en $\tan \delta$).

Films de β -lg esparcida sobre soluciones de polisacáridos con actividad superficial

Como resultado de la adición de grupos ester, el alginato de propilenglicol reduce la tensión superficial del agua. La penetración de PGA en la monocapa proteica de acuerdo al mecanismo (I) podría reducir las interacciones proteína-proteína, lo que explicaría los menores valores de elasticidad superficial dilatacional obtenidos.

Un aumento en el grado de esterificación reduce el carácter hidrofílico de las moléculas e imparte mayores propiedades tensioactivas. Los PGA también se diferencian en sus viscosidades (Tabla II.4.1.1). La viscosidad desarrollada por estos polisacáridos en solución está directamente relacionada a su peso molecular (Imeson, 1992). Cuando se evaluaron las propiedades

tensioactivas de los diferentes PGA en ausencia de proteína (como se verá en la siguiente sección), la actividad superficial de los mismos presentó el siguiente orden: K-0>MAN>K-LVF. La mayor actividad superficial presentada por el K-0 es consistente con el alto grado de esterificación y menor viscosidad (menor peso molecular) que presenta este polisacárido. Por otro lado, el K-LVF presentó menores propiedades tensioactivas, debido al menor grado de esterificación y mayor viscosidad.

Tabla II.4.1.1 Grado de esterificación y viscosidades de los distintos PGA utilizados

PGA	Grado de esterificación	Viscosidad	
MAN	Alto	Alta	(11,8 cp)
K-LVF	Medio	Alta	(13,9 cp)
K-0	Alto	Baja	(4,7 cp)

*viscosidad evaluada a 60 s^{-1} en soluciones al 0.5 % p/p

Cuando la β -lg se encuentra adsorbida en la interfase, el orden de efectividad en aumentar la presión superficial mostrado previamente (**Figuras II.4.1.3-5** y **Fig.II.4.1.8**) fue: MAN>K-LVF>K-0. Este resultado no puede ser atribuido solamente al grado de esterificación, y necesariamente pone en juego el rol de la viscosidad o peso molecular de cada uno de estos polisacáridos en el efecto observado, relacionado al grado de incompatibilidad con la proteína. Es esperable una disminución en la compatibilidad entre los biopolímeros con el aumento en el peso molecular de los polisacáridos (Schmitt, et al., 1998).

De acuerdo a esto, los diferentes efectos de los PGA en las isothermas π -A pueden ser explicados de la siguiente forma: el gran aumento en la presión superficial causado por el manucol ester debería ser atribuido a su alto grado de esterificación, que le permite penetrar en la interfase con mayor efectividad. Además, debido a su alta viscosidad/peso molecular, forzaría una concentración de la proteína en la interfase debido a fenómenos de volúmenes de exclusión. Sin embargo, no debe descartarse la posibilidad de que ocurra un complejamiento entre este polisacárido y la proteína en la interfase. Ahamed & Dickinson (1991) sugirieron la posibilidad de formación de complejos electrostáticos entre PGA y proteínas de la leche (principalmente caseínas) a pH neutro.

A pesar de que el K-0 posee un alto grado de esterificación similar al manucol ester, su menor viscosidad (menor peso molecular) contribuiría en menor medida a concentrar la proteína en la interfase.

El hecho de que todos los polisacáridos, con o sin actividad superficial, causen la transición hacia la estructura 2 a menores presiones superficiales es una evidencia de la existencia de fenómenos de volúmenes de exclusión en la interfase. De otro modo, los polisacáridos sin actividad superficial solo modificarían la reología del film interfacial sin afectar la presión superficial.

SEGUNDA SECCIÓN

II.4.2. PROPIEDADES INTERFACIALES DE β -LG Y POLISACÁRIDOS ESTUDIADAS POR TENSÍOMETRÍA DE GOTA Y SU RELACIÓN A LAS PROPIEDADES DE ESPUMADO

II.4.2.1 Propiedades interfaciales de la β -lactoglobulina sola

II.4.2.1.1 Dinámica de adsorción de la β -lg en la interfase aire-agua

En la **Figura II.4.2.1** se muestra la evolución de la presión superficial en función del tiempo de adsorción para monocapas de β -lg formadas a partir de concentraciones del 0,1 al 2% en el seno de la solución, a 20 °C y pH 7. El incremento en la presión superficial está asociado a la adsorción de las moléculas de proteína en la interfase (Damodaran & Song, 1988, Graham & Phillips, 1979c). El rápido aumento inicial de la presión superficial por la difusión de moléculas de proteína a la interfase, es seguido por una etapa más lenta, controlada por la penetración, desplegamiento y reacomodación de las moléculas adsorbidas. En los sistemas con concentración mayor a 0,1% se observa un aumento inicial de la presión mucho mayor y una estabilización de los valores de presión a tiempos más cortos. Como es de esperar, los valores máximos de presión se obtienen para las soluciones de mayor concentración de proteína (2%).

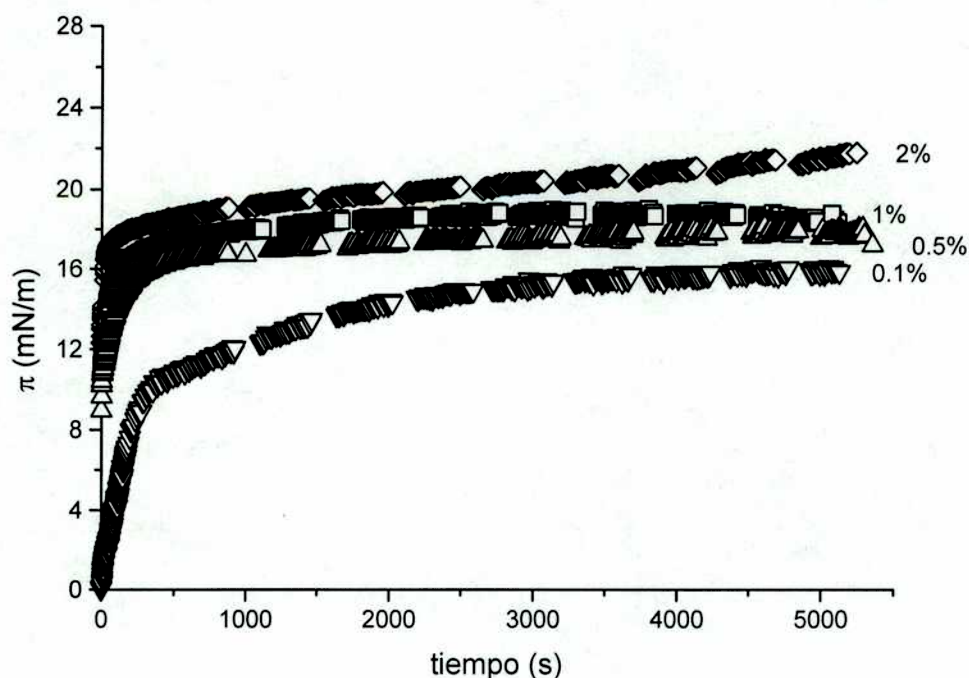


Figura II.4.2.1 Evolución de la presión superficial con el tiempo de adsorción para soluciones de β -lg de diferente concentración.

Los resultados están de acuerdo en forma cualitativa con otros estudios realizados en proteínas globulares (Benjamins et al., 1996). En la etapa de adsorción de la proteína posterior a la rápida difusión inicial, la velocidad del proceso depende de la habilidad de las moléculas de proteína para crear espacio en el film existente y penetrar y reacomodarse en la interfase. Las moléculas de proteína deben vencer la barrera electrostática existente debido a la presencia de otras moléculas adsorbidas en la interfase (Rodríguez Patino et al., 1999a).

El valor máximo de presión interfacial obtenido en el sistema con 0,1 % de proteína fue de alrededor de 14 mN/m, cercano al valor determinado en la sección anterior como el valor de transición entre las estructuras 1 y 2, mientras que el valor máximo con 2% de proteína (23 mN/m) se aproximó más al valor de colapso de la monocapa, lo que indica la formación de una monocapa más condensada a mayores concentraciones de proteína. El valor de presión de equilibrio obtenido a los 5000 s de adsorción (22,1 mN/m) a pH neutro, coincide con los valores de presión superficial de equilibrio reportados previamente para monocapas de β -lg a pH 6,3 (23 mN/m), luego de aproximadamente 6000 s de adsorción (Waniska & Kinsella, 1985).

Se ha observado que el efecto de una mayor concentración de proteína al reducir la tensión superficial de la solución, se refleja en la obtención de burbujas de menor tamaño y en una mejora en la estabilidad de la espuma. Además, a mayores concentraciones de proteína se promueve la formación de multicapas, lo que aumenta la estabilidad de las espumas formadas por proteínas globulares (Rodríguez Patino et al., 1995) debido a un aumento en el espesor de la película. La estabilidad de las espumas depende en gran medida de las propiedades reológicas del film interfacial (Rodríguez Patino et al., 1995).

II.4.2.1.2 Propiedades reológicas de películas de β -lg

En la **Figura II.4.2.2** se muestra la elasticidad dilatacional (G') obtenida a partir de los ensayos oscilatorios dilatacionales realizados en soluciones de concentración de β -lg entre 0,1 y 2%.

Cuando la concentración de proteína fue menor al 1% en el seno de la solución, no se observó un desarrollo o aumento del módulo elástico durante la adsorción de la proteína en la interfase (**Figura II.4.2.2**). En la solución al 2% se observó un aumento de G' con el tiempo de adsorción, presentando inicialmente una mayor pendiente y luego disminuyendo la velocidad de desarrollo a partir de los 3500 segundos aproximadamente. Este comportamiento podría deberse a que a bajas concentraciones de proteína, ésta se adsorbe en la interfase aire-agua, pero su concentración interfacial no alcanza para la formación de una red viscoelástica en la interfase, lo que se refleja en bajos valores del módulo elástico. A mayores concentraciones de proteína, se formaría una estructura tipo gel en la interfase, por un aumento en el grado de interacciones proteína-proteína,

aumentando la rigidez del film. Este comportamiento es característico de proteínas globulares y se vincula a la presencia de grupos tiol libres (Martin et al., 2002). El alto grado de empaquetamiento que presenta la película a altos tiempos de adsorción es consecuencia de una reacomodación de las moléculas de proteína previamente adsorbidas en la interfase (Rodríguez Patino et al, 1999b).

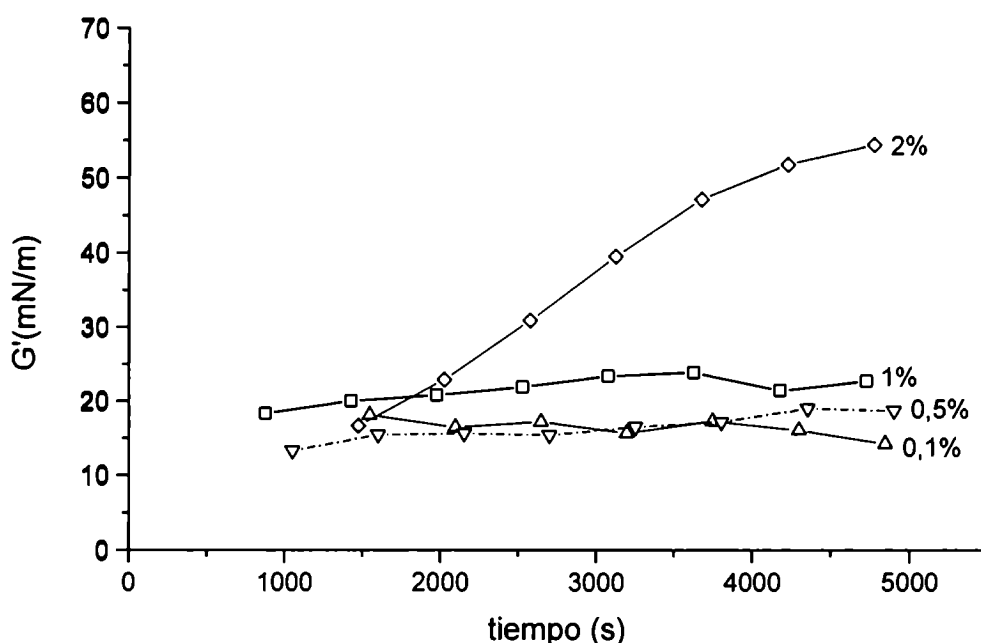


Figura II.4.2.2 Módulo elástico obtenido a partir de los ensayos dilatacionales superficiales en el tensiómetro de gota, para monocapas de β -lg formadas a partir de soluciones de concentraciones entre 0,1 y 2%.

Los resultados observados están de acuerdo a lo reportado previamente por Rodríguez Patino et al. (1999a), quienes observaron un aumento en el módulo elástico de monocapas de β -lg adsorbida en la interfase aire-agua al aumentar la concentración de proteína en el seno de la fase líquida.

II.4.2.2 Propiedades interfaciales y de espumado de polisacáridos solos

II.4.2.2.1 Alginato de Propilenglicol (PGA)

Dinámica de adsorción de PGA en la interfase aire-agua

La cinética de adsorción de los diferentes PGA se estudió para concentraciones de 0,1 y 0,5% en la solución, a pH neutro y 20 °C.

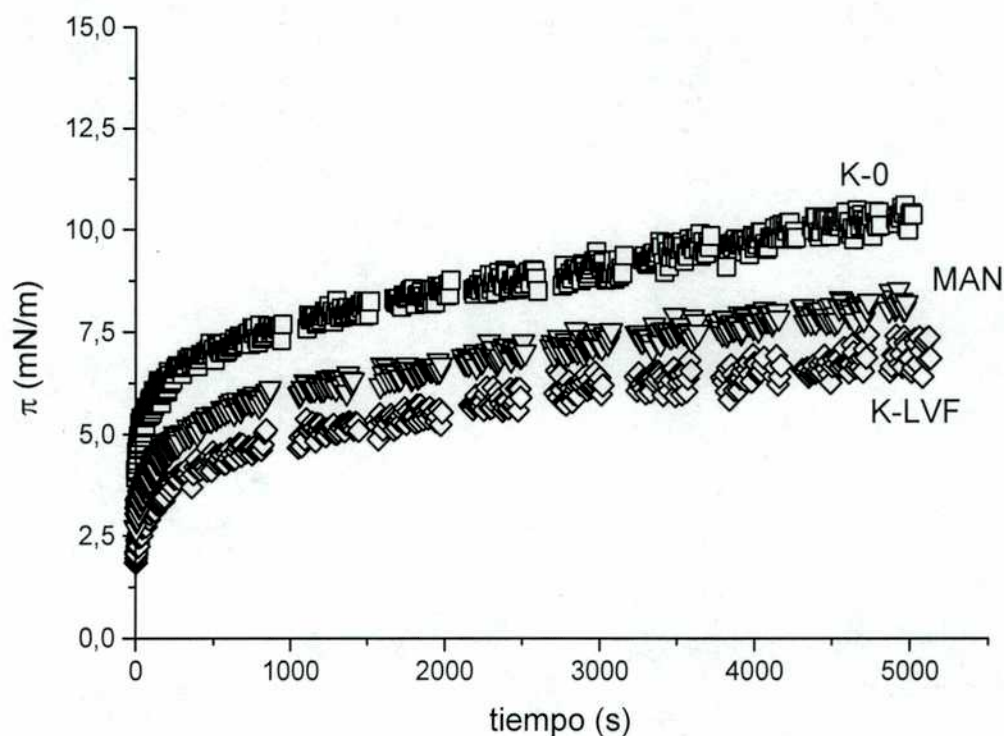


Figura II.4.2.3 . Evolución de π en función del tiempo de adsorción para soluciones de PGA al 0,1%

En la **Figura II.4.2.3** se muestra la evolución de la presión interfacial en función del tiempo de adsorción para una concentración del 0,1%. En estudios previos se ha reportado una importante actividad interfacial del PGA debido al carácter hidrofóbico de los grupos propilenglicol (Huang et al., 2001). Sin embargo no hay en la literatura datos relativos a la dinámica de adsorción de estos polisacáridos ni a las propiedades de las películas interfaciales que conforman. El aumento en la presión superficial mostró el siguiente orden: K-0 > MAN > K-LVF. Un mayor aumento en la presión superficial estaría relacionado al mayor grado de esterificación y a la menor viscosidad del K-0 (**Tabla II.4.1.1**).

A mayores concentraciones (0,5%), la actividad interfacial de los distintos PGA siguió la misma tendencia (**Figura II.4.2.4**), pero el valor final de la presión interfacial a los 5000 s (π_{5000}) fue ligeramente menor en todos los sistemas (**Tabla II.4.2.1**). Esto podría deberse al aumento en la viscosidad de la fase líquida que podría disminuir la velocidad de algunas etapas involucradas en la adsorción del polisacárido en la interfase. Es posible que a 0,5% se requirieran mayores tiempos de adsorción para alcanzar valores similares de π .

El hecho de que al aumentar la concentración del 0,1 al 0,5% no resulte en un incremento significativo de π podría deberse a que al 0,1% se estaría en una concentración próxima a la de saturación de la interfase.

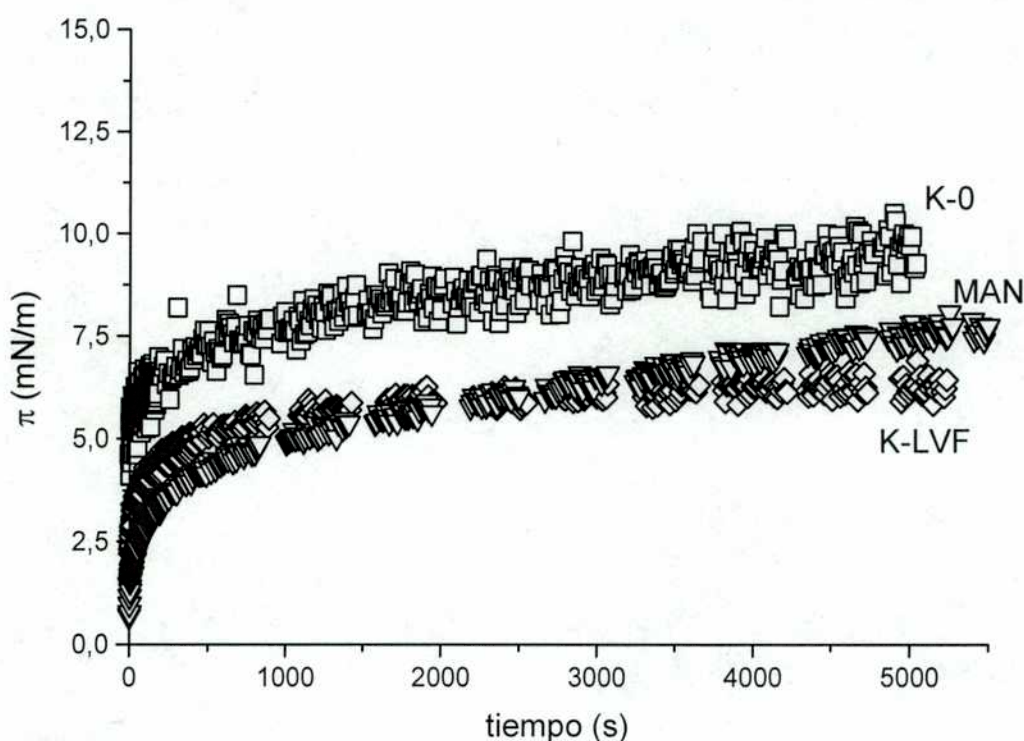


Figura II.4.2.4 Evolución de la presión superficial en función del tiempo de adsorción para soluciones de PGA al 0,5%

La cinética de adsorción en la interfase aire-agua puede obtenerse de los gráficos de evolución de la presión superficial con el tiempo. La velocidad de cambio de concentración superficial (Γ) puede ser expresada como (Mc Ritchie, 1978):

$$d\Gamma/dt = (d\Gamma/d\pi) \cdot (d\pi/dt) \quad \text{Ec (II.4.2.1)}$$

Si $(d\Gamma/d\pi)$ es constante, $(d\pi/dt)$ puede ser usada para evaluar la velocidad de adsorción del tensioactivo. En la etapa de difusión, la ecuación modificada de Ward y Tordai (Ward y Tordai, 1946), puede utilizarse para correlacionar el cambio en presión interfacial con el tiempo según:

$$\pi = 2 C_0 K T (D t / 3, 14)^{1/2} \quad \text{Ec (II.4.2.2)}$$

donde C_0 es la concentración en el seno de la fase líquida, K es la constante de Boltzman, T es la temperatura absoluta y D es el coeficiente de difusión. Si la difusión del polisacárido hacia la interfase controla el proceso de adsorción, un gráfico de π vs $t^{1/2}$ será lineal (Mac Ritchie, 1978, De Feijter et al, 1987; Xu y Damodaran, 1994), y de la pendiente de dicho gráfico se obtendrá la velocidad de difusión (k_{dif}).

La velocidad de las etapas de penetración y reacomodación de las moléculas adsorbidas en la interfase, puede analizarse por la siguiente ecuación de primer orden (Graham y Phillips, 1979a; Tornberg, 1978a; Suttiprasit et al., 1992):

$$\ln \frac{\pi_f - \pi_t}{\pi_f - \pi_0} = - k_i \cdot t \quad \text{Ec (II.4.2.3)}$$

donde π_t , π_0 y π_f son presiones superficiales al tiempo final de la etapa, a tiempo cero y a un tiempo cualquiera, t y k_i es la constante de velocidad de primer orden. En la práctica, la ecuación (3) generalmente ajusta dos o más regiones lineales. La primera pendiente corresponde a la constante de primer orden del proceso de penetración y desplegamiento (k_1), mientras que la segunda pendiente corresponde a la etapa de reacomodación de las moléculas adsorbidas en la interfase (k_2). Como se verá en la sección siguiente, para la adsorción de proteína en la interfase generalmente pueden hallarse dos pendientes en esta región de los gráficos. En el caso de los polisacáridos, solo se encontró una pendiente en la etapa siguiente a la difusión, que estaría dada por una penetración del polisacárido en la interfase. A diferencia de las monocapas de proteína, en las que existe una fuerte interacción entre las moléculas adsorbidas de modo que forman una red o estructura tipo gel en la interfase, en las películas interfaciales formadas por polisacáridos no existiría una etapa de reacomodamiento de la monocapa por no poseer una estructura molecular tan compleja como las de la proteína. En la **Tabla II.4.2.1** se muestran los valores de las velocidades de las diferentes etapas de adsorción.

Se observó un aumento en la velocidad de difusión para menores concentraciones de polisacárido en todos los casos, que podría deberse a la menor viscosidad de la fase líquida que facilita la difusión. Por el contrario, la velocidad de la etapa de penetración aumentó con la concentración de PGA en todos los casos. No se observaron diferencias significativas en la velocidad de difusión para cada concentración entre los diferentes PGA.

Tabla II.4.2.1 Velocidades de difusión (k_{dif}) y penetración (k_1) obtenidas de la linealización de los gráficos de π vs tiempo para los diferentes PGA.

Sistema	k_{dif} ($\text{mN m}^{-1} \text{s}^{-0.5}$)	R^2	$k_1 \times 10^4$ (min^{-1})	R^2	π_{5000} (mN/m)
Kelcoloid 0 0,5%	0,121	0,702	4,83	0,839	10
Kelcoloid 0 0,1%	0,146	0,970	3,44	0,970	11,12
Kelcoloid LVF 0,5%	0,128	0,955	7,06	0,939	7
Kelcoloid LVF 0,1%	0,136	0,967	2,38	0,949	9
Manucol Ester 0,5%	0,129	0,985	3,36	0,984	8,5
Manucol Ester 0,1%	0,137	0,985	2,38	0,970	10

Propiedades reológicas de las películas de PGA

Por medio de ensayos oscilatorios dilatacionales, se obtuvieron los parámetros reológicos de las películas de PGA. En la **Figura II.4.2.5** se muestran los valores del módulo elástico (a) y $\tan \delta$ (b) para los sistemas al 0,1%. El módulo elástico G' aumentó en el orden $K\text{-LVF} < \text{MAN} < K\text{-0}$, obteniéndose valores entre 5 y 17 mN/m .

Los bajos valores de $\tan \delta$ ($<0,2$) indican la formación de un film de elevada viscoelasticidad. A pesar de que se ha mencionado que en los films formados por polisacáridos no se daría el reacomodamiento característico de las películas proteicas, los bajos valores de $\tan \delta$ indican que las moléculas del polisacárido podrían asociarse y formar una película de buena viscoelasticidad. Esta asociación podría involucrar las regiones esterificadas hidrofóbicas de las moléculas de PGA.

A mayor concentración de PGA (0,5%) se observó una disminución notable en los valores de G' en el caso de K-0 y K-LVF (**Figura II.4.2.6**). Esto podría deberse a que a esta concentración, superior a la de saturación, la monocapa podría estar colapsada. En proteínas que forman monocapas ordenadas (WPI) se ha observado que el módulo dilatacional aumenta con la concentración superficial hasta el punto de colapso. Luego del punto de colapso los valores permanecen constantes.

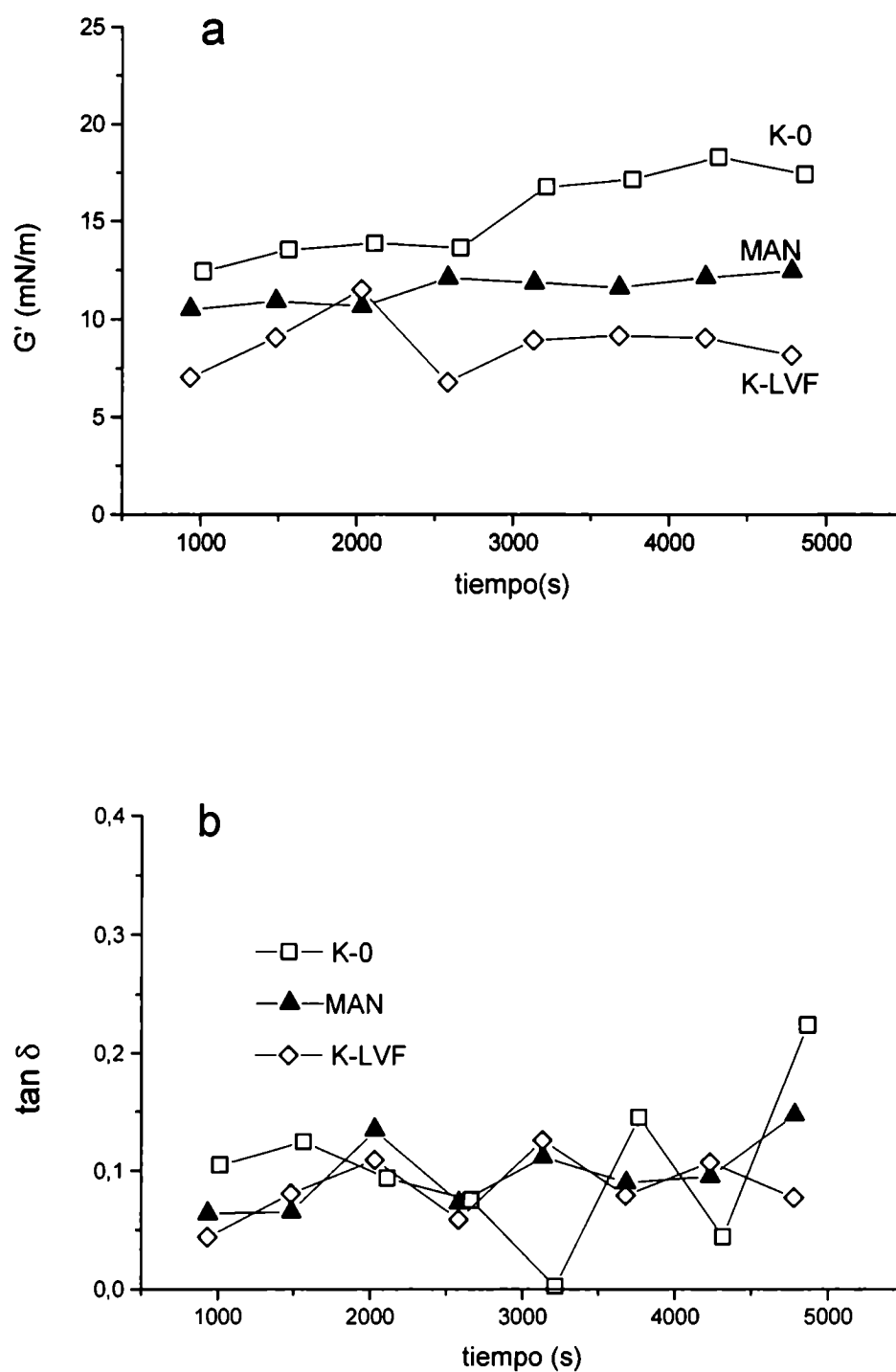
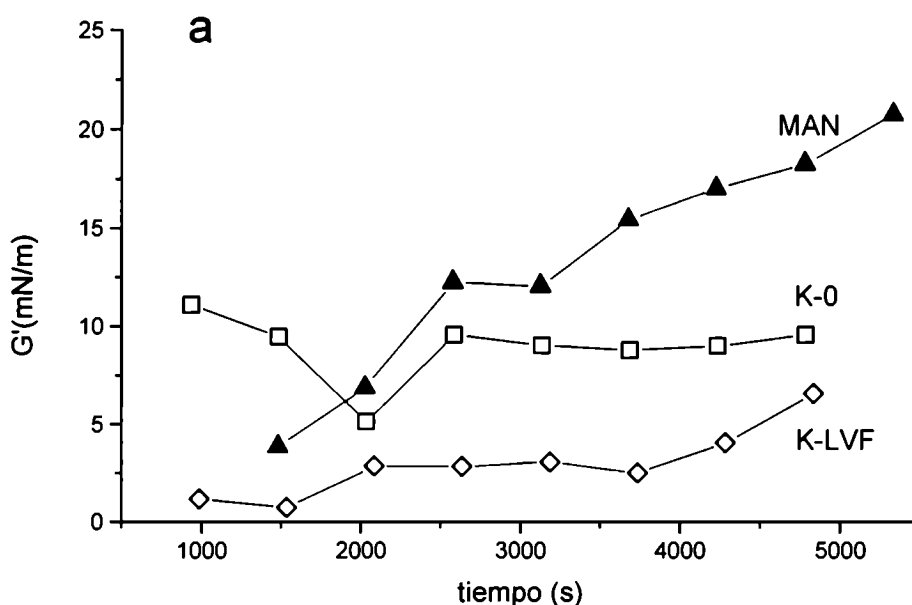


Figura II.4.2.5 Parámetros reológicos superficiales obtenidos para los sistemas al 0,1%. (a) Elasticidad dilatacional superficial, G' (b) Tangente del ángulo de pérdida ($\tan \delta$).

En cambio, para monocapas más desordenadas (β -caseína) el módulo toma un valor mínimo en el punto de colapso (Rodríguez Patino et al., 2001a). Los resultados sugieren que se requeriría una mayor caracterización de la estructura de las monocapas formadas por el PGA a fin de explicar el comportamiento observado.

El Manucol ester presentó un desarrollo de G' desde valores bajos de presión (incluso menores a los observados en las soluciones al 0,1%) hasta valores más altos, de alrededor de 25 mN/m. Tan δ mostró valores mayores a los obtenidos al 0,1% en presencia de K-0 y K-LVF lo que indicaría la formación de un film menos viscoelástico.

Al aumentar la concentración de 0,1 a 0,5%, K-LVF presenta una pequeña disminución del valor de G' de la interfase pero una disminución notable de la viscoelasticidad lo cual revela un menor grado de estructuración de la interfase. El K-0 al aumentar la concentración de 0,1 a 0,5% disminuye mucho el G' y aumenta ligeramente tan δ , lo cual indica también un menor grado de estructuración en la interfase a mayor concentración. En cambio, el Manucol a tiempos largos de adsorción desarrolla un nivel de estructuración mayor a 0,5% que a 0,1%, manteniéndose la viscoelasticidad en valores semejantes (tan $\delta \approx 0,15$). El comportamiento particular del Manucol podría deberse a un mayor nivel de Ca^{2+} (inf. Provista por ISP Alginates) en el Manucol que podría promover la asociación interfacial del mismo.



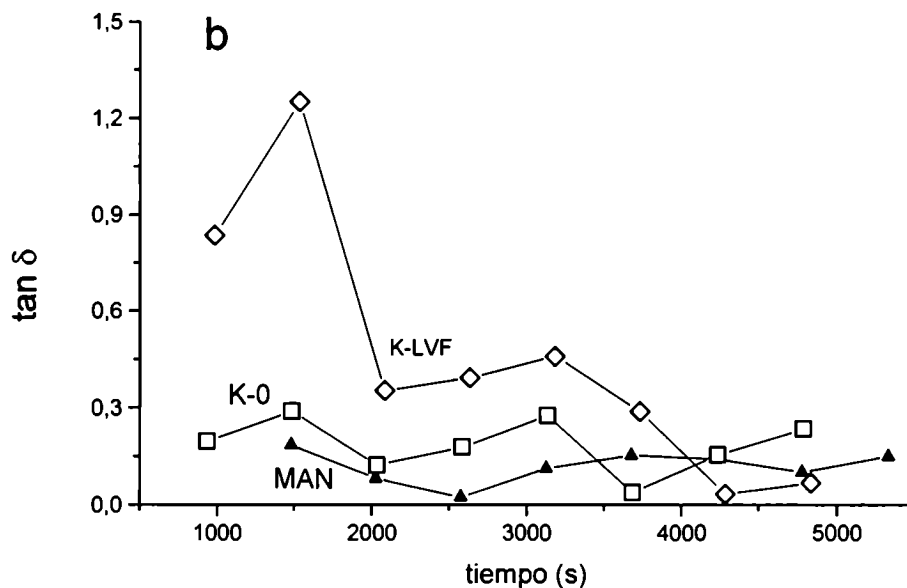


Figura II.4.2.6 Parámetros reológicos superficiales obtenidos para los sistemas al 0,5%. (a) Elasticidad dilatacional superficial, G' (b) Tangente del ángulo de pérdida ($\tan \delta$).

Medición de la viscosidad de las soluciones de PGA

Se evaluó el comportamiento de flujo de soluciones de PGA al 0,5%, graficando los valores de esfuerzo de corte (τ) en función de la velocidad de deformación en un rango entre 10 y 120 s^{-1} (**Figura II.4.2.7**). Las curvas obtenidas se ajustaron mediante la ecuación de Herschel Burkley (Ec II.3.12).

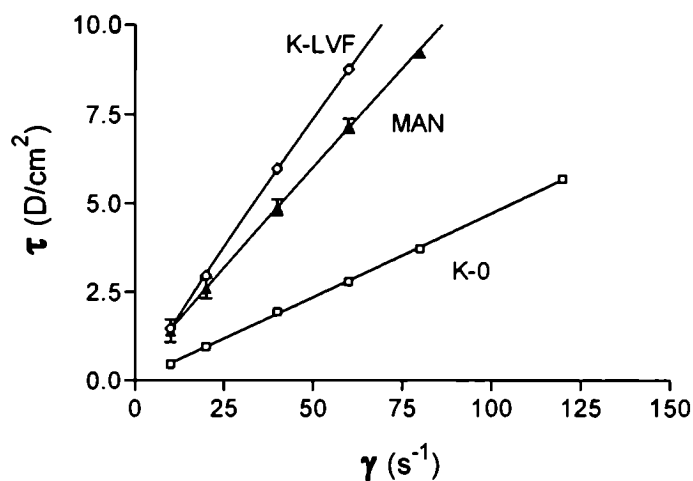


Figura II.4.2.7 .Curvas de esfuerzo de corte vs velocidad de deformación obtenidas para soluciones de PGA al 0,5%.

Las soluciones de K-LVF y MAN presentaron un leve comportamiento pseudoplástico con valores de n muy cercanos a 1 y sin un valor apreciable del umbral de fluencia (Tabla II.4.2.2). En el caso del K-0, el valor de $n=1$ indica un comportamiento Newtoniano. Los valores de viscosidad aparente evaluada a 60 s^{-1} , muestran un aumento de viscosidad en el siguiente orden: $K-0 \ll \text{MAN} \leq K-LVF$. Según los valores de viscosidad hallados el K-0 tendría un peso molecular más bajo que los otros PGA.

Tabla II.4.2.2 Características de flujo de soluciones de PGA al 0,5%.

PGA	τ_0	K	n	$\mu (60 \text{ s}^{-1})$ (cp)
K-0	-	0,044	1,014	4,71
K-LVF		0,228	0,901	13,91
MAN		0,136	0,960	11,86

Características de las espumas de PGA formadas a partir de soluciones al 0,5%

Se evaluó la capacidad de espumado de soluciones de PGA al 0,1 y 0,5%. En soluciones al 0,1% se observó un bajo volumen de espuma y baja estabilidad. A 0,5% aumentó el volumen de las espumas y la estabilidad, pudiendo determinarse en este caso la velocidad de drenado y el tiempo de colapso. En la Tabla II.4.2.3 se muestra la capacidad de espumado y la estabilidad de espumas obtenidas para soluciones de PGA al 0,5%.

Tabla II.4.2.3 Características de las espumas de PGA al 0,5%

PGA	FE%	k_{dr} ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$)	$t_{\text{colapso}}(10\text{ml})$ (min)
K-0	115	0,0136	24
K-LVF	95	0,0125	27
MAN	100	0,0101	29

La capacidad de espumado mostró el siguiente orden: $K-0 > \text{MAN} > K-LVF$. Este resultado muestra el mismo orden que el aumento de presión superficial (Figura II.4.2.4) y el inverso a las viscosidades de las soluciones de PGA (Tabla II.4.2.2). Es decir que el PGA de menor peso

molecular y viscosidad puede penetrar más en la interfase y permitir la formación de una mayor área interfacial. En la **Figura II.4.2.8** se muestran las curvas de drenado de líquido de las espumas.

Carp et al. (1997a) propusieron un modelo para expresar el líquido drenado de espumas estabilizadas por proteínas en un amplio rango de concentraciones:

$$v(t) = V_L t^n / (c + t^n) \quad \text{Ec (II.4.2.4)}$$

donde $v(t)$ es el volumen de líquido drenado a tiempo t ; V_L es el máximo volumen drenado, n es una constante relacionada a la forma sigmoidea de las curvas de drenado, c es un parámetro relacionado al tiempo medio de drenado, $c^{1/n}$. La constante de velocidad de drenado (k_{dr}) fue estimada de la siguiente ecuación:

$$k_{dr} = n/(V_L \cdot c^{1/n}). \quad k_{dr} = (\text{ml. min})^{-1} \quad \text{Ec(II.4.2.5)}$$

Los valores de las constantes de velocidad de drenado k_{dr} se presentan en la **Tabla II.4.2.3**, obteniéndose de altos coeficientes de correlación ($R^2 > 99\%$).

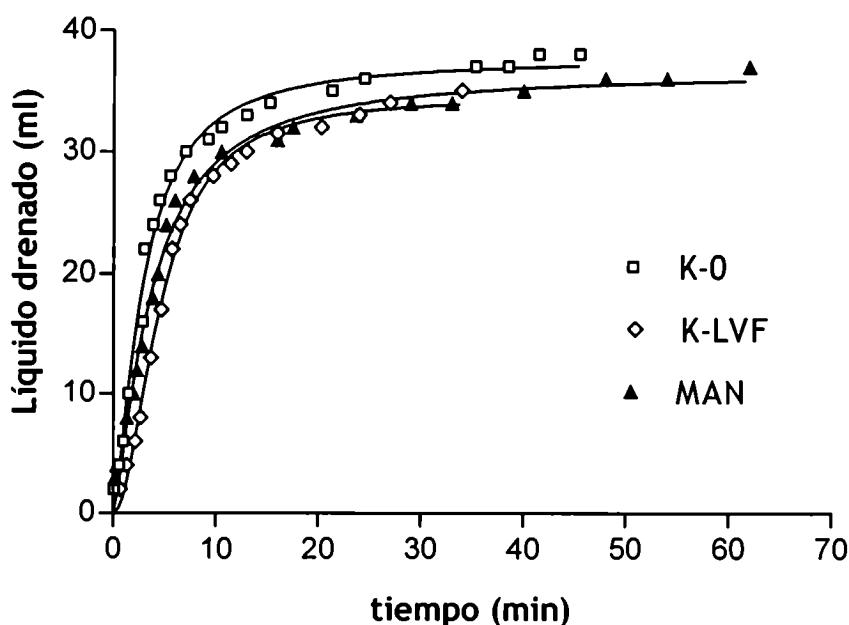


Figura II.4.2.8. Curvas de drenado de líquido de espumas de PGA al 0,5%

En la **Tabla II.4.2.3** se muestra también el tiempo necesario para que el volumen de las espumas disminuya en 10 ml (tiempo de colapso). Como se observa en la **Figura II.4.2.9**, el

colapso presentó una fase “lag” significativa antes que el volumen de las espumas comience a disminuir.

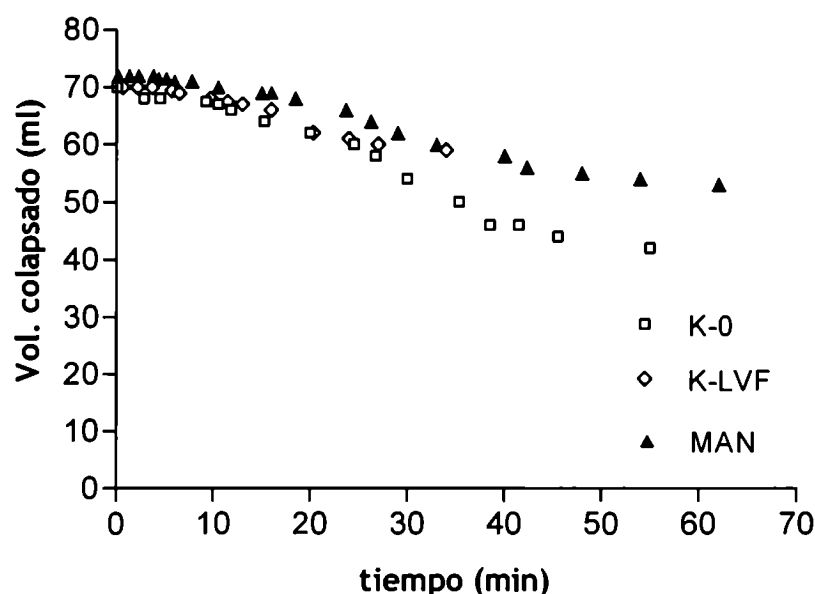


Figura II.4.2.9 Colapso de las espumas de PGA

Por lo tanto, la estabilidad al drenado y colapso de las espumas formadas con los diferentes PGA mostró el siguiente orden: MAN > K-LVF > K-0.

Podría concluirse que la mayor estabilidad al drenado y colapso de las espumas de MAN sería debido a un efecto conjunto de la alta viscosidad de la solución y los altos valores de elasticidad (altos G') y viscoelasticidad (bajos $\tan \delta$) obtenidos para este sistema. Esto estaría dado por el mayor peso molecular y grado de esterificación que presenta este polisacárido dentro del grupo de los PGA. En cambio las espumas de K-0 debido a su baja viscosidad/PM (aún teniendo la película interfacial una buena viscoelasticidad) presentan menor estabilidad.

Los resultados indican que el PGA tiene un comportamiento similar al de las proteínas en cuanto a la mayor capacidad de formar espumas a mayor hidrofobicidad y menor pH y eventualmente mayor flexibilidad molecular. Sin embargo las características moleculares requeridas para lograr una estabilización en el tiempo de las interfases formadas son opuestas. Se requiere una molécula más grande capaz de establecer importantes interacciones en la interfase.

Se puede concluir por lo tanto que un prerequisite tanto para formar una espuma como para estabilizarla es que el PGA posea un alto grado de esterificación, condición que cumplen tanto el K-0 como el MAN. Sin embargo para lograr una mayor estabilidad de la espuma en el tiempo se requiere que el PGA tenga un alto peso molecular lo cual le permite desarrollar una mayor

viscosidad de la fase continua de la espuma e interaccionar a nivel del film interfacial generando películas de gran carácter sólido y buena viscoelasticidad.

II.4.2.2.2 Goma xántica y λ -carragenano

Características interfaciales

En la **Figura II.4.2.10** se muestran las curvas de presión superficial vs tiempo para los sistemas de λ -C y goma xántica al 0,1%. La goma xántica no modificó la presión superficial lo cual concuerda con lo reportado por Yilmazer et al. (1991).

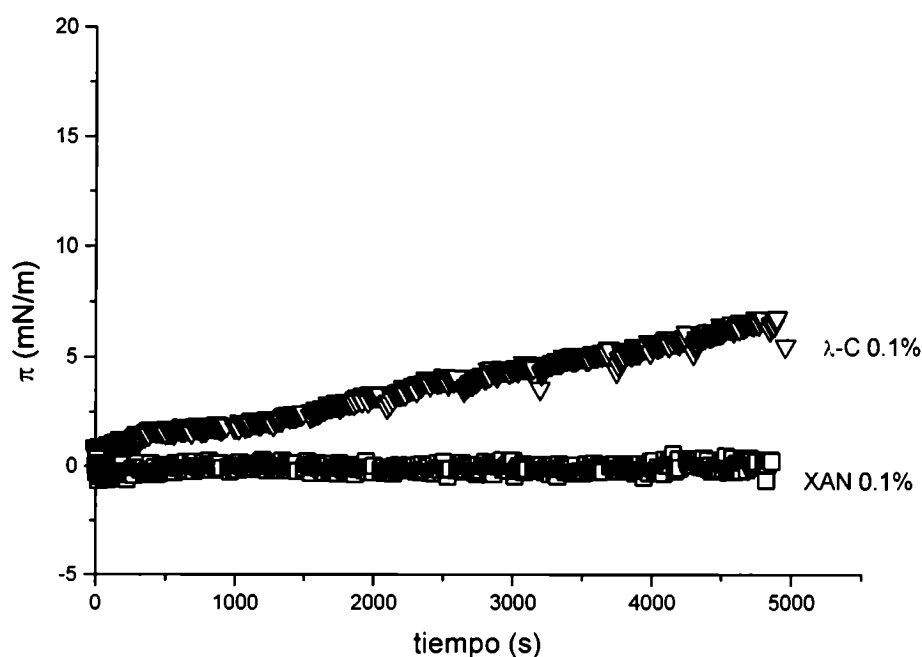


Figura II.4.2.10 Evolución de π con el tiempo de adsorción para λ -C y XAN al 0,5%

En el caso del λ -C se observó en cambio un aumento de la presión superficial con el tiempo aún cuando este polisacárido no posea actividad superficial. En experiencias preliminares se observó un incremento aún mayor que el presentado en la **Figura II.4.2.10** por lo cual se realizó una “purificación” de la interfase de posibles contaminantes con actividad superficial aspirando pequeñas cantidades de solución de la superficie.

Se ha observado que la presencia de impurezas de proteína (2-3%) en muestras de polisacáridos sin actividad interfacial, otorga propiedades tensioactivas a las soluciones, pudiendo estas ser

eliminadas al remover esas impurezas proteicas de las muestras (Huang et al., 2001). Con un tiempo suficientemente largo podrían eliminarse totalmente estas impurezas, con lo que se obtendría un comportamiento similar al de la goma xántica. En la **Figura II.4.2.11** se muestra la evolución de G' y $\tan\delta$ con el tiempo para los sistemas con λ -C y XAN.

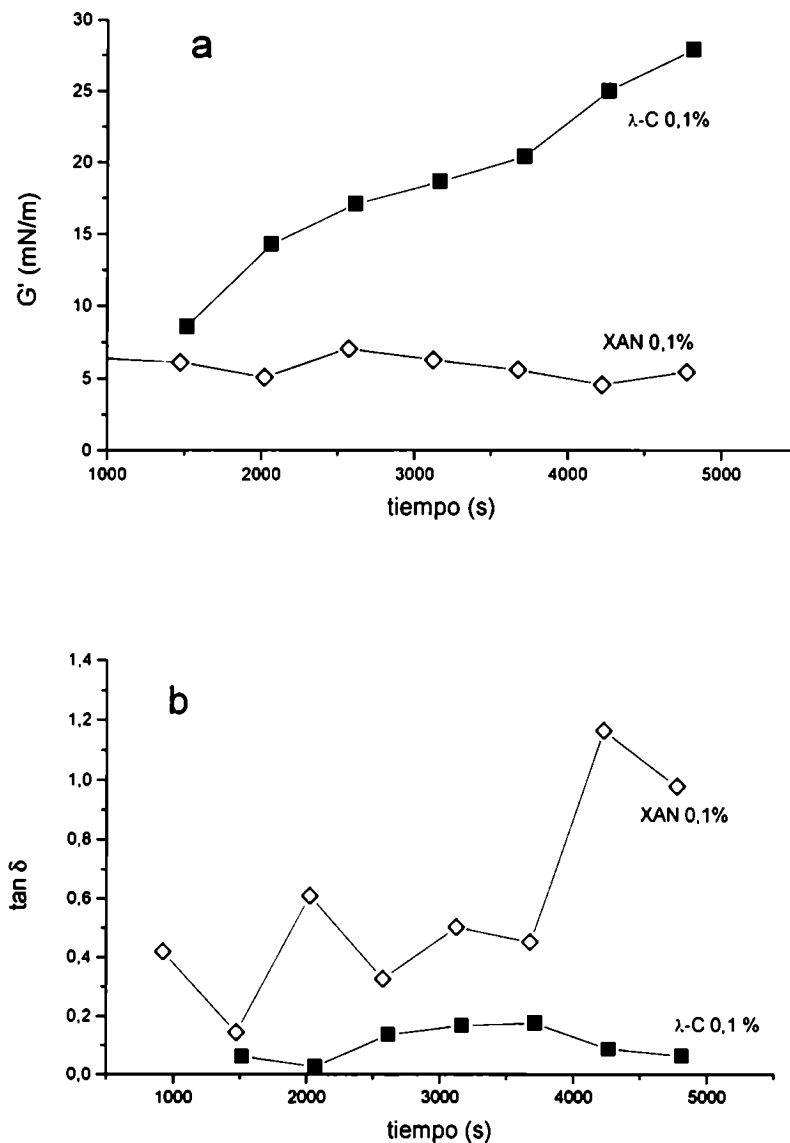


Figura II.4.2.11 Parámetros reológicos dilatacionales para las monocapas formadas en presencia de λ -C y XAN. (a) Elasticidad dilatacional superficial, G' (b) Tangente del ángulo de pérdida ($\tan\delta$).

Puede observarse que la interfase aire-agua en presencia de la goma xántica muestra bajos valores de elasticidad superficial y de las características viscoelásticas ($\tan\delta$). Dado que este polisacárido no presenta actividad superficial (π no aumenta) estos valores deben atribuirse a la propiedad de estructuración de la goma xántica (que se manifiesta con la existencia de un umbral

de fluencia en la **Tabla II.4.2.4**) en las proximidades de la interfase aire-agua. El aumento de $\tan\delta$ con el tiempo indica una fluidificación de la interfase lo cual podría estar reflejando fenómenos de desorción de la interfase. Carp (2001) mediante el método del estalagmómetro de Traube encontró que la goma xántica produce un leve descenso de π .

En presencia de λ -C, el aumento en G' y los bajos valores de $\tan\delta$ observados se deberían a la presencia de impurezas tensioactivas presentes en el polisacárido y a fenómenos de estructuración del λ -C en las proximidades de la interfase aire-agua.

Viscosidad de las soluciones

El ajuste de las curvas de flujo mediante la Ec. de Herschel y Bulkley (II.3.12) arrojó los valores mostrados en la **Tabla II.4.2.4**.

Las soluciones de λ -C y xántica (XAN) al 0,5%, presentaron un comportamiento pseudoplástico y la solución de goma XAN presentó un umbral de fluencia relativamente alto.

Tabla II.4.2.4 Características de flujo de las soluciones de λ -C y XAN 0,5%

Polisacárido	τ_0 (D cm ⁻²)	K	N	R ²	μ (60s ⁻¹) (cp)
λ -C	-	1,29	0,726	0,999	39,7
XAN	41,5	3,42	0,490	0,996	111,6

Las soluciones de λ -C y XAN al 0,1% no espumaron a diferencia del comportamiento de los polisacáridos con actividad interfacial.

TERCERA SECCIÓN

II.4.3 PROPIEDADES INTERFACIALES Y DE ESPUMADO DE SISTEMAS MIXTOS β -LG + POLISACÁRIDOS ESTUDIADAS POR TENSÍOMETRÍA DE GOTA Y SU RELACIÓN CON PROPIEDADES DE ESPUMADO

II.4.3.1 Propiedades interfaciales de sistemas mixtos β -lg/polisacáridos

II.4.3.1.1 Dinámica de adsorción de sistemas mixtos de β -lg /polisacáridos en la interfase aire-agua.

En la sección anterior se evaluaron las características de adsorción de la β -lg en la interfase aire-agua a partir de soluciones con diferentes concentraciones de proteína. Según los resultados obtenidos, se concluyó que una concentración de 2% de β -lg en la solución llevaba a la formación de monocapas saturadas de proteína, observándose altos valores de la presión superficial y de la elasticidad dilatacional superficial al final del tiempo de adsorción. Por lo tanto, se eligió esta concentración de proteína para realizar un estudio del efecto de los polisacáridos en la adsorción y propiedades interfaciales de las monocapas. La concentración de los polisacáridos fue en las soluciones mixtas de 0,5% .

En la **Figura II.4.3.1** se muestra la evolución de la presión superficial con el tiempo para los sistemas mixtos. En presencia de los polisacáridos se observó un aumento en la presión superficial respecto del sistema de proteína sola excepto en el caso del sistema β -lg + MAN (**Figura II.4.3.1 a**). Entre los polisacáridos con actividad interfacial (**Figura II.4.3.1 a**), el K-LVF fue el que produjo un mayor aumento en la presión superficial respecto a la proteína sola.

En presencia de los polisacáridos sin actividad interfacial (λ -C, XAN) se observó un bajo incremento de la presión superficial respecto de la β -lg a tiempos cortos de adsorción (aprox. hasta 1000 segundos). A tiempos de adsorción mayores se observó una separación de las curvas respecto de la de β -lg sola, observándose mayores valores de presión al tiempo de adsorción final (**Fig II.4.3.1b**). Este efecto fue más marcado en el caso de la goma xántica, en donde se obtuvieron valores de presión de 28 mN/m, aún mayores que los obtenidos para el K-LVF.

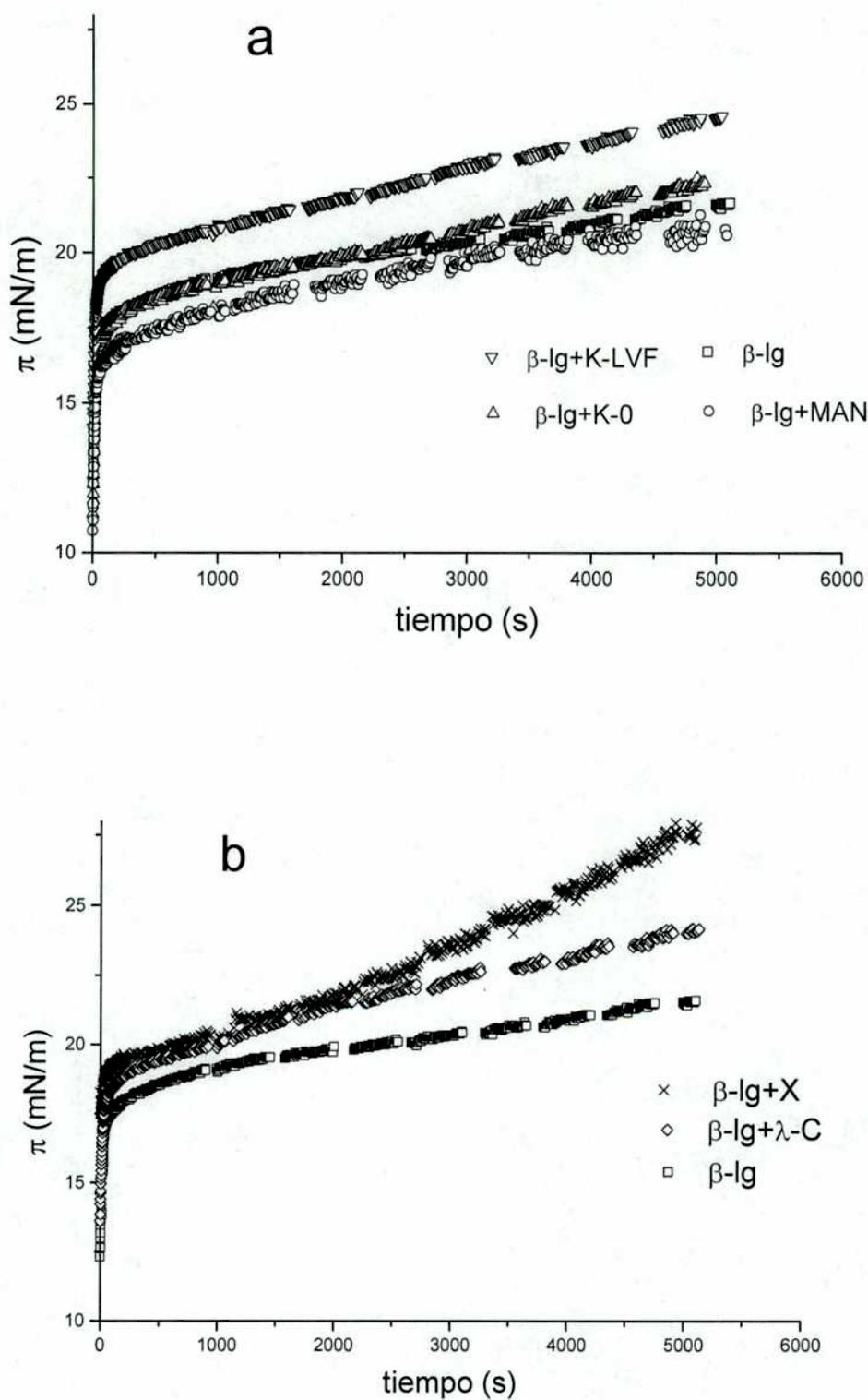


Figura II.4.3.1. Evolución de la presión superficial con el tiempo para los sistemas de β -lg (2%) y polisacáridos (0,5%). (a) Curvas π vs tiempo en sistemas con polisacáridos con actividad interfacial: K-0, K-LVF y MAN y (b) sin actividad interfacial: λ -C y XAN

Estudios previos realizados en sistemas mixtos de proteínas y polisacáridos sugieren que el comportamiento interfacial de estos sistemas estaría gobernado por la proteína, debido a su mayor actividad interfacial (Dickinson, 2003). Esto sería debido a la formación de una monocapa primaria de proteína que se forma rápidamente a cortos tiempos de adsorción.

Comparando los resultados obtenidos para las soluciones de polisacáridos solos (Sección II.4.2), para β -lg al 2% y para las mezclas, surge que el comportamiento de los sistemas mixtos estaría gobernado por la β -lg, debido a que la forma de las curvas de presión superficial y los valores máximos obtenidos son similares a los observados en las películas de β -lg sola. Si bien la película primaria de proteína formada a cortos tiempos de adsorción es responsable de los altos valores de presión superficial obtenidos, la presencia de los polisacáridos produjo un importante efecto en el comportamiento de los sistemas, principalmente a tiempos mayores de adsorción.

Debido a que la xántica no produce cambios en la tensión superficial, el aumento significativo que se produce en π en el sistema mixto ($\pi_{5000} \cong 28$ mN/m en relación a $\pi_{5000} \cong 21$ mN/m para la β -lg sola) indica un sinergismo entre los biopolímeros. La goma xántica, debido probablemente a su alto peso molecular y fuerte carácter aniónico, promovería una mayor incompatibilidad entre los biopolímeros en solución. La existencia de una limitada incompatibilidad termodinámica entre dos biopolímeros puede incrementar la cantidad de proteína adsorbida en la interfase (Burova et al., 1992, Dickinson, 1993).

El λ -C, no obstante poseer una cierta actividad superficial, atribuida a la presencia de impurezas, produjo un incremento menor en π que la goma xántica.

Los sistemas simples de polisacáridos con actividad interfacial (PGA) al 0,5 % mostraron parcialmente valores máximos de presión superficial entre 5 y 10 mN/m (Sección II.4.2).

La π del sistema K-0 + β -lg no difiere sustancialmente del de la β -lg sola. Dado que el K-0 por sí solo al 0,5% produce una $\pi_{5000} \cong 10$ mN/m, se puede inferir que existiría un efecto antagónico entre los biopolímeros. Este efecto sería aún más marcado en presencia de Manucol dado que la π_{5000} del sistema mixto fue menor que la de la β -lg sola. Este efecto antagónico refleja la competencia de la proteína y los PGA por la interfase. A medida que el PGA participa más de la interfase, menos proteína podría adsorberse; dado que las moléculas de PGA producen un menor incremento de la presión superficial que la β -lg, la resultante sería una disminución de la π superficial del sistema mixto en relación a la proteína sola. En cambio en el caso del K-LVF que por sí solo al 0,5% presentaba una $\pi_{5000} \cong 5$ mN/m, los resultados del sistema mixto sugieren un comportamiento casi aditivo que refleja una cooperación entre los dos biopolímeros a nivel de la interfase.

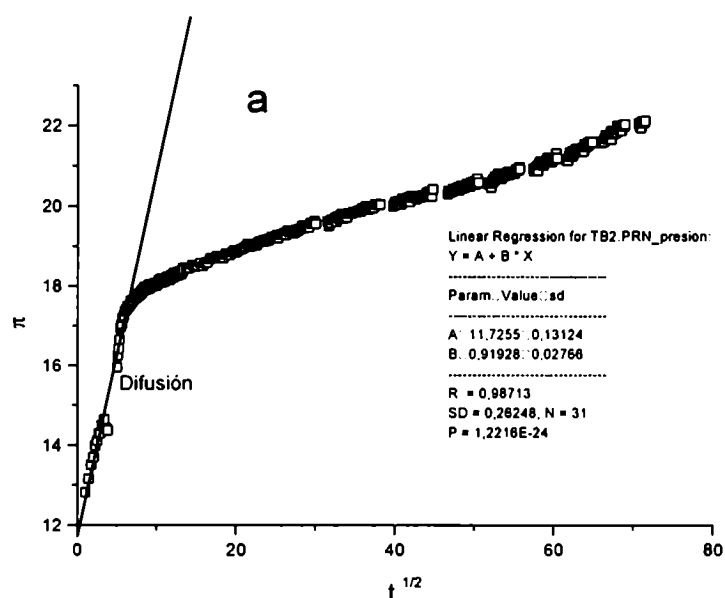
En presencia de PGA se ha reportado la formación de complejos electrostáticos con proteínas a $\text{pH} > \text{pI}$. Sin embargo no se han reportado cambios importantes en los valores de tensión superficial

observados, sino en las propiedades reológicas de las películas y en la estabilidad de espumas y emulsiones (Dickinson & Euston, 1991, Sarker & Wilde, 1999).

II.4.3.1.2 Cinética de adsorción

Se evaluaron las velocidades de las diferentes etapas de adsorción en la interfase aire- según lo descrito en la Sección II.4.2 a partir de los datos de evolución de π con el tiempo. En la **Figura II.4.3.2a** se observa el gráfico de linealización de π vs $t^{1/2}$ para la curva de presión superficial de β -lg sola al 2%. De las gráficas obtenidas de $F(\pi) = \ln \frac{\pi_f - \pi_i}{\pi_f - \pi_0}$ en función del tiempo de adsorción, se obtuvieron dos pendientes correspondientes a las etapas de penetración y reacomodamiento. En la **Figura II.4.3.2b** se observa el gráfico de $F(\pi)$ en función del tiempo y la obtención de las dos pendientes correspondientes a la penetración y reacomodamiento para el sistema de β -lg al 2%, a diferencia de lo observado en la sección anterior para los sistemas de PGA solos, en donde no se observó la última etapa.

Luego de la difusión de las moléculas de β -lg en el seno de la solución, éstas penetran en la interfase desplegándose parcialmente, y se asocian entre ellas conformando una monocapa viscoelástica de buena cohesividad. Estos últimos fenómenos se producirían en la etapa de reacomodamiento.



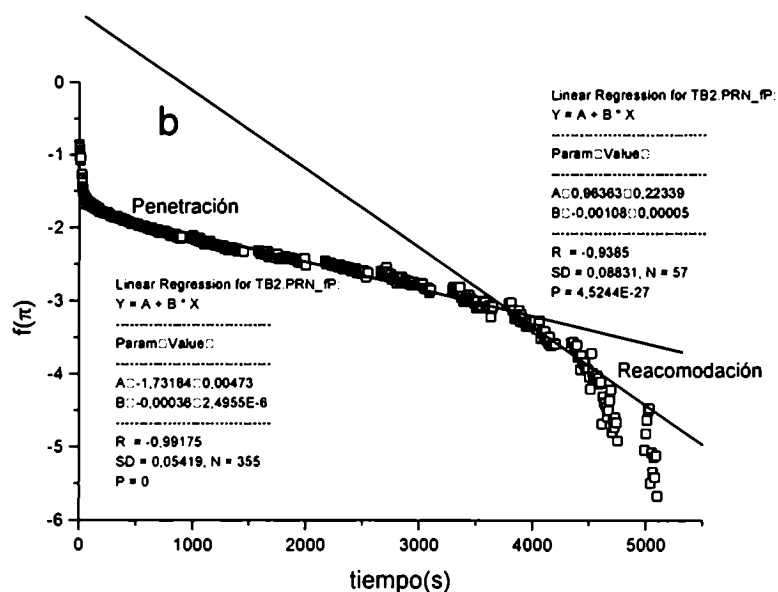


Figura II.4.3.2. Cinética del proceso de adsorción en la interfase de acuerdo a los mecanismos de (a) difusión, (b) penetración y reacomodamiento de las moléculas de β -lg en la interfase aire-agua.

$$F(\pi) = \ln \frac{\pi_f - \pi_t}{\pi_f - \pi_0} \text{ Las curvas corresponden a de 2\% de } \beta\text{-lg en la solución.}$$

A tiempos cortos, la cinética de adsorción está controlada por la difusión de proteína hacia la interfase. La etapa de penetración se extiende hasta largos tiempos de adsorción (aprox. 3500 s) y a tiempos mayores se produce el reacomodamiento de la monocapa principalmente por interacciones proteína-proteína.

En la **Tabla II.4.3.1** se muestran las constantes de velocidad obtenidas para las diferentes etapas en los sistemas de β -lg sola y en los sistemas mixtos. En presencia de los polisacáridos con actividad interfacial, se produjo un aumento en la velocidad de difusión en el orden β -lg+MAN > β -lg + K-LVF > β -lg + K-0.

Se ha reportado que un aumento en la velocidad de difusión puede producirse por un aumento en la concentración de proteína en la fase líquida (Rodríguez Patino et al, 1999a). La compatibilidad limitada entre los biopolímeros en solución aumenta la concentración efectiva de los mismos en el seno de la fase líquida y este efecto podría ser responsable del aumento en la velocidad de difusión siempre que la viscosidad del sistema no sea alta.

En el caso de los PGA, este aumento podría deberse tanto a un aumento en la velocidad de difusión causada por la incompatibilidad entre los biopolímeros en el seno de la solución como por un aumento en el número de moléculas que estarían difundiendo hacia la interfase.

Tabla II.4.3.1 Velocidades de difusión (k_{dir}), penetración (k_1) y reacomodamiento (k_2) en la formación de monocapas adsorbidas a partir de soluciones de β -lg (2%) y de β -lg + PS (0,5%).

Sistema	k_{dir} ($\text{mN m}^{-1} \text{s}^{-0.5}$)	R^2	$k_1 \times 10^4$ (min^{-1})	R^2	$k_2 \times 10^4$ (min^{-1})	R^2
β -lg sola	0,91928	0,98713	3,6	0,99175	10,8	0,9385
β -lg + XAN	0,45471	0,99205	1,9	0,99033	5,5	0,96135
β -lg + λ -C	0,93061	0,99754	3,7	0,99538	12,8	0,92276
β -lg + K-0	1,24091	0,99591	2,9	0,98928	7,7	0,97621
β -lg + K-LVF	1,02275	0,99633	2,9	0,99704	6,1	0,98394
β -lg + MAN	1,37536	0,99268	3,4	0,98935	4,6	0,86623

En presencia de los PGA no se observó un cambio significativo en las velocidades de penetración. Sin embargo, se observó una disminución en la velocidad de reacomodamiento. Como se mencionó anteriormente, esta etapa estaría relacionada a la formación de enlaces covalentes y no covalentes entre las moléculas de proteína adsorbidas en la interfase. La penetración de los polisacáridos en la interfase interferiría en la posibilidad de entrecruzamiento entre las moléculas proteicas y en la velocidad con que se producirían estas interacciones.

En el sistema con goma xántica, se observó una disminución en la velocidad de todas las etapas de adsorción, debido probablemente a la alta viscosidad del sistema que dificulta la difusión de las moléculas de proteína hacia la interfase y su posterior penetración y reacomodamiento. En cambio en el sistema con λ -C no se observó una variación significativa en ninguna de esas etapas.

Además de la obtención de las velocidades correspondientes a las distintas etapas en la formación del film, se determinó el intervalo de tiempo en el que fueron obtenidas dichas velocidades y el valor de presión superficial obtenido al final de cada intervalo (**Tabla II.4.3.2**).

De la **Tabla II.4.3.2** surge que en presencia de los polisacáridos las etapas de adsorción y penetración ocurren en un menor tiempo total (2500-2800 s) que para la β -lg sola (3680 s). Sin embargo la etapa de reacomodamiento es más extensa, no llegándose a un valor de equilibrio durante el tiempo de experimentación como se mostró en la **Figura II.4.3.1**.

En estudios de adsorción de β -lg en la interfase aire-agua se ha reportado (Waniska & Kinsella, 1985) que el reacomodamiento de la proteína sería la causa del aumento de presión superficial observado a tiempos mayores a 60 minutos (3600 seg), de igual forma que lo obtenido en el presente estudio.

Tabla II.4.3.2. Intervalos de tiempo correspondientes a las etapas de difusión, penetración y reacomodamiento (t_D , t_P , t_R), y presión superficial obtenida al final de cada etapa (difusión: π_D , penetración π_P , reacomodamiento: π_{5000})

Sistema	t_D (s)	π_D (mN/m)	t_P (s)	π_P (mN/m)	t_R (s)	π_{5000} (mN/m)
β -lg sola	0-60	17,8	60-3680	21,2	3680-5000	22,1
β -lg + XAN	0-39	19,4	39-2810	24,0	2810-5000	28,3
β -lg + λ -C	0-38	18,2	38-2680	22,6	2680-5000	24,7
β -lg + K-0	0-36	16,9	36-2710	20,9	2710-5000	22,8
β -lg + K-LVF	0-28	18,8	28-2510	22,7	2510-5000	25,0
β -lg + MAN	0-29	16,1	28-2505	19,8	2505-5000	21,1

II.4.3.1.3 Propiedades reológicas de las películas mixtas adsorbidas

En la **Figura II.4.3.3** se observa la evolución del módulo dilatacional elástico obtenido a partir de los 1000 segundos de adsorción para las películas de β -lg y los sistemas mixtos.

En todos los casos, salvo en presencia de xántica, el módulo elástico presentó un crecimiento constante con el tiempo, y no se alcanzó un valor de equilibrio incluso a tiempos prolongados. Este comportamiento es consecuencia de que los procesos de reacomodamiento en la interfase se prolongan durante un extenso período como se mostró anteriormente. A los 5000 s los valores de G' mostraron el siguiente orden: β -lg + λ -C > β -lg + K LVF > β -lg + Kelc 0 $\approx$ β -lg + Man > β -lg. En el sistema con goma xántica se establece muy rápidamente un valor de G' oscilante entre 40 y 70 mN/m. Por lo tanto, se observó en general un aumento del módulo elástico en presencia de todos los polisacáridos. El aumento de G' en relación a la β -lg sola en función del tiempo de adsorción indicaría un aumento en el carácter sólido de la monocapa, principalmente durante las etapas de penetración y reacomodamiento.

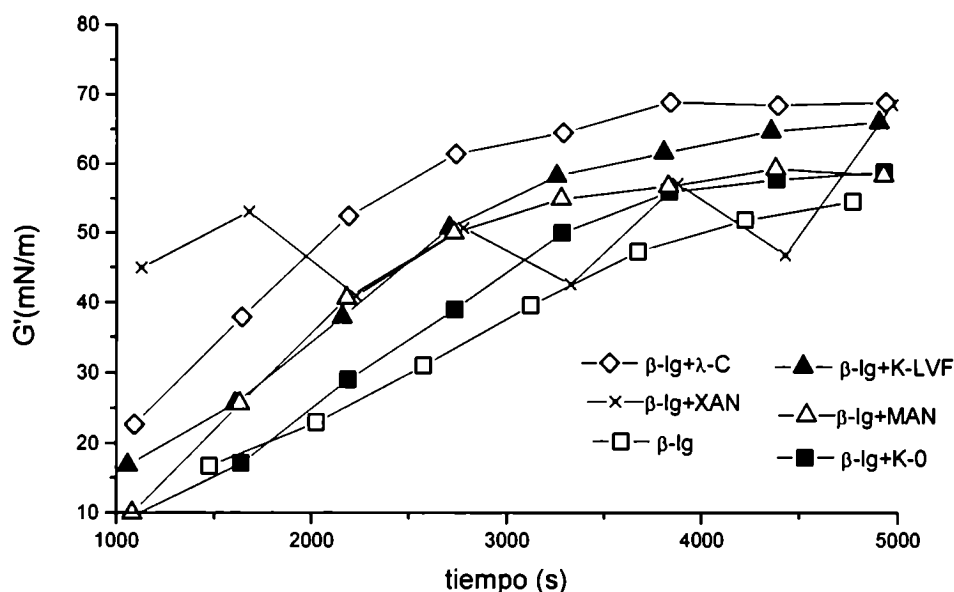


Figura II.4.3.3. Módulo elástico (G') para las monocapas formadas a partir de soluciones β -Ig (2%) + PS (0,5%)

La comparación del comportamiento del sistema mixto con respecto a la β -Ig sola y los polisacáridos por separado permite sacar conclusiones acerca del tipo de interacciones entre los biopolímeros. En la sección II.4.2 se mostró que las películas de β -Ig sola alcanzan un G' de aproximadamente 55 mN/m a tiempos largos de adsorción. En presencia de K-LVF (que estando solo desarrolla un G' de aprox. 7 mN/m) la película mixta alcanza un valor de G' de 65 mN/m, sugiriendo un efecto aditivo entre la β -Ig y este PGA en relación a este parámetro. Las películas mixtas con K-0 y Manucol desarrollaron un valor similar de G' de aprox. 60 mN/m. Dado que el Manucol solo presentaba un G' máximo de 20 mN/m, se infiere que existe un efecto antagónico entre la β -Ig y el Manucol a nivel de la elasticidad dilatacional superficial. En menor grado, el K-0 presenta también un efecto antagónico. Estos resultados están relacionados con lo observado en la presión superficial en cuanto los PGA con mayor actividad superficial (Manucol y K-0) que compiten por la interfase con la β -Ig, disminuyen el grado de estructuración de la película ya sea por poseer ellos un menor valor de G' o por impedir el reacomodamiento e interacción de las moléculas de β -Ig adsorbidas.

El mismo análisis permite concluir que la goma xántica y el λ -C en menor grado también presentarían antagonismo en relación a la elasticidad superficial.

El desarrollo de G' con el tiempo de adsorción se modeló con el objetivo de obtener la velocidad de estructuración del film y estimar los valores de G' en el equilibrio. Por analogía con las ecuaciones de ajuste de las curvas de drenado de espumas, que presentaban un comportamiento similar (Ec II.4.2.4-5), los datos de G' fueron ajustados mediante la ecuación.

$$G' = (G'_{\max} \cdot t^n) / (c + t^n), \quad \text{Ec (II.4.3.1)}$$

donde $G'_{\max}$ es el valor máximo del módulo elástico obtenido a tiempos prolongados. La constante de velocidad se calculó mediante .

$$k_G = n / (G'_{\max} \cdot c^{1/n}). \quad \text{Ec (II.4.3.2)}$$

En la **Figura II.4.3.4** se muestra el ajuste de los valores del módulo elástico vs tiempo, y en la **Tabla II.4.3.3** se indican los parámetros del ajuste y la constante de velocidad (k_G) calculada con la Ec (II.4.3.2). En presencia de todos los polisacáridos se observó un incremento en la velocidad de desarrollo de la estructura del film respecto del sistema con β -lg sola. Entre los PGA, el MAN presentó una mayor velocidad de desarrollo de G' en los sistemas mixtos, pero tuvo el valor de G' más bajo.

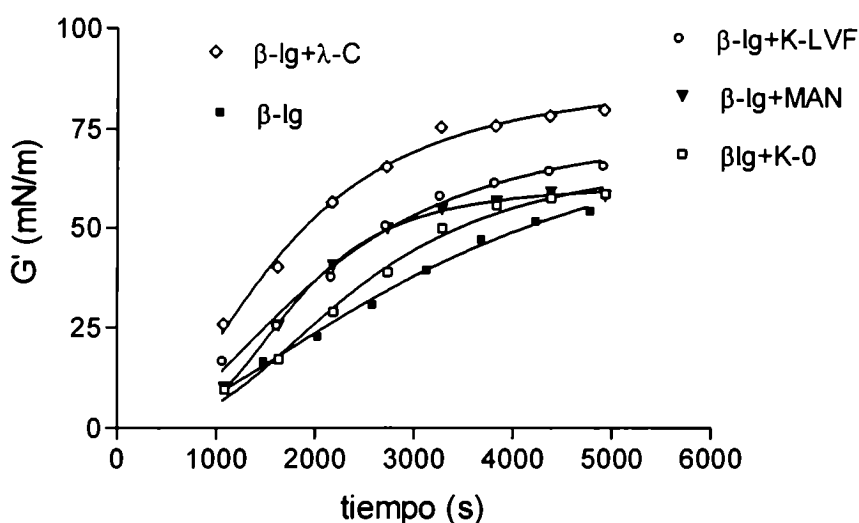


Figura II.4.3.4 Ajuste de los valores de G' vs tiempo

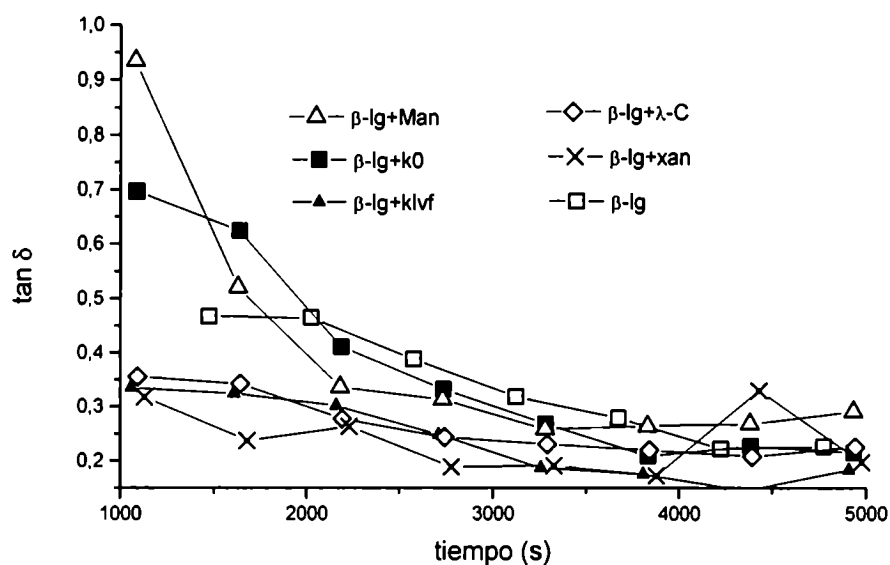
El aumento de la velocidad de desarrollo de G' estaría relacionado principalmente al acortamiento de las etapas de difusión y penetración (**Tabla II.4.3.2**) en presencia de los PS lo cual lleva a una más rápida estructuración de las interfaces mixtas.

Tabla II.4.3.3. Parámetros de ajuste del desarrollo de G' con el tiempo de adsorción

Sistema	$G'_{\max}$	N	C	R^2	k_{mod}
β -lg	86,10	1,803	2,373E+06	0,9935	6,096 E-06
β -lg+K0	69,22	2,686	1,225E+09	0,9923	1,6046E-05
β -lg+Klvf	78,04	2,168	1,614E+07	0,9902	1,3154E-05
β -lg+Man	60,93	3,421	1,312E+11	0,9988	3,1580E-05
β -lg+ λ -C	88,47	2,206	1,305E+07	0,9916	1,4833E-05

En cuanto a los valores estimados de G' ($G'_{\max}$ en **Tabla II.4.3.3.**) en el equilibrio, estos fueron menores en presencia de los polisacáridos con actividad interfacial, debido a los fenómenos de competencia mostrados anteriormente. De la misma manera que para los valores de G' a los 5000 segundos de adsorción, los valores de $G'_{\max}$ muestran que el K-LVF es el PGA que menos competiría por la interfase.

En presencia de λ -C el valor de G' máximo de la película mixta fue similar al de la película de β -lg sola, sin embargo la velocidad de estructuración resultó mucho mayor, de la misma forma que para los PGA.

**Figura II.4.3.5** Tangente del ángulo de pérdida obtenida para las monocapas formadas a partir de soluciones β -lg (2%) + PS (0,5%)

El carácter viscoelástico de los films mixtos puede evaluarse en base a los valores de $\tan \delta$ obtenidos (**Figura II.4.3.5**). El valor de $\tan \delta$ al tiempo final de adsorción mostró valores semejantes (0,1-0,3) en presencia de los distintos polisacáridos. Todos los films presentaron un alto grado de viscoelasticidad que en conjunto con los valores altos de G' , indica que las películas mixtas poseen características típicas de un gel.

II.4.3.1.4. Discusión

En sistemas mixtos con más de un componente tensioactivo, la composición y conformación de la interfase está determinada por fenómenos de adsorción competitiva o cooperativa entre los dos tipos de biopolímeros (Rodríguez Patino et al., 2001b), y por la naturaleza de las interacciones proteína-PS, tanto en la interfase como en el seno de la fase líquida. En la concentración proteica utilizada que satura la interfase (2%), el comportamiento de los sistemas mixtos está determinado principalmente por la proteína, lo cual coincide con lo observado por Rodríguez Patino et al. (2001b) en sistemas mixtos de WPI y monoglicéridos en concentraciones de WPI de saturación de la interfase.

Durante la adsorción cooperativa de los biopolímeros en la interfase, podría esperarse un valor de presión superficial y módulo dilatacional elástico similar al dado por la suma de los valores obtenidos en los sistemas simples. Este comportamiento fue observado por Rodríguez Patino et al. (2001b) en la adsorción de mezclas de lípidos y proteínas en concentraciones menores a las de saturación, situación en la cual existe interfase disponible para ser ocupada por ambos componentes. En el presente estudio, se observó en presencia de goma xántica un comportamiento cooperativo y “sinérgico” en la presión superficial y cooperativo y casi aditivo para el K-LVF en π y G' .

De acuerdo a los resultados obtenidos aún en condiciones de saturación de la interfase, la cooperatividad se presentaría en sistemas mixtos donde el polisacárido no posee actividad interfacial (xántica) o posee muy baja (K-LVF) y se debería principalmente a fenómenos de volúmenes de exclusión e incompatibilidad en zonas cercanas a la interfase, que producen una “concentración de la proteína”, como fue descrito en la sección II.4.1. El K-LVF actúa en forma similar a la XAN. Por su bajo grado de esterificación (menor actividad interfacial) tiene pocas posibilidades de competir con la proteína por la interfase, por lo cual participaría en forma limitada de la interfase o se adsorbería sobre el film proteico por interacciones electrostáticas locales (al estar poco esterificado posee una carga neta mayor). Por otro lado al estar menos esterificado posee una mayor carga negativa que promueve un mayor grado de incompatibilidad con la proteína.

En cambio, en sistemas mixtos donde el polisacárido posee una buena actividad interfacial (MAN y K-0) el comportamiento es antagónico debido a una adsorción competitiva de los componentes en la interfase.

En presencia de λ -C los resultados son difíciles de explicar en cuanto existirían impurezas tensioactivas en el PS que afectarían el comportamiento del sistema mixto.

En la adsorción de sistemas mixtos de proteína-polisacárido pueden estar involucrados los siguientes fenómenos:

(1) Penetración de los polisacáridos (PGA) en la interfase en forma simultánea con la β -lg con la consiguiente disminución de la estructuración del film debido a (a) un menor carácter sólido de las películas de PGA, (b) un fenómeno de complejamiento interfacial (ha sido reportado previamente el complejamiento con proteínas del suero lácteo) (Ahamed y Dickinson, 1991, Dickinson y Euston, 1991, Sarker y Wilde, 1999) (c) interferencia estérica entre las moléculas adsorbidas de β -lg lo cual impide su interacción.

(2) Complejamiento del PS sobre la proteína adsorbida previamente en la interfase. Este último comportamiento sería más probable en la xántica y el K-LVF el cual se comportó de forma similar. La adsorción cooperativa involucraría principalmente el fenómeno (2) afectando la presión superficial en forma indirecta, debido a una limitada compatibilidad entre los biopolímeros y modificando las características reológicas de la película proteica.

En cambio la adsorción competitiva involucraría principalmente el fenómeno (1) afectando a la presión superficial en forma directa por penetración en la interfase e indirecta por fenómenos de incompatibilidad.

II.4.3.2. Propiedades de espumado de sistemas mixtos de β -lg y polisacáridos

Se evaluaron las características de formación y estabilidad de espumas a partir de soluciones mixtas de igual concentración que las utilizadas en el estudio de las propiedades interfaciales de las películas adsorbidas. El método utilizado para la determinación de la estabilidad de las espumas permite la evaluación de los diferentes mecanismos que intervienen en la desestabilización de espumas proteicas: drenado, colapso y desproporción (Carp et al., 1997c).

II.4.3.2.1 Medición de la viscosidad de las soluciones

Un parámetro que afecta fuertemente las características de las espumas estabilizadas por biopolímeros, es la viscosidad de la fase continua. En la sección anterior se mostraron los coeficientes de consistencia de soluciones de polisacáridos al 0,5%. Las soluciones de PGA presentaron un índice de consistencia cercano a 1, y no presentaron umbral de corte. En el caso de λ -C y XAN, se observó un comportamiento pseudoplástico ($n < 0,75$) y XAN presentó un umbral de corte significativo.

Al evaluar el comportamiento de las soluciones de β -lg (2%) y β -lg (2%)+ PS (0,5%) se observó un bajo valor del índice de flujo ($n = 0,31$) sólo en el caso de la goma xántica (**Tabla II.4.3.4**), indicando las características pseudoplásticas de este sistema. En presencia de K-LVF, MAN y λ -C, se observó un aumento considerable en el coeficiente de consistencia (K) respecto de la solución de β -lg sola. En las soluciones con goma xántica se observaron altos valores de coeficiente de consistencia (K) y umbral de fluencia (τ_0), relacionados a las características propias del polisacárido, que presenta una alta hidrofiliidad, alto peso molecular y una conformación rígida de sus moléculas en solución con un alto grado de orientación.

La viscosidad aparente, calculada como : $\mu_{ap} = \tau / \dot{\gamma}$, evaluada a una velocidad de corte de 60 s^{-1} , mostró el siguiente orden para las soluciones mixtas de acuerdo al polisacárido presente: XAN> λ -C>K-LVF>MAN>K-0, de igual forma que lo observado para las soluciones de polisacáridos solos (**Tabla II.4.2.2 y II.4.2.4**). Se calculó la viscosidad predicha para los sistemas mixtos (**Tabla II.4.3.4**), como la suma de las viscosidades de los sistemas solos en relación 1:1, obteniéndose valores mayores a los hallados experimentalmente en todos los casos excepto con goma xántica. La disminución de la viscosidad experimental respecto de la predicha puede deberse a un fenómeno de complejamiento entre las moléculas de los biopolímeros, de manera que el sistema se vuelve menos afín con las moléculas de agua. En el sistema con goma xántica, se observó el fenómeno contrario: la viscosidad de la solución mixta fue mayor a la predicha, lo que estaría indicando una limitada compatibilidad entre las moléculas de ambos biopolímeros en solución. Este comportamiento ha

sido observado previamente en sistemas mixtos de proteínas de soja con goma xántica (Carp et al., 1997b) y en soluciones mixtas de WPI/xántica (Sánchez et al., 1997).

Tabla II.4.3.4 Parámetros de flujo de las soluciones mixtas de β -lg + PS (2%/0,5%) obtenidos a partir de la ecuación de Herschel-Buckley. τ_0 = umbral de corte, K= coeficiente de consistencia, n= índice de flujo.

Sistema	τ_0 (D cm ⁻²)	K	n	R ²	$\mu_{ap}(60s^{-1})$ experimental (cp)	$\mu_{ap}(60s^{-1})$ predicho (cp)
β -lg sola	-	0,01095	1,01	0,996	1,08	
β -lg/K-0		0,05953	0,96	0,999	4,85	5,80
β -lg/K-LVF		0,14	0,94	0,999	10,92	15,67
β -lg/ MAN		0,1213	0,95	0,999	9,85	12,94
β -lg/ λ -C	1,0	0,4366	0,91	0,986	31,79	40,81
β -lg/XAN	27,4	14,75	0,31	0,998	132,84	112,71

En

los sistemas con PGA y λ -C, podría ocurrir cierto grado de complejamiento entre las moléculas de ambos biopolímeros. Se ha sugerido la formación de complejos entre polisacáridos sulfatados y PGA con proteínas aún a pH neutro (Ahamed & Dickinson, 1991, Dickinson, 2003).

II.4.3.2.2 Capacidad de espumado

En la **Figura II.4.3.6** se muestra la expansión de la espuma (%FE) a 25 °C para los sistemas de β -lg sola (2%) y mixtos β -lg/PS (2%/0,5%). En el sistema de β -lg sola se observó una expansión de más del 150 % para la concentración utilizada.

En estudios previos realizados en proteínas globulares se ha sugerido que dos propiedades importantes a tener en cuenta en la formación de una espuma son la velocidad de adsorción de las moléculas del tensioactivo y la elasticidad del film (Martin et al, 2002). En la sección anterior se observó que si bien las soluciones con más de 0,5% de β -lg presentan una mayor velocidad de adsorción y mayores valores finales de presión superficial, solo a partir de un 2% de proteína se obtienen películas con altos valores de elasticidad, lo que concuerda con las características de espumado y estabilidad observadas a esta concentración de proteína. En soluciones con una menor concentración de β -lg se observó un bajo volumen de espuma y estabilidad.

En presencia de los polisacáridos se observó una notable disminución en la capacidad de espumado de las soluciones (**Fig. II.4.3.6**) debido al aumento de la viscosidad de las soluciones que impide la incorporación de aire. Sin embargo, la capacidad de espumado no disminuyó en el mismo orden de magnitud de aumento de viscosidades, ya que por ejemplo en el sistema con manucol se obtuvo menor volumen de espuma que con λ -C, presentando éste último mayor viscosidad.

En la sección anterior se observó que para soluciones de PGA solos la capacidad de espumado varió entre 100 y 115% (**Tabla II.4.2.3**), y los valores de presión superficial máximos fueron de 10 mN/m al 0,5%. Por lo tanto, además del efecto de la viscosidad, la disminución en la capacidad de espumado observada en presencia de los PGA podría deberse a la adsorción competitiva de los mismos en la interfase, reemplazando parcialmente a la proteína. Esto resultaría en una disminución en la capacidad de espumado debido a que los polisacáridos poseen una menor actividad interfacial que la proteína.

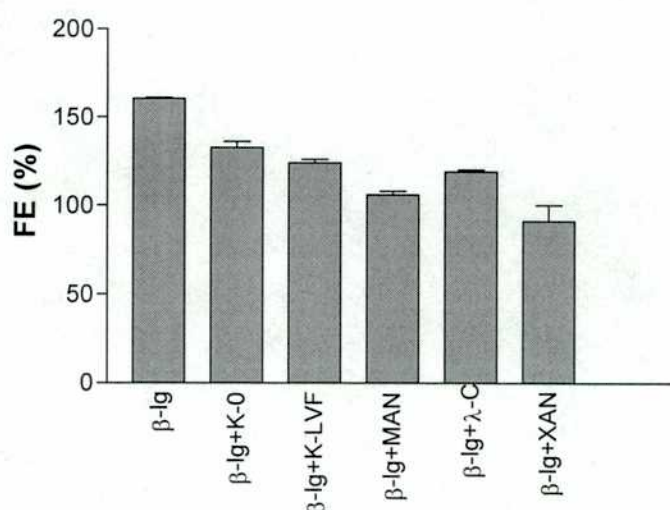


Figura II.4.3.6 Expansión de espumas formadas a partir de soluciones de β -lg (2%) y polisacáridos (0,5%)

Estudios previos demuestran el efecto predominante de la viscosidad de las soluciones en la capacidad de espumado. Carp (2001), observó una importante disminución en la expansión de espumas de aislado de proteína de soja (2%) en presencia de goma xántica y κ -carragenano. Inclusive en soluciones de proteínas solas se ha observado que la capacidad de espumado aumenta con la concentración hasta un valor límite, pero luego decrece con un mayor aumento de la concentración. Este fenómeno se ha asociado a la alta incorporación de líquido en las lamelas de la

espuma, que limita la cantidad de líquido disponible, por lo cual no se produce un ulterior aumento del volumen de espuma (Carp et al., 1997c).

II.4.3.2.3 Drenado de líquido de las espumas

El drenado de líquido de las espumas es uno de los factores involucrados en la desestabilización de las mismas, y uno de los que ha recibido mayor tratamiento teórico. Frecuentemente se han utilizado constantes de velocidad o tiempos medios de drenado para caracterizar este fenómeno. En la **Figura II.4.3.7** se muestran las curvas obtenidas para el drenado de líquido de las espumas mixtas de β -lg (2%) y polisacáridos (0,5%). El punto en el cual la curva llega a un "plateau" representa la máxima cantidad de líquido que puede drenar.

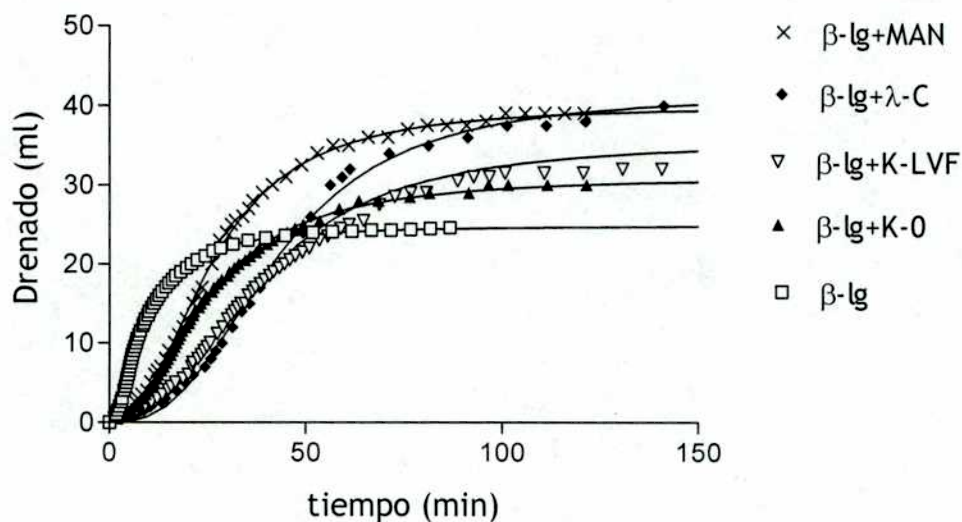


Figura II.4.3.7 Curvas de drenado de líquido de las espumas formadas a partir de soluciones de β -lg 2% y polisacáridos 0,5 %

Para describir las curvas de drenado se utilizaron las Ecuaciones II.4.2.4 y II.4.2.5. Los valores de los parámetros obtenidos se muestran en la **Tabla II.4.3.5**. La espuma formada a partir de la solución mixta β -lg + XAN no presentó drenado de líquido durante el tiempo de medición, por lo que el valor de velocidad de drenado se indica como tendiente a cero.

En presencia de todos los polisacáridos se observó una disminución en la velocidad de drenado (**Tabla II.4.3.5**). El aumento de la estabilidad al drenaje de las espumas en presencia de

polisacáridos puede atribuirse principalmente a un aumento en la viscosidad de la fase continua, especialmente cuando existe umbral de fluencia (Walstra, 1989), como ocurre con la goma xántica.

La velocidad de drenado disminuyó en el orden: β -lg > β -lg+K0 > β -lg+MAN > β -lg+KLVF > β -lg+ λ -C >> β -lg+XAN . Puede observarse que los valores de la constante de velocidad k_{dr} presentaron una alta correlación con los índices de consistencia de las soluciones. El volumen final drenado mostró el siguiente orden: β -lg + λ -C $\approx$ β -lg + MAN > β -lg + KLVF > β -lg + K-0, que se correlaciona con la capacidad de espumado de las espumas, esto es, a mayor expansión de la espuma, se observa menor líquido drenado final.

Tabla II.4.3.5 Parámetros de ajuste de las curvas de drenado y velocidad de drenado de líquido de las espumas

Sistema	a	n	C	R ²	k_{dr} (ml.min) ⁻¹
β -lg	24,90	1,748	45,29	0,9986	7,9245 10 ⁻³
β -lg + K-0	31,09	2,076	770,8	0,9990	2,7163 10 ⁻³
β -lg + K-LVF	35,60	2,417	799	0,9305	1,7628 10 ⁻³
β -lg + MAN	40,04	2,32	1887	0,9984	2,244 10 ⁻³
β -lg + λ -C	41,38	2,746	29680	0,9968	1,5602 10 ⁻³
β -lg + XAN					→ 0

II.4.3.2.4 Método para la evaluación simultánea de drenado, colapso y desproporción de las espumas

Viscosidad aparente de las espumas

En la **Figura II.4.3.8** se muestran las curvas de viscosidad aparente de las espumas en función del tiempo para los distintos sistemas. Las viscosidades aparentes de las espumas fueron mucho mayores a las de las soluciones utilizadas en su formación, tanto en el caso de la β -lg sola o en los sistemas mixtos. Este fenómeno está determinado por diferentes factores: la viscosidad superficial del film que rodea las burbujas, la cantidad de aire en la espuma (relación con el tamaño de

burbujas) y la cantidad del líquido en la lamela y su viscosidad (Wilde y Clark, 1996). Los films proteicos tienen en general altas viscosidades superficiales, lo que refleja que la energía requerida para mover las moléculas en el mismo es muy alta (Kinsella y Phillips, 1989).

En la **Figura II.4.3.8** se observa que la viscosidad aumenta inicialmente hasta alcanzar un máximo y luego disminuye con el transcurso del tiempo. La fracción de líquido en la espuma ha sido relacionada inversamente con su viscosidad aparente, dado que un aumento en el líquido en la lamela incrementa la fluidez de la espuma. Este comportamiento indica que es razonable atribuir la primera etapa de las curvas principalmente al drenaje de líquido. La desproporción por difusión de gas entre burbujas es significativa sólo después de haberse alcanzado un espesor crítico del film (Yu y Damodaran, 1991). La desproporción de la espuma, que provoca una reducción del área interfacial y consecuentemente aumenta la relación gas/interfase, causa una disminución de la viscosidad aparente de la espuma. Por lo tanto, la segunda etapa de la curva, en la que se observa una disminución de la viscosidad con el tiempo, se atribuye al proceso de desproporción. La máxima viscosidad alcanzada y el tiempo en que se logra este máximo, es función de un balance entre los procesos de drenaje de líquido y desproporción, que tienen efectos contrapuestos sobre la viscosidad aparente de la espuma (Carp et al., 1997c).

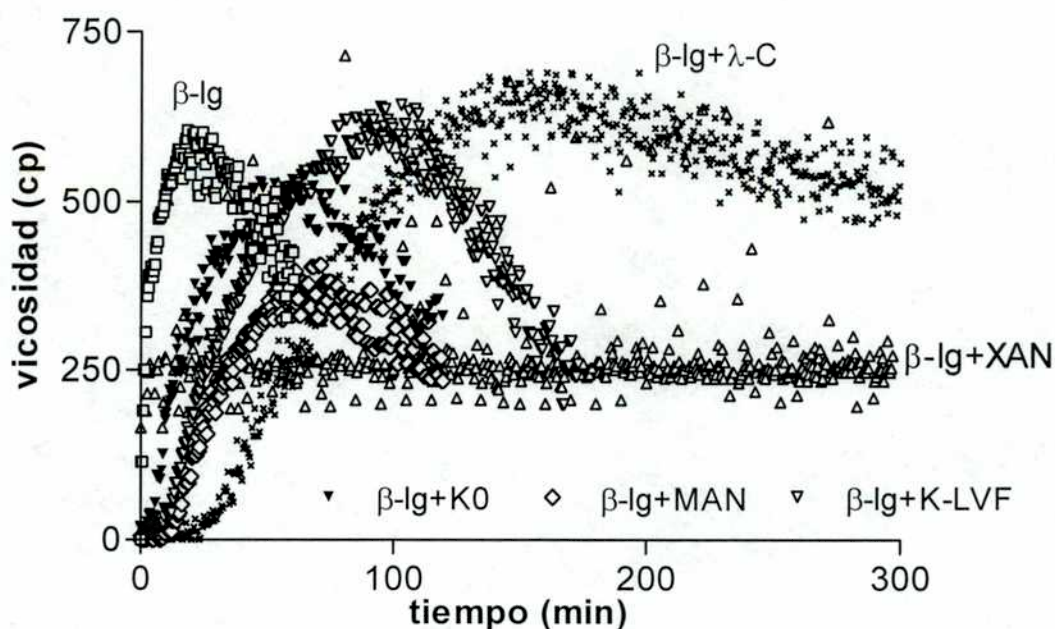


Figura II.4.3.8 Viscosidad aparente de las espumas en función del tiempo, determinada por el método reológico

Puede observarse en la **Figura II.4.3.8** que las curvas de viscosidad aparente de las espumas mixtas difieren notablemente de la de β -lg sola. En presencia de K-0 y MAN se observó una disminución en el valor máximo de viscosidad aparente alcanzado mientras que con K-LVF y λ -C se observó un aumento en este valor.

En presencia de todos los polisacáridos se observó un corrimiento del máximo de viscosidad a tiempos mayores, indicando que el comienzo de la etapa de desproporción se produciría a tiempos mayores en presencia de los mismos.

Modelo cinético para describir la evolución de la viscosidad aparente con el tiempo

Para caracterizar la velocidad de drenado y desproporción de las espumas que se vinculan con la etapa de aumento y disminución de la viscosidad aparente de las espumas en función del tiempo, se utilizó el siguiente modelo cinético, que incluye dos pasos consecutivos para la evolución de la viscosidad aparente con el tiempo (Carp et al, 1997c):

$$\mu_{ap} = a \cdot (\exp(-k_2 \cdot t) - \exp(-k_1 \cdot t^{1.5})) \quad \text{Ec (II.4.3.3)}$$

donde μ_{ap} es la viscosidad aparente en el tiempo t ; a es un parámetro característico de la curva relacionado con la viscosidad máxima que se alcanza; k_2 es la constante relacionada con la desproporción, correspondiente a la disminución de la viscosidad y k_1 es la constante relacionada con el drenaje, correspondiente al aumento de viscosidad.

Tabla II.4.3.6 Parámetros de ajuste de las curvas de viscosidad aparente de las espumas vs tiempo para la determinación de velocidades de drenado (k_1) y desproporción (k_2).

Sistema	A	k_1 ($\text{min}^{-1.5}$)	$k_2 \cdot 10^3$ (min^{-1})	R^2
β -lg	621,1	0,1247	6,114	0,8327
β -lg + K-0	781,7	0,008209	6,872	0,9325
β -lg + K-LVF	1561	0,003245	9,282	0,9389
β -lg + MAN	979,9	0,004223	11,28	0,9684
β -lg + λ -C	1067	0,001678	39,33	0,9674

Las constantes de velocidad de drenado en la **Tabla II.4.3.6** (k_1), siguen la tendencia de las calculadas mediante la medición directa del volumen drenado con el tiempo, aunque en este caso la

diferencia entre los valores de velocidad de drenado de las espumas de proteína sola y en presencia de los polisacáridos es mucho mayor. La gran disminución en la velocidad de drenado de las espumas se debería principalmente a la alta viscosidad de la fase continua, como fue mencionado anteriormente. Puede observarse que el orden creciente de las velocidades de drenado coincide con el orden decreciente de viscosidades de las soluciones, siendo este último: $\beta\text{-lg} < \beta\text{-lg} + \text{K0} < \beta\text{-lg} + \text{Man} < \beta\text{-lg} + \text{Klvf} < \beta\text{-lg} + \lambda\text{-C}$. El sistema con goma xántica no figura en la Tabla, debido a que como se mostró en la **Figura II.4.3.8**, la curva de viscosidad aparente en función del tiempo muestra un valor constante.

La velocidad de desproporción de las espumas (k_2) mostró un aumento respecto del valor obtenido para $\beta\text{-lg}$ sola. Por lo tanto, el corrimiento del máximo de viscosidad aparente hacia mayores tiempos indicaría el retardo en el inicio del mecanismo de desproporción, pero una vez comenzado este proceso, se vería aumentado en presencia de los polisacáridos.

II.4.3.2.5 Colapso de las espumas

Se graficó el volumen de espuma colapsado en función del tiempo para los diferentes sistemas (**Figura II.4.3.9**). El colapso de las espumas se asocia a un fenómeno de ruptura del film por una reducción en el espesor de las lamelas. Cuando la lamela alcanza un espesor lo suficientemente fino (espesor crítico), el film se rompe dando lugar al fenómeno de coalescencia, que lleva al colapso o disminución del volumen de la espuma.

En la evaluación del colapso de las espumas, se determinaron diferentes parámetros:

Tiempo de inicio de colapso: Es el tiempo a partir del cual se observa una disminución en el volumen de la espuma.

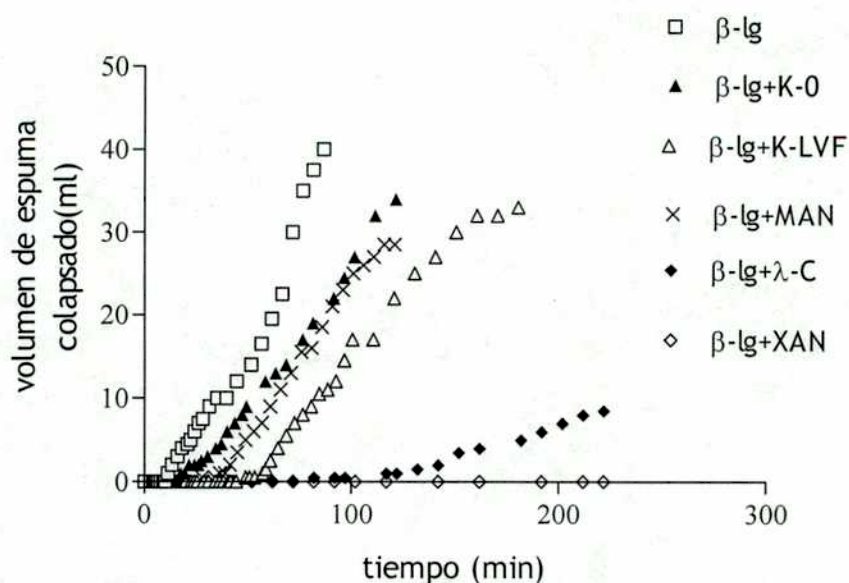
Constante de velocidad evaluada a partir de las curvas de colapso: La constante de velocidad se calculó mediante una regresión lineal del volumen de espuma colapsado vs tiempo. Los resultados de este ajuste lineal se muestran en la **Tabla II.4.3.7**. El ajuste de las curvas se realizó a partir del tiempo de inicio de colapso, ya que en la mayoría de los sistemas se observó un tiempo lag en el cual no se observó colapso, que está relacionado al tiempo necesario para la obtención de un espesor crítico de lamelas debido a la reducción de líquido en las mismas.

En la **Tabla II.4.3.7** puede observarse que en presencia de los polisacáridos se obtuvo una disminución en la velocidad de colapso excepto en el caso del Manucol, en donde se observó un leve ascenso. En las espumas con goma xántica no se observó colapso de las espumas durante el tiempo de medida, por lo que la velocidad de colapso se indica como tendiente a cero.

Tabla II.4.3.7 Velocidad de colapso de las espumas

Sistema	k_{colapso} (ml/min)	R^2
β -lg	0,3516	0,9839
β -lg + K-0	0,3060	0,9901
β -lg + K-LVF	0,3058	0,9936
β -lg + MAN	0,3767	0,9968
β -lg + λ -C	0,0747	0,9890
β -lg + XAN	$\Rightarrow 0$	

Como puede observarse en la **Figura II.4.3.9**, las curvas de colapso de las espumas presentan un periodo “lag” antes de comenzar con el colapso que es también un indicador de la estabilidad de las espumas. En la **Figura II.4.3.10** se compara este tiempo para los diferentes sistemas, observándose que en presencia de los polisacáridos se retardó notablemente el inicio del colapso de las espumas, aunque según lo indicado en la **Tabla II.4.3.7**, una vez comenzado este fenómeno no se obtuvo una gran disminución de la velocidad en presencia de PGA.

**Figura II.4.3.9** Volumen colapsado en función del tiempo en espumas de β -lg sola (2%) y en espumas mixtas de β -lg (2%)+ PS (0,5%)

Puede observarse que los fenómenos de desproporción y colapso no mostraron la misma tendencia. En presencia de los polisacáridos se produjo un aumento en la velocidad de desproporción, en cambio se observó una disminución en la velocidad de colapso.

Los fenómenos de estabilización de las espumas frente al drenado y el retardo en el comienzo del colapso estarían asociados a los fenómenos de estabilización de las monocapas, mostrados anteriormente al estudiar las propiedades de las interfases. En estudios previos se han observado fenómenos similares en espumas estabilizadas por WPI en presencia de polisacáridos. En sistemas mixtos de WPC/pectina el aumento observado en la estabilidad al drenado de espumas fue atribuido a un aumento de la viscosidad de la fase continua (Mishra et al., 2001). Los efectos observados en sistemas mixtos de aislados de soja/XAN, fueron atribuidos a un aumento de la viscosidad de la fase continua y a la presencia de interacciones específicas entre las goma y la proteína adsorbida (Carp et al., 1999).

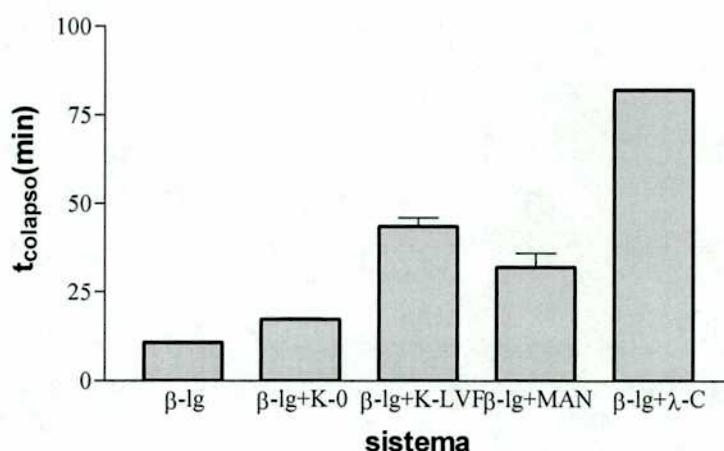


Figura II.4.3.10 Tiempo de inicio del colapso en espumas de $\beta\text{-lg}$ sola (2%) y en espumas mixtas de $\beta\text{-lg}$ (2%)+ PS (0,5%)

En sistemas mixtos de proteínas y polisacáridos, la formación y estabilización primaria de la espumas se produce por la rápida adsorción de la proteína en la interfase. En presencia de polisacárido se ha sugerido la formación de una capa “secundaria” que se formaría sobre la proteína adsorbida, por efecto de las interacciones proteína-polisacárido en la interfase. La formación de esta “capa secundaria” de polisacárido sobre la de proteína adsorbida produciría un mejoramiento de las propiedades mecánicas del film y una disminución en el líquido drenado (Dickinson, 1995, Dickinson & Euston, 1991), lo que se refleja en un aumento de la estabilidad de la espuma frente al drenado (disminución en la velocidad) y al colapso (aumento de tiempo de inicio).

En espumas estabilizadas por proteínas se ha postulado que el efecto estabilizador de los polisacáridos en condiciones de limitada incompatibilidad estaría dado principalmente por un aumento en la viscosidad local en la lamela, lo que disminuye el drenado, y por un aumento en el espesor del film mixto, lo que produce una estabilización estérica inhibiendo la coalescencia de las burbujas (Dickinson y Izgi, 1996, Girard et al., 2002).

II.4.3.2.6 Correlación entre las características de las interfases y las propiedades de las espumas en los sistemas mixtos β -lg + polisacáridos

Si bien las propiedades espumantes de una proteína están relacionadas a su habilidad para formar una película interfacial, no existe una relación directa entre la actividad superficial y las propiedades y estabilidad de las espumas (Clark et al., 1987). La determinación de posibles correlaciones entre las características de películas y espumas resulta de gran interés para un adecuado control de estos sistemas.

Se correlacionaron las constantes de estabilidad de espumas para los sistemas mixtos de β -lg (2%) + PS (0,5%) (velocidades de drenado, desproporción, colapso y tiempo de inicio de colapso) con las características de las interfases estudiadas por el tensiómetro de gota y viscosidad. Las propiedades de las interfases (π , $\tan \delta$, G') se evaluaron a los 5000 s de adsorción. En el caso del módulo elástico se consideró además el valor obtenido del ajuste de las curvas de desarrollo con el tiempo ($G'_{\max}$ en la **Tabla II.4.3.3**).

Las correlaciones se realizaron para los sistemas conteniendo los diferentes PGA y λ -C. La goma xántica no fue incluida en este análisis debido a que en este sistema no se observó colapso o drenado.

Las regresiones simples y múltiples se realizaron por medio del programa Statgraphics Plus.

El porcentaje con el que cada parámetro explica el comportamiento de las espumas para cada mecanismo de desestabilización (R^2) se indica en la **Tabla II.4.3.8**. Como puede verse, las variables que explicaron en mayor medida la estabilidad de las espumas fueron el módulo elástico de los films y la viscosidad de las soluciones a partir de las cuales se formaron las espumas. El módulo elástico tuvo un efecto importante en la velocidad de drenado. Esto indicaría que un alto grado de estructuración o carácter sólido del film, dado por G' , es un factor clave en la retención del agua de la espuma.

La velocidad de colapso mostró una alta correlación con la viscosidad de las soluciones, y el tiempo de inicio de colapso se correlacionó además con la elasticidad dilatacional.

Tabla II.4.3.8 Resultados (R^2) de las correlaciones simples entre característica interfaciales y propiedades de estabilidad de espumas

Parámetro	μ	G'_{5000}	G'_{max}
k_{dr}		82,19	
k_{dr2}		72,27	
k_{despr}			65
k_{col}	84,27		
$t_{colapso}$	97,18	81,6	

La velocidad de desproporción mostró una relativamente alta correlación con G'_{max} . Esto podría deberse a que este fenómeno se manifestó a tiempos largos, aún mayores a los 5000 segundos correspondientes a los valores de G'_{5000} .

Las correlaciones entre las propiedades de interfase y viscosidad y los parámetros característicos de estabilidad de las espumas se indican a continuación:

$$k_{dr} = 0,01696 - 0,0002573 G'_{5000}$$

$$k_{dr2} = 0,29 - 0,00491 G'_{5000}$$

$$k_{despr} = 0,0257 - 0,000242 G'_{max}$$

$$k_{col} = 0,3915 - 0,00927 \mu$$

$$t_{col} = 9,821 + 2,331 \mu$$

De estas ecuaciones puede observarse que la velocidad de drenado disminuye con un aumento en el G' (5000 s). La velocidad de colapso disminuye y aumenta el tiempo de inicio de colapso con una mayor viscosidad de la fase continua. El módulo de elasticidad obtenido por extrapolación a tiempos largos de adsorción (G'_{max}) mostró en general valores menores a los obtenidos para las espumas de β -lg sola, lo que resulta en un aumento en la velocidad de desproporción según la ecuación de correlación. Esto es coherente con el aumento en la velocidad de desproporción observado en presencia de los polisacáridos (Tabla II.4.3.6).

Los resultados de las correlaciones coinciden con estudios previos realizados en espumas de β -lg (0,5%), en los que se observó una buena correlación entre la estabilidad de las espumas y las propiedades reológicas de la película interfacial (Rodríguez Patino et al., 1995), factores claves a considerar para un adecuado control de la estabilidad de espumas mixtas.

II.5

Conclusiones

II.5 CONCLUSIONES

En las condiciones de saturación interfacial del presente trabajo, la interfase aire-agua está dominada principalmente por la β -lactoglobulina. Tanto a través del estudio de monocapas esparcidas como adsorbidas se concluye que ya sea los polisacáridos que poseen actividad interfacial (PGA) como los que no la poseen (XAN) participan a través de diferentes mecanismos de la interfase modificando tanto la presión superficial como las propiedades reológicas de las mismas. El comportamiento del λ -C se encuadra en primera instancia en el de los polisacáridos sin actividad interfacial; sin embargo debido a la presencia de actividad interfacial “espúrea”, la interpretación de los resultados no puede ser conclusiva.

Al estudiar el efecto de los polisacáridos en monocapas esparcidas de β -lg se observó en general un aumento de la presión superficial y una disminución de la elasticidad y módulo dilatacional elástico en presencia de los polisacáridos. Bajo esta aproximación experimental, el Manucol ester fue el que mostró una mayor actividad superficial entre los PGA dado que produjo el mayor aumento de la presión superficial, “obligando” a la β -lg a adoptar rápidamente la estructura 2 y produciendo la mayor reducción en el módulo dilatacional elástico.

Bajo una aproximación experimental dinámica (tensiómetro de gota), donde tanto la proteína como el polisacárido pueden adsorberse en forma simultánea en la interfase, también se observó que el Manucol ester es el PGA que más participa en la interfase ya que presentó una adsorción más competitiva con la β -lg.

La comparación de los resultados dinámicos con los obtenidos en monocapas adsorbidas debería realizarse a tiempos largos de adsorción (de equilibrio), en donde la monocapa proteica se encontraría ya formada y estructurada. Esta situación es reflejada por los valores finales de G' obtenidos por ajuste de las curvas de desarrollo de G' ($G'_{\max}$ en la **Tabla II.4.3.3**). Puede observarse una disminución del módulo elástico de las películas en presencia de los PGA, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en monocapas esparcidas.

En particular, el Manucol ester debido a su mayor adsorción entre los PGA es el que produce películas con menor estructuración. Esto se observa tanto en los ensayos dinámicos dado que produce el $G'_{\max}$ más bajo, como en los estudios de monocapas esparcidas donde el Manucol dió los menores valores de módulo dilatacional elástico y de elasticidad.

La mayor habilidad del Manucol frente a los otros PGA para penetrar en la interfase en presencia de β -lg radica en su estructura molecular, ya que posee un alto grado de esterificación, y por lo tanto de hidrofobicidad, que le permite adsorberse fácilmente en la interfase aire-agua y a su

vez posee un peso molecular grande que genera una mayor incompatibilidad con la proteína. Por ello puede actuar sobre la presión superficial en forma directa (porque penetra en la interfase) o indirecta, a través de aumentar la concentración efectiva de la proteína.

En el otro extremo, el K-LVF, debido a su bajo nivel de esterificación/hidrofobicidad y su alto peso molecular, actuaría principalmente en forma indirecta por fenómenos de incompatibilidad con la β -lg, en forma similar a la xántica que no posee actividad interfacial. El grado de incompatibilidad del K-LVF con la β -lg sería mayor debido a su mayor carga negativa por el bajo grado de esterificación.

Con respecto a la xántica, ambos enfoques experimentales muestran que aún sin penetrar en la interfase, este polisacárido tiene una enorme influencia en la misma, derivada principalmente de un posible complejamiento sobre la proteína en la monocapa y de fenómenos de limitada incompatibilidad tanto en el seno de la solución como en la interfase que se manifiestan en aumentos de la presión superficial y en efectos sobre el carácter viscoelástico y elasticidad de las monocapas de proteína.

Por contribuir además con una alta viscosidad a la fase continua, las espumas de β -lg formadas en presencia de este polisacárido presentan una enorme estabilidad.

Es evidente a partir de los resultados obtenidos que no se puede predecir en forma simple el efecto de los polisacáridos en las propiedades interfaciales de una proteína debido a la existencia de por lo menos tres fenómenos: (a) Incompatibilidad entre los biopolímeros (b) fenómenos competitivos o cooperativos (c) interacciones específicas de complejamiento a través de ciertas regiones de la molécula del PS y de la proteína.

Finalmente se ha demostrado que las características reológicas de la película interfacial tienen una profunda influencia en la estabilidad de las espumas

Referencias

- AGUILERA, J.M. (1993) Viscoelastic properties of mixed dairy gels. *Food Research International*, **26**, 11-17 .
- AGUILERA, J. M. & STANLEY, D. W.(1999) Microstructural principles of food processing and engineering. Ed. por Aguilera, J. M. y Stanley, D. Aspen Publishers, Maryland.
- AHMED, M. & DICKINSON, E. (1991) Foaming solutions of protein + propylene glycol alginate. *Food Hydrocolloids*, **91**, 395-402.
- ALTING, A., HAMER, R., DE KRUIF, C., PAQUES, M. & VISSCHERS, R. (2003) Number of thiol groups rather than the size of the aggregates determines the hardness of cold set whey protein gels. *Food Hydrocolloids*, **17**, 469-479
- APENTEN, R., KHOKHAR, S. & GALANI, D. (2002) Stability parameters for β -lactoglobulin thermal dissociation and unfolding in phosphate buffer at pH 7.0. *Food Hydrocolloids*, **16**, 95-103
- AYMARD, P., DURAND, D. & NICOLAI, T. (1996) The effect of temperature and ionic strength on the dimerisation of β -lactoglobulin, *International Journal of Biological Macromolecules*, **19**, 213-221.
- BARBUT, S. (1996). "Determining water and fat holding". En: Methods of testing protein functionality, editado por Hall, G. M., Blackie Academic & Professional, London, UK. Capítulo 7, 186-225.
- BAUER, R, HANSEN, S. & ØGENDAL, L. (1998) Detection of intermediate oligomers, important for the formation of heat aggregates of β -lactoglobulin. *International Dairy Journal*, **8**, 105-122
- BAUER, R., CARROTTA, R., RISCHER, C. & ØGENDAL, L. (2000) Characterization and isolation of intermediates in β -lactoglobulin heat aggregation at high pH. *Biophysical Journal*, **79**, 1030-1038
- BEAULIEU, M., TURGEON, S. & DOUBLIER, J-L. (2001) Rheology, texture and microstructure of whey proteins/low methoxyl pectins mixed gels with added calcium. *International Dairy Journal*, **11**, 961-967
- BENJAMINS, J., CAGNA, A. & LUCASSEN-REYNDERS, E. (1996) Viscoelastic properties of triacylglycerol/water interfaces covered by proteins. *Colloids Surfaces A*, **114**, 245-254.
- BORCHARDT, H. J. & DANIELS, S. F. (1957) Application of differential thermal analysis to study of reaction kinetic. *Journal of the American Chemical Society*, **79**, 41-46
- BOTTCHER, S. & FOEGEDING, E. (1994) Whey protein gels: fracture stress and strain and related microstructural properties. *Food Hydrocolloids*, **8**, 113-123.
- BOURNE, M. C. (1982) "Principles of objective texture measurements". En : Food texture and viscosity: concept and measurements. Academic Press, N. Y., capítulo 3, 4-117.
- BOWLAND, E. & FOEGEDING, E. (1995a) Effect of anions on thermally induced whey protein isolate gels. *Food Hydrocolloids*, **9**, 47-56.

- BOWLAND, E; FOEGEDING, E. & HAMANN, D. (1995b) Rheological analysis of anio-induced matrix transformations in thermally induced whey protein gels. *Food Hydrocolloids*, **9**, 57-64
- BOX, G. & DRAPPER, N. (1987) Empirical Model-Building and response surfaces, Wiley, New, York.
- BOYLE, J. I. & ALLI, I. (2000) Thermal denaturation of mixtures of α -lactalbumin and β -lactoglobulin: a differential scanning calorimetry study. *Food Research International*, **33**, 673-682.
- BROWNSEY, G., J. & MORRIS, V. J. (1988) "Mixed and filled gels: models for foods". En: Food structure: its creation and evaluation. London: Butterworsth, 7-23.
- BRYANT, C. & McCLEMENTS, D. (2000) Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denatured whey protein solutions and gels. *Food Hydrocolloids*, **14**, 383-390.
- BUROVA, T., GRINBERG, N., GRINBERG, V. Ya., LEONTIEV, A. L. & TOLSTOGUZOV, V. B. (1992) Effects of polysaccharides upon the functional properties of 11S globulin of broad beans, *Carbohydrate Polymers*, **18**, 101-108
- CAIROLI, S., IAMETTI, S. & BONOMI, F. (1994) Reversible and irreversible modifications of β -lactoglobulin upon exposure to heat. *Journal of Protein Chemistry*, **13**, 347-354.
- CAPRON, I., NICOLAI, T. & DURAND, D. (1999) Heat induced aggregation of β -lactoglobulin in the presence of κ -carrageenan. *Food Hydrocolloids*, **13**, 1-5.
- CARRERA SANCHEZ, C. (2000) "Estructura, estabilidad, morfología y características reológicas de películas de proteínas y lípidos". Tesis de Doctorado. Universidad de Sevilla. España.
- CARP, D. J.; BARTHOLOMAI, G. B. & PILOSOF, A. M. R.(1997a) A kinetic model to describe liquid drainage from soy protein foams over an extensive protein concentration range. *Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie*, **30**, 253-258
- CARP, D.J., ELIZALDE, B.E., BARTHOLOMAI, G.B. & PILOSOF, A.M.R. (1997b). "Foaming properties of soy proteins as affected by xanthan gum". En: Engineering & Food, editado por Jowitt, R., Academic Press,UK, 69-72
- CARP, D.J., WAGNER, J., BARTHOLOMAI, G.B. & PILOSOF, A.M.R. (1997c).Rheological method for kinetics of drainage and disproportionation of soy protein foams. *Journal of Food Science*, **62**, 1105-1109
- CARP,D.J., BARTHOLOMAI, G.B. & PILOSOF, A.M.R. (1999). Electrophoresis studies for determining soy proteins-xanthan gum interactions in foams. *Colloids and Surfaces.B*, **12**, 309-316.
- CARP,D.J., BARTHOLOMAI, G.B., RELKIN, P. & PILOSOF, A.M.R. (2001a). Effects of denaturation on soy protein-xanthan interactions: comparison of a whipping-rheological and a bubbling method. *Colloids and Surfaces.B*, **21**, 163-171.

- CARP, D. J. (2001b). "Formación y estabilidad de espumas de proteínas de soja: efecto de la desnaturalización térmica y de la interacción con polisacáridos". Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- CAYOT, P. & LORIENT, D. (1996) "Structure-Function relationships of whey proteins". En: Food Proteins and their applications, editado por Damodaran, S. y Paraf, A. Marcel Dekker, NY., 225-256
- CHEFTEL, J. C ; CUQ, J. L. & LORIENT, D. (1989a). "Los principales sistemas proteicos alimentarios". En: Proteínas alimentarias, editado por Cheftel, J. C ; Cuq, J. L. y Lorient, D., Editorial Acirbia, Zaragoza, España. Capítulo 6, 141-166.
- CHEFTEL, J. C ; CUQ, J. L. & LORIENT, D.(1989b). "Propiedades funcionales de las proteínas". En: Proteínas alimentarias, editado por Cheftel, J. C ; Cuq, J. L. y Lorient, D., Editorial Acirbia, Zaragoza, España. Capítulo 4, 49-105.
- CLARK, D., MINGINS, J., SLOAN, F., SMITH, L. & WILSON, D. (1987) "The formation and breakdown of protein-stabilized foams". En: Food Emulsions and Foams, editado por Dickinson, E. The Royal Society of Chemistry, London, 110-127.
- DAMODARAN, S. & SONG, K. B. (1988) Kinetics of adsorption of protein at interfaces: role of protein conformation in diffusional adsorption. *Biochim. Biophys. Acta*, **954**, 253-264
- DAMODARAN, S. (1989) "Film properties of modified proteins". En: Food Proteins, editado por Kinsella, J., Soucie, W. The AOCS-Champaign, IL, 78-99.
- DAMODARAN, S. & PARAF, A. (1992) Food Proteins and their applications. Marcel Dekker, New York.
- DAMODARAN, S. (1996) "Functional Properties". En: Food Proteins. Properties and Characterization, editado por Nakai, S., Modler, H. M., VCH Publishers, New York, 167-234.
- DAMODARAN, S. (1997) "Protein stabilized foams and emulsions". En: Food Proteins and their applications, editado por Damodaran, S. y Paraf, A. Marcel Dekker, NY, 57-110.
- DARLING, D. F. & BIRKETT, R. J.(1987) "Food Colloids in Practice". En: Food Emulsions and foams, editado por Dickinson, E. The Royal Society of Chemistry, London, 1-29
- DE FEIJTER, J. & BENJAMINS, J. (1987) "Adsorption kinetics of proteins at the air-water interface". En: Food Emulsions and foams, editado por Dickinson, E. The Royal Society of Chemistry, London, 72-85.
- DE LA FUENTE, M., SING, H., HEMAR, Y (2002) Recent advances in the characterization of heat-induced aggregates and intermediates of whey proteins. *Trend in Food Science & Technology*, **13**, 262-274
- DE WIT, J.N. & SWINKELS G. A. M. (1980) A differential scanning calorimetric study of the thermal denaturation of bovine β -lactoglobulin. Thermal behavior at temperatures up to 100°C. *Biochimica et Biophysica Acta*, **624**, 40-50

- DICKINSON, E. (1989) "Protein adsorption at liquid interfaces and the relationship to foam stability". En: *Foams: Physics, Chemistry and Structure*, editado por Wilson, A.. Basel: Springer-Verlag, 39-53.
- DICKINSON, E. (1992) *An introduction to Food Colloids*. Oxford University Press, Oxford.
- DICKINSON, E. (1993) Protein-polysaccharide interactions in food colloids. En: *Food Colloids and polymers: Stability and Mechanical properties*, editado por Dickinson, E., Cambridge, The Royal Society of Chemistry, 77-93.
- DICKINSON, E. (1994) Colloidal aspects of beverages, *Food Chem.*, **51**, 343-347.
- DICKINSON, E. & EUSTON, S.R. (1991). "Stability of emulsions containing both protein and polysaccharide". En: *Food polymers, gels and colloids*, editado por Dickinson, E. The Royal Society of Chemistry, 132-146
- DICKINSON, E. & GALAZKA, S.R. (1991). Emulsion stabilization by ionic and covalent complexes of β -lactoglobulin with polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, **5**, 281-296
- DICKINSON, E. & MC CLEMENTS, J. (1995) "Protein-polysaccharide interactions". En: *Advances in Food Colloids*, editado por Mc Clements, J., Dickinson, E, Blackie Academic & Profesional, Glasgow, UK , 81-101.
- DICKINSON, E. & IZGI, E. (1996) Foam stabilization by protein-polysaccharide complexes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Eng. Aspects*, **113**, 191-201.
- DICKINSON, E. & PAWLOWSKY, K. (1997) Influence of κ -carrageenan on the properties of a protein-stabilized emulsion. *Food Hydrocolloids*, **12**, 417-423.
- DICKINSON, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, **17**, 25-40.
- DOEHLERT, D. H. (1970) Uniform shell design. *Appl. Statistics*, **19**, 231
- DONOVAN, M. & MULVIHILL, D. M. (1987) Thermal denaturation and aggregation of whey proteins. *Irish Journal of Food Science and Technology*, **11**, 87-100
- DOUBLIER, J. -L., GARNIER, C., RENARD, D. & SANCHEZ, C. (2000) Protein-polysaccharide interactions. *Current opinions in colloid and interface science*, **5**, 202-214 .
- DUMAY, E., LALIGANT, A., ZASYPKIN, J. & CHEFTEL, J. (1999) Pressure- and heat-induced gelation of mixed β -lactoglobulin/polysaccharide solutions : scanning electron microscopy of gels. *Food Hydrocolloids*, **13**, 339-351.
- DURAND, D., GIMEL & J. NICOLAI, T. (2002) Aggregation, gelation and phase separation of heat denatured globular proteins. *Physica A.*, **304**, 253-265
- DYNAROWICZ-LATKA, P., DHANABALAN, A & OLIVEIRA, O. (2001) Modern physicochemical research on Langmuir monolayers. *Advances in Colloid and Interface Science*, **91**, 221-293.

- EIGEL, W, BUTLER, J., ERNSTROM, C., FARREL, H, HARWALKER, V., JENNESS, R. & WHITNEY, R.(1984). Nomenclature of proteins of cow's milk. Fifth revision. *Journal of Dairy Science*, **67**, 1599-1631.
- ELOFSSON, U. M., DEJMEK, P. & PAULSSON, M. A. (1996). Heat induced aggregation of β -lactoglobulin studied by dynamic light scattering. *International Dairy Journal*, **6**, 343-357
- ERRINGTON, A. & FOEGEDING, E. A. (1998) Factors determining fracture stress and strain of fine-stranded whey protein gels, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 2963-2967
- EUSTON, S., FINNIGAN, S. & HIRST, R. (2002) Kinetics of droplet aggregation in heated whey protein-stabilized emulsions: effect of polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, **16**, 499-505.
- FERNANDES, P. (1994) Viscoelastic characteristics of whey protein systems at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, **8**, 277-285.
- FERNANDES, P. (1998) "Interactions in Whey Protein/Polysaccharide Mixtures at pH 7". En: Polysaccharide association structures in food, editado por Walter, R., Marcel Dekker, N. Y., capítulo 8, 257-271
- FERRY, J. D. (1975) Viscoelastic Properties of Polymers, J. Wiley and Sons Inc., New York
- FLORY, P. J. (1942) Thermodynamics of high polymer solutions, *J. Chem. Phys.*, **10**, 51-61
- FOEGEDING, E., BOWLAND E. & HARDIN, C. (1995) Factors that determine the fracture properties and microstructure of globular protein gels. *Food Hydrocolloids*, **9**, 237-249
- GALAZKA, V.B. & DICKINSON, E. (1995). Surface properties of protein layers adsorbed from mixtures of gelatin with various caseins. *Journal of Texture Studies*, **26**, 401- 409 .
- GERMAN, J., O'NEIL, T. & KINSELLA, J. (1985) Film forming and foaming behavior of food proteins, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **62**, 1358-1366.
- GIRARD, M., TURGEON, S. L. & PAQUIN, P. (2002) Emulsifying properties of whey protein-carboxymethylcellulose complexes. *Journal of Food Science*, **67**, 113-119.
- GRAHAM,D.E. & PHILLIPS,M.C. (1979a) Proteins at liquid interfacesI. Kinetics of adsorption and surface denaturation. *Journal Colloid Interface Science*, **70**, 403-414.
- GRAHAM,D.E. & PHILLIPS,M.C. (1979b) Proteins at liquid interfacesIII. Molecular structures of adsorbed films. *Journal Colloid Interface Science*, **70**, 427-433.
- GRAHAM,D.E. & PHILLIPS,M.C. (1979c) Proteins at liquid interfaces II. Adsorption isotherms. *Journal Colloid Interface Science*, **70**, 415-426.
- GRINBERG, V. YA. & TOLSTOGUZOV, V. B. (1997) Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids*, **11**, 145-158.
- GULLOT, S.; GUILBERT, D & AXELOS, M. A. (2002) "Dynamic Surface Tension and Surface Dilational Properties of an Amphiphilic Polysaccharide". En: Plant Biopolymer Science.

- Food and non Food Applications, editado por Renard, D.; Della Valle, G. & Popineau, Y., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 166-172
- HALL, G. M. (1996). "Basic concepts" En: Methods of testing protein functionality, editado por Hall, G. M., Blackie Academic & Professional, London, UK, capítulo 1, 1-10.
- HALLING, P. (1981) Protein-stabilized foams and emulsions, *CRC Critical Reviews in Food Science and nutrition*, **12**, 155-203.
- HAQUE, Z. U. & SHARMA, M. (1997) Thermal gelation of β -lactoglobulin AB purified from Cheddar Whey. 1. Effect of pH on association as observed by dynamic light scattering. *J. Agric. Food. Chem.*, **45**, 2958-2963
- HARWALKAR, V. & KALAB, M (1985) Thermal denaturation and aggregation of β -lactoglobulin at pH 2.5. Effect of ionic strength and protein concentration. *Milchwissenschaft*, **40**, 31-34.
- HEIL, J., MCCARTHY, K., GERMAN, J., MCCARTHY, M. & PATINO, H. (1990) Use of magnetic resonance imaging for evaluation of beer characteristics, *ASBC Journal*, **48**, 119-122.
- HERMANSSON, A. M. (1979) Methods of studying functional characteristics of vegetable proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **56**, 272-279.
- HERMANSSON, A. M. & LANGTON, M. (1992) "Electron microscopy". En: Physical techniques for the study of food biopolymers, editado por Ross & Murphy, Blackie Academic & Professional, Glasgow, 277-342.
- HERMANSSON, A. M. (1994) Microstructure of protein gels related to functionality. En: Protein Structure-Function Relationships in Foods, editado por Yada, R., Jackman, R. y Smith, J. Blackie Academic & Professional, Glasgow, 22-42.
- HERRINGTON, T. M. & SAHI, S. S. (1987) Desorption of bovine serum albumin from the air-water interface. En: Food Emulsions and Foams, editado por Dickinson, E. The Royal Society of Chemistry, London, 188-206.
- HILL, A. R. (1988) Thermal precipitation of whey proteins. *Milchwissenschaft*, **43**, 565-567.
- HILLER, R. & LYSTER, L. (1979) Whey protein denaturation in heated milk and cheese whey. *Journal of Dairy Research*, **46**, 95-102.
- HOFFMANN, M. A., VAN MIL, P. & DE KRUIF, C. G. (1995) Thermal denaturation and aggregation of β -lactoglobulin studied by differential scanning calorimetry. En: Food Macromolecules and Colloids, editado por Dickinson, E. & Lorient, D., Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 171-177.
- HOFFMANN, M. A., ROEFS, S. P., VERHEUL, M., VAN MIL, P. & DE KRUIF, C. G. (1996) Aggregation of β -lactoglobulin studied by in situ light scattering. *Journal of dairy research*, **63**, 423-440

- HOFFMANN A. M. & VAN MIL, P. J. (1997a) Heat-Induced aggregation of β -lactoglobulin: Role of the Thiol Group and Disulfide Bonds. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 2942-2948
- HOFFMANN A. M., VAN MILTENBURG, J. C. & VAN MIL, P. J. (1997b) The suitability of scanning calorimetry to investigate slow irreversible protein denaturation. *Thermochimica Acta*, **306**, 45-49
- HOFFMANN, M. A., SALA, G., OLIEMAN, C. & DE KRUIF, K. (1997c) Molecular mass distribution of heat-induced β -lactoglobulin aggregates. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 2949-2957
- HOFFMANN A. M. & VAN MIL, P. J. (1999) Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin as a function of pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 1898-1905
- HORNE, D. S. & RODRÍGUEZ PATINO, J. M. (2003) "Adsorbed biopolymers: behavior in food applications". En: *Biopolymers at Interfaces*, editado por Malmsten, M., Marcel Dekker, New York, 857-900.
- HUANG, X., KAKUDA, Y. & CUI, W. (2001) Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and the interfacial activity. *Food Hydrocolloids*, **15**, 533-542.
- HUGGINS, M. L. (1942) Theory of solutions of high polymers, *J. Amer. Chem. Soc.*, **64**, 1712-1719.
- IAMETTI, S., CAIROLI, S., DE GREGORI, B. & BONOMI, F. (1995) Modifications of high-order structures upon heating of β -lactoglobulin: dependence on the protein concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 53-58
- IAMETTI, S., DE GREGORI, B., VECCHIO, G. & BONOMI, F. (1996) Modifications occur at different structural levels during the heat-denaturation of β -lactoglobulin. *European Journal of Biochemistry*, **237**, 106-112
- IKEDA, S. & FOEGEDING, E. A. (1999) Dynamic viscoelastic properties of thermally induced whey protein isolate gels with added lecithin. *Food Hydrocolloids*, **13**, 245-254
- IMESON, A., LEDWARD, D. & MITCHELL, J. (1977) On the nature of interactions between some anionic polysaccharides and proteins. *J. Sci. Fd. Agric.*, **28**, 661-668.
- IMESON, A. (1992). Thickening and gelling agents for foods. Blackie Academic & Professional. New York.
- JASKULKA, F., SMITH, D. & LARNTZ, K. (2000) Determining the kinetic reaction rate order for the thermal denaturation of β -lactoglobulin using two statistical approaches. *International Dairy Journal*, **10**, 589-595
- KATSUTA, K., HATAKEYAMA, M. & HIRAKI, J. (1997) Isothermal gelation of proteins. 1. Urea-induced gelation of whey proteins and their gelling mechanism. *Food Hydrocolloids*, **11**, 367-372
- KELLA, N. K. & KINSELLA, J. E. (1988) Enhanced thermodynamic stability of β -lactoglobulin at low pH. A possible mechanism *Biochem. J.*, **255**, 113-118.

-
- KIM, S. (1985) Structure, surface properties and foam stability of native, reduced and succinylated soy 11S globulins, Thesis, Cornell University, EE. UU.
- KIM, S. & KINSELA, J. E. (1987) Surface active properties 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.
- KINSELLA, J. E. (1982) Food Proteins. Editado por Fox, P. Y Condon, J. Elsevier Applied Science, London, 51.
- KINSELLA, J. & PHILLIPS, L. (1989) "Structure-function relationships in food proteins, film and foaming behaviour". En: Food Proteins, editado por Kinsella, J. & Soucie, W. The AOCS-Champaign, IL, 52-77.
- KITABAKE, N. & DOI, E. (1982) Surface tension and foamability of protein solutions. *Journal of Food Science*, **47**, 1218-1225.
- KOPPEL, D. (1972) Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants. *Journal of Chemistry and Physics*, **57**, 4814-4819
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685
- LANGENDORFF, V., CUVELIER, G., MICHON, C., LAUNAY, B., PARKER, A. & DE KRUIF, C. G. (2000) Effects of carrageenan type on the behaviour of carrageenan/milk mixtures. *Food Hydrocolloids*, **14**, 273-280
- LANGMUIR, I. (1917) The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II Liquids. *J. Amer. Chem. Soc.*, **39**, 1848.
- LANGTON, M & HERMANSSON, A. M. (1992) Fine-stranded and particulate gels of β -lactoglobulin and whey protein at varying pH. *Food Hydrocolloids*, **5**, 523-539.
- LANGTON, M & HERMANSSON, A. M. (1996) Image analysis of particulate whey protein gels. *Food Hydrocolloids*, **10**, 179-191.
- LAPASIN, R. & PRICL, S. (1995) "The polysaccharides: source and structures". En: Rheological of industrial polysaccharides: Theory and applications. Editado por Lapasin, R y Pricl, S. Blackie Academic & Profesional, Glasgow, 1-133.
- LE BON, C., NICOLAI, T. & DURAND, D. (1999) Growth and structures of aggregates of heat-denatured β -lactoglobulin. *International Journal of Food Science and Technology*, **34**, 451-466
- LIU, T. X., RELKIN, P. & LAUNAY, B. (1994) Thermal denaturation and heat induced gelation properties of β -lactoglobulin. Effects of some chemical parameters. *Thermochimica Acta*, **246**, 387-403
- LUCASSEN, J. & VAN DEN TEMPEL, M. (1972) Dynamic measurements of dilatational properties of a liquid interface, *Chem. Eng. Sci.*, **27**, 1283- 1291
-

- LUCHASEN-REYNDERS, E. H.(1993) Interfacial viscoelasticity in emulsions and foams, *Food Structure*, **12**, 1-12.
- LUNDIN, L. & 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.
- MANDERSON, G. A., HARDMAN, M. J., & CREAMER, L. K. (1998) Effect of heat treatment on the conformation and aggregation of β -lactoglobulin A, B and C. *J. Agric. Food Chem*, **46**, 5052-5061
- MANDERSON, G. A., HARDMAN, M. J., & CREAMER, L. K.(1999) Effect of heat treatment on bovine β -lactoglobulin A, B and C. Explored using thiol availability and fluorescence. *J. Agric. Food Chem*, **47**, 3617-3627
- MANGINO, M. E. (1992) Gelation of whey protein concentrates, *Food Technol.*, **46**, 114
- MARTIN, A., GROLLE, K., BOS, M., MARTIEN, A., STUART, M. & Van VLIET, T. (2002) Network forming properties of various proteins adsorbed at the air/water interface in relation to foam stability. *J. Colloid and Interface Science*, **254**, 175-183.
- MATSUMURA, Y. Y MORI, T. (1996). "Gelation". En: Methods of testing protein functionality, editado por Hall, G. M., Blackie Academic & Professional, London, UK. Capítulo 4, 76-109.
- MC CLEMENTS, D. (1999a). "Colloidal Interactions". En : Food Emulsions. Principles, Practice and Techniques, editado por Mc Clemets, D. J., CRC Press, Florida, EE UU. Capítulo 3, 39-81
- MC CLEMENTS, D. (1999b). "Emulsion Ingredients". En : Food Emulsions. Principles, Practice and Techniques, editado por Mc Clemets, D. J., CRC Press, Florida, EE UU. Capítulo 4, 83-124.
- MC CLEMENTS, D. (1999c). "Interfacial properties and their characterization". En : Food Emulsions. Principles, Practice and Techniques, editado por Mc Clemets, D. J., CRC Press, Florida, EE UU. Capítulo 5, 127-159.
- MC KENZIE, H. A. & SAWYER, W. H. (1967) Effect of pH on β -lactoglobulin. *Nature*, **214**, 1101-1104
- MC KENZIE, H. A. (1971) β -lactoglobulins. En: Milk proteins: Chemistry and Molecular Biology, editado por Mc Kenzie, H. A., New York: Academic Press, 257-330
- Mc RITCHIE, F. (1978) Protein at interfaces. *Advances in Protein Chemistry*, **32**, 283-323.
- MC SWINEY, M., SINGH, H. & CAMPANELLA, O. H. (1994) Thermal aggregation and gelation of bovine β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, **8**, 441-453
- MISHRA, S., MANN, B. & JOSHI, V. K. (2001) Functional improvement of whey protein concentrate on interaction with pectin. *Food Hydrocolloids*, **15**, 9-15

- MORR, C., & HA Y. W. (1993) Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in food science and nutrition*, **33**, 431-476
- MULVIHILL, D. M. & DONOVAN, M. (1987) Whey proteins and their thermal denaturation. A Review. *Irish Journal of Food Science and Technology*, **11**, 43-75
- MYERS, C. D. (1990) Study of thermodynamics and kinetics of protein stability by thermal analysis. En: *Thermal Analysis of Foods*, editado por Harwalkar, W. R. y Ma, C.-Y. Elsevier Applied Science, London 16-50.
- NAKAI, S., LI-CHAN, E. & ARTEAGA, G. E. (1996). "Measurements of surface hydrophobicity". En: *Methods of testing protein functionality*, editado por Hall, G. M., Blackie Academic & Professional, London, UK, capítulo 8, 226-259.
- NDI, E., SWANSON, B., BARBOSA-CANOVAS, G. & LUEDECKE, L. (1996) Rheology and microstructure of β -lactoglobulin/Sodium polypectate gels. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 86-92
- NDI, E., SWANSON, B., DUNKER, A. K. & LUEDECKE, L. (1996) Relation of β -lactoglobulin-Sodium Polypectate aggregation to bulk macromolecular concentration. *J. Food Science*, **61**, 69-73
- NEISER, S., DRAGET, K. & SMIDSRØD, O. (1998) Gel formation in heat-treated bovine serum-albumin-sodium alginate systems. *Food Hydrocolloids*, **12**, 127-132
- NEISER, S.; DRAGET, K. I. & SMIDSRØD, O. (2000) Gel formation in heat-treated bovine serum albumin- κ -carrageenan systems. *Food Hydrocolloids*, **14**, 95-110
- NIELSEN, B, SINGH, H & LATHAM, J. (1996) Aggregation of bovine β -lactoglobulins A and B on heating at 75 °C. *International Dairy Research*, **6**, 519-527.
- NISHINARI, K., WATASE, M., RINAUDO, M. & MILAS, M. (1996) Characterization and properties of gellan- κ -carrageenan mixed gels. *Food Hydrocoll.*, **10**, 277-283.
- NISHINARI, K, ZHANG, H. & IKEDA, S. (2000) Hydrocolloid gels of polysaccharides and proteins. *Current opinion in colloid and interface science*, **5**, 195-201
- OAKENFULL, D. (1998) "Polysaccharide molecular structures". En: *Polysaccharide association structures in food*, editado por Walter, R., Marcel Dekker, N. Y., capítulo 2, 15-36.
- OLABISI, O., ROBESON, L. M. & SHAW, M. T. (1979) "Thermodynamics of polymer-polymer miscibility". En: *Polymer-polymer miscibility*, Academic Press, New York, 19-116.
- OLSSON, C., STADING, M. & HERMANSSON, A.-M. (2000) Rheological influence of non-gelling amylopectins on β -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids*, **14**, 473-483
- OLSSON, C., LANGTON, M. & HERMANSSON, A.-M. (2002a) Microstructures of β -lactoglobulin/amylopectin gels on different length scales and their significance for rheological properties. *Food Hydrocolloids*, **16**, 111-126

- OLSSON, C. LANGTON, M. & HERMANSSON, A. -M. (2002b) Dynamic measurements of β -lactoglobulin structures during aggregation, gel formation and gel break-up in mixed biopolymer systems. *Food Hydrocolloids*, **16**, 477-488
- OULD ELEYA, M.M. & TURGEON, S.L. (2000) Rheology of κ -carrageenan and β -lactoglobulin mixed gels. *Food Hydrocolloids*, **14**, 29-40
- PAVLOVSKAYA, G.E., SEMENOVA, M.G., THZAPKINA, E.N. & TOLSTOGUZOV, V.B. (1993). The influence of dextran on the interfacial pressure of adsorbing layers of β -globulin vicia faba at the planar n-decane/aqueous solution interface. *Food Hydrocolloids*, **7**, 1-10.
- PELEG, M. (1979) Characterization of the stress relaxation curves of solid foods. . *Journal of Food Science*, **44**, 277-281.
- PHILLIPS, L; WHITEHEAD, D & KINSELLA, J. (1994a). "Protein Films". En: Structure-Function properties of food proteins, Food Science and Technology international Series, Academic press, San Diego, California. Capitulo 5, 111-130.
- PHILLIPS, L; WHITEHEAD, D & KINSELLA, J. (1994b). "Protein gelation". En: Structure-Function properties of food proteins, Food Science and Technology international Series, Academic press, San Diego, California. Capitulo 49, 179-206.
- PHILLIPS, L; WHITEHEAD, D & KINSELLA, J. (1994c). "Protein-Stabilized Foams". En: Structure-Function properties of food proteins, Food Science and Technology international Series, Academic press, San Diego, California. Capitulo 4, 131-152.
- PHILLIPS, L; WHITEHEAD, D & KINSELLA, J. (1994d). "Structural and Chemical properties of β -lactoglobulin". En: Structure-Function properties of food proteins, Food Science and Technology international Series, Academic press, San Diego, California. Capitulo 4, 75-106.
- PRINS, A. (1987) "Theory and practice of formation and stability of food foams". En: Food emulsions and foams. Editado por Dickinson, E. The Royal Society of Chemistry, London, 30-39
- PRINS, A. (1988) "Principles of Foam Stability". En: Advances in Food emulsions and foams, editado por Dickinson, E. Y Stainsby, G., Elsevier Applied Science, London, 91-122.
- PUYOL, P., PEREZ, M. D. & HORNE, D. S. (2001) Heat-induced gelation of whey protein isolates (WPI): effect of NaCl and protein concentration. *Food Hydrocolloids*, **15**, 233-237.
- QI, X. L., BROWNLOW, S., HOLT, C. & SELLERS, P. (1995) Thermal denaturation of β -lactoglobulin: effect of protein concentration at pH 6.75 and 8.05. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1248**, 43-49
- QI, X. L., HOLT, C., MCNULTY, D., CLARKE, D. T., BROWNLOWS, S. & JONES, G. R. (1997) Effect of temperature on the secondary structure of β -lactoglobulin at pH 6.7, as determined by CD and ID spectroscopy: a test of the molten globule hypothesis. *Biochemistry Journal*, **324**, 341-346

-
- QIN, B., BEWLEY, M. C., CREAMER, L. K., BAKER, E., JAMESON, G. (1998) Structural basis of the Tanford transition of bovine β -lactoglobulin. *Biochemistry*, **37**, 14014-14023.
- RELKIN, P. (1994) Differential scanning calorimetry: a useful tool for studying protein denaturation. *Thermochimica Acta*, **246**, 371-386
- 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**, 565-601
- RELKIN, P., MEYLHEUC, T., LAUNAY, B. & RAYNAL, K. (1998a) Heat-Induced gelation of globular protein mixtures. A DSC and scanning electron microscopic study. *Journal of thermal analysis*, **51**, 747-755
- RELKIN, P., MEYLHEUC, T., LAUNAY, B. & RAYNAL, K. (1998b) Heat- and cold-setting gels of β -lactoglobulin solutions. A DSC and TEM study. *Thermochimica Acta*, **308**, 69-74
- RENARD, D., DELLA VALLE, G. & POPINEAU, Y. (2002) Plant biopolymer science. Food and non-food applications. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- RODRIGUEZ NIÑO, M. R. & RODRÍGUEZ PATINO, J. M. (1995) Protein adsorption and protein-lipid interactions at the air-aqueous solution interface, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering aspects*, **103**, 91-103
- RODRÍGUEZ NIÑO, M. R, CARRERA SÁNCHEZ, C. & RODRÍGUEZ PATINO, J. M. (1999) Interfacial characteristics of β -casein spread films at the air-water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **12**, 161-173.
- RODIGUEZ-NIÑO, M:R., CARRERA SANCHEZ, C., CEJUDO FERNANDEZ, M. & RODRIGUEZ PATINO, J.M. (2001). Protein and lipid films equilibrium at air-water interface. *J. Amer. Oil Soc.*, **78**, 873-879.
- RODRÍGUEZ PATINO, J. M. (1995)
- RODRIGUEZ PATINO, J.M., RODRÍGUEZ NIÑO, M. R. & CARRERA SÁNCHEZ, C. (1999a) Adsorption of Whey protein isolate at the oil-water interface as a function of processing conditions: a rheokinetic study. *J. Agric. Food. Chem*, **47**, 3640-3648.
- RODRIGUEZ PATINO, J.M., RODRÍGUEZ NIÑO, M. R. & CARRERA SÁNCHEZ, C. (1999b) Dynamic Interfacial Rheology as a tool for the characterization of whey protein isolates gelation at the oil-water interface. *J. Agric. Food. Chem*, **47**, 2241-2248.
- RODRIGUEZ PATINO, J.M., CARRERA SANCHEZ, C., RODIGUEZ-NIÑO, M:R. & CEJUDO FERNANDEZ, M. (2001a). Structural and dynamic properties of milk proteins spread at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, **242**, 141-151.
- RODRIGUEZ PATINO, J. M., NAVARRO GARCÍA, J., RODRÍGUEZ NIÑO, R. (2001b) Protein-lipid interactions at the oil-water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **21**, 207-216.
-

- RODRÍGUEZ PATINO, J. M., RODRÍGUEZ NIÑO, M- R. & CARRERA SÁNCHEZ, C. (2002) "Propiedades funcionales de lípidos y proteínas de interés para la formulación de dispersiones alimentarias". En: Proteínas y Polisacáridos como ingredientes funcionales, editado por: Añón, M. C. & Pilosof, A. M. R. Editorial de la Universidad de La Plata, Argentina.
- ROEFS, S. & DE KRUIF, K. (1994). A model for the denaturation and aggregation of β -lactoglobulin. *Eur. J. Biochem.*, **226**, 883-889.
- SAMANT, S. K., SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. & REGE, D. V. (1993). Protein-polysaccharide interactions: a new approach in food formulations. *International Journal of Food Science and Technology*, **28**, 547-562.
- SANCHEZ, V. E., BARTHOLOMAI, G. B. & PILOSOFF, A. M. (1995) Rheological Properties of Food Gums as Related to their Water Binding Capacity and to Soy Protein Interaction. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **28**, 380-385
- SANCHEZ, C., SCHMITT, C., BABAK, V.G. & HARDY, J. (1997). Rheology of whey protein isolate xanthan mixed solutions and gels. Effect of pH and xanthan concentration. *Nahrung*, **41**, 336-343.
- SARKER, D., WILDE, P. & CLARK, D. (1995) Competitive adsorption of L- α -lysophosphatidylcholine/ β -lactoglobulin mixtures at the interfaces of foams and foam lamellae. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **3**, 349-356.
- SARKER, D.K. & WILDE, P.J. (1999). Restoration of protein foam stability through electrostatic propylene glycol alginate-mediated protein-protein interactions. *Colloids and Surfaces B*, **15**, 203-213.
- SAWYER, W., NORTON, R., NICHOL, L. & MCKENZIE, G.(1971) Thermodenaturation of bovine β -lactoglobulin. Kinetics and the introduction of β -structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, **243**, 19-30
- SCHMITT, C.; SÁNCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S. & HARDY, J. (1998). Structure and Technofunctional Properties of Protein-Polysaccharide Complexes: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **38**, 689-753.
- SCHOKKER, E., SINGH, H., PINDER, D., NORRIS, G. & CREAMER, L. (1999) Characterization of intermediates formed during heat-induced aggregation of β -lactoglobulin at neutral pH. *International Dairy Journal*, **9**, 791-800
- SCHORSCH, C.; JONES, M. G. & NORTON, I. T.(2000) Phase behaviour of pure micellar casein/ κ -carrageenan systems in milk salt ultrafiltrate. *Food Hydrocolloids*, **14**, 347-358
- SHARMA, M., HAQUE, Z. & WILSON, W. (1996) Association tendency of β -lactoglobulin AB purified by gel permeation chromatography as determined by dynamic light scattering under quiescent conditions. *Food Hydrocolloids*, **10**, 323-328
- SHIMADA, K & MATSUSHITA (1980). Relationship between thermo-coagulation of proteins and amino acid compositions. *J. Agric. Food Chem*, **28**, 413-417.

-
- SHIMADA, K. & CHEFTEL, J. C. (1988) Texture characteristics, protein solubility, and sulfhydryl group/disulfide bond contents of heat-induced gels of whey protein isolate. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 1018-1025.
- STADING, M. & HERMANSSON, A.-M. (1990) Viscoelastic behaviour of β -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids*, **4**, 121-153.
- STADING, M. & HERMANSSON, A.-M. (1991) Large deformation properties of β -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids*, **5**, 339-352.
- STADING, M. & HERMANSSON, A.-M. (1992) Inhomogeneous fine-stranded β -lactoglobulin gels. *Food Hydrocolloids*, **5**, 455-470.
- STADING, M., LANGTON, M. & HERMANSSON, A. M. (1993) Microstructure and rheological behaviour of particulate β -lactoglobulin gels. *Food Hydrocolloids*, **7**, 195-212.
- SUTTIPRASIT, F., KRISDAHASIMA, V. & MCGUIRE, J. (1992) The surface activity of α -lactalbumin, β -lactoglobulin and BSA I. *J. Colloid Interface Sci.*, **154**, 316-326.
- SYRBE, A., FERNANDES, P. B., DANNENBERG, F., BAUER, W. & KLOSTERMEYER, H. (1995) Whey protein + polysaccharide mixtures: polymer incompatibility and its applications. En: *Food Colloids and Macromolecules*, editado por Dickinson, E. Y Lorient, D., Cambridge, UK, The Royal Society of Chemistry, 328-339.
- SYRBE, A, BAUER, W. & KLOSTERMEYER, H. (1998) Polymer Science Concepts in Dairy Systems-An Overview of Milk Protein and Food Hydrocolloid Interaction. *Int. Dairy Journal*, **8**, 179-193
- TANFORD C., BUNVILLE, L. & NOZAKI, Y. (1959) The reversible transformation of β -lactoglobulin at pH 7.5. *J. Amer. Chem. Soc.*, **81**, 4032-4036.
- TANG, Q., MCCARTHY, O. & MUNRO, P. (1995) Effects of pH on whey protein concentrate gel properties: comparisons between small deformation (dynamic) and large deformation (failure) testing. *J. Texture Studies*, **26**, 255-272.
- TAYLOR S. M. & FRYER, P.(1994) The effect of temperature /shear history on thermal gelation of whey protein concentrates, *Food Hydrocoll.*, **8** , 45-61.
- TIMASHEFF, S., TOWNEND, R. & MESCANTI, L (1966). The optical rotatory dispersion of the β -lactoglobulins. *Journal of Biological Chemistry*, **241**, 1863-1870.
- TOLSTOGUZOV, V. (1986). "Functional properties of protein-polysaccharide mixtures". En: *Functional properties of the food macromolecules*, editado por Mitchell, J. R. y Ledward, D. A. Capitulo 9, 385-411.
- TOLSTOGUZOV, V. (1995) Some physico-chemical aspects of protein processing in foods. Multicomponent gels. *Food Hydrocolloids*, **9**, 317-332
- TOLSTOGUZOV, V. B. (1997a) "Protein-Polysaccharide Interactions" . En: *Food Proteins and their applications*, editado por Damodaran, S. & Paraf, A., New York: Marcel Dekker Inc., 171-198
-

- TOLSTOGUZOV, V. (1997b) Multicomponent biopolymer gels. *Food Hydrocolloids*, **11**, 159-170.
- TOLSTOGUZOV, V. B. (2003) Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids*, **17**, 1-23.
- TORNBERG, E. (1978a) The application of the drop volume technique to measurements of the adsorption of proteins at interfaces. *J. Colloid Interface Sci.*, **64**, 391-402
- TORNBERG, E. (1978b) 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 absorption behavior of proteins at an interface as related to their emulsifying properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **29**, 762-773.
- TURNIT, H.J. (1960) A theory and method for the spreading of protein monolayers. *Journal of Colloid Science*, **15**, 1-13.
- TSAPKINA, E.N., SEMENOVA, M.B., PAVLOVSKAYA, G.E. & TOLSTOGUZOV, V.B. (1992). The influence of incompatibility on the formation of adsorbing layers and dispersions of n-decane emulsion droplets in aqueous solution containing a mixture of 11S globulin from *Vicia faba* and dextran. *Food Hydrocolloids*, **6**, 237-251.
- TUNG, C.Y.M. & DYNES, P.J. (1982). Relationship between viscoelastic properties and gelation in thermosetting systems. *Journal of Applied Polymer Science*, **27**, 569-580.
- TURGEON, S. L. & BEAULIEU, M. (2001) Improvement and modification of whey protein gel texture using polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, **15**, 583-591
- TZIBOULA, A. & HORNE, D.S. (1999) Influence of whey protein denaturation on κ -carrageenan gelation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **12**, 299-308
- VAN MIL, P. J. & ROEFS, S. (1993) "Denaturation of Whey Proteins studied by Thermal Analysis and Chromatography". En: *Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties*, editado por Dickinson, E. & Walstra, P., Cambridge, UK, 45-54
- VERHEUL, M. (1998) "Aggregation and gelation of whey proteins", PhD thesis, Universiteit Twente, Enschede
- VERHEUL, M. & ROEFS, S. (1998a) Structure of particulate whey protein gels: effect of NaCl concentration, pH, heating temperature and protein composition. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4909-4916
- VERHEUL, M. & ROEFS, S. (1998b) Structure of whey protein gels, studied by permeability, scanning electron microscopy and rheology. *Food Hydrocolloids*, **12**, 17-24
- VERHEUL, M., ROEFS, S. & DE KRUIF K. (1998c) Kinetics of Heat-Induced Aggregation of β -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 896-903
- VERHEUL, M., PEDERSEN, J. S., ROEFS, S. & DE KRUIF K. (1999) Association behaviour of native β -lactoglobulin, *Biopolymers*, **49**, 11-20

- WAGNER, J. (2000) "Propiedades Superficiales". En: Caracterización funcional y estructural de proteínas, editado por Pilosof, A. M y Bartholomai, G., EUDEBA, Buenos aires, 41-74.
- WALKENSTROM, P., PANIGHETTI, N., WINDHAB, E. & HERMANSSON, A. M. (1998) Effects of fluid shear and temperature on whey protein gels, pure or mixed with xanthan. *Food Hydrocolloids*, **12**, 469-479
- WALSTRA, P. (1988) "Overview of emulsion and foam stability". En: Food Emulsions and foams, editado por Dickinson, E, The Royal Society of Chemistry, London, 242-257.
- WALSTRA, P. (1989) "Principles of foam formation and stability". En: Foams: Physics, chemistry and structure, editado por Wilson, A., Basel: Springer-Verlag, 1-15.
- WALSTRA, P. (1996) "Disperse systems: Basic consideration". En: Food Chemistry, editado por Fennema, O. R., Marcel Dekker, New York, capítulo 3. XX-149
- WANG, Q. & QVIST, K. (2000) Investigation of the composite system of β -lactoglobulin and pectin in aqueous solutions. *Food Research International*, **33**, 683-690
- WANISKA, R. & KINSELLA, J. E. (1985) Surface properties of β -lactoglobulin: Adsorption and rearrangement during film formation. *J. Agric. Food. Chem.*, **33**, 1143-1148
- WARD, A. & TODAI, L. (1946) Time dependence of boundary tensions of solutions. I. The role of diffusion in time effects. *J. Chem. Phys.*, **14**, 353-361.
- WILDE, P. J. & CLARK, D. C. (1996) "Foam formation and stability". En: Methods of testing protein functionality, editado por Hall, G. M., Blackie Academic & Professional, capítulo 5, 110-148
- YILMAZER, A.R., CARRILLO, A.R. & KOKINI, J. (1991). Effect of propylene glycol alginate and xanthan gum on stability of o/w emulsions. *Journal of Food Science*, **56**, 513-517.
- XU, S. & DAMODARAN, S. Kinetics of adsorption of protein at the air-water interface from a binary mixture. *Langmuir*, **10**, 472-480.
- YU, M.A. & DAMODARAN, S. (1991) Kinetics of destabilization of soy protein foams. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1563-1567
- ZASYPKIN, D. V., DUMAY, E. & CHEFTEL, J. C. (1996) Pressure and heat-induced gelation of mixed β -lactoglobulin/xanthan solutions. *Food Hydrocolloids*, **10**, 203-211.
- ZASYPKIN, D. V.; BRAUDO, E. E. & TOLSTOGUZOV, V. B. (1997) Multicomponent biopolymer gels. *Food Hydrocolloids*, **11**, 159-170 .