



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Industrias

**IMPACTO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LAS  
PROTEÍNAS DE SOJA EN SUS PROPIEDADES  
INTERFACIALES, DE ESPUMADO Y EN LA  
INTERACCIÓN CON POLISACÁRIDOS**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la  
Universidad de Buenos Aires

Lic. Karina Dafne Martínez

Director de tesis: Dra. Ana M. R. Pilosof

Buenos Aires, 2007

## *Agradecimientos*

A la Dra. Ana Pilosof que confió en mí, supo guiarme con mucha paciencia y buen humor, por demostrar que no sólo es una buena directora y consejera, sino también es una excelente persona, siempre pendiente de nuestras necesidades. Agradezco profundamente el impulso, energía y entusiasmo que impartió en mí día a día.

A mi familia: papá, mamá, Mara, Darío, Gastón y Martín que sin ellos no hubiera sido posible emprender esta carrera, dado a su invaluable ayuda con Pame y aliento cotidianos. A Esther y Yuly por ser unas muy buenas suegra y cuñada.

A Ale, mi compañero de la vida, que supo aceptar mis ausencias y siempre estuvo pendiente de todas mis necesidades.

A mi Pame, mi incentivo permanente que hizo de mí, una persona realizada.

A Dina, por su gran aporte en la redacción de esta Tesis, y por ser una muy valiosa compañera a la distancia, con enorme predisposición y en especial, una amiga confidente.

A Virginia, que sin su ayuda y buena onda hubiera sido imposible hacer las cromatografías en este laboratorio.

A mis compañeros, que hacen del trabajo diario un ideal complemento, a Nerina por sus charlas cotidianas y aliento, a Julia por su predisposición permanente, a Fede por su iniciativa y compromiso con el laboratorio, a Laura y Edith por hacerme reír, a Oscar por su ayuda y valiosos consejos y a todos los que en algún momento pasaron por este laboratorio, y aportaron su experiencia en mi formación.

A Pilar Buera, por el préstamo de equipos y a su grupo por la guía que me supo dar. Como así también a Rosita y Mariana por acompañarnos y estar siempre presentes.

A los integrantes del grupo de Lía Gerchensson que a través de amenas conversaciones, consejos y confianzas, fortalecieron mis lazos con este Departamento, quiero en especial agradecer a Ana Rojas, y a Silvia Flores.

Al CONICET, por financiar mi carrera a través de una beca Doctoral.

Al Programa Iberoamericano Cyted a través del Proyecto de Investigación 105I0274 por haber financiado mi estancia en la Universidad de Sevilla, España.

Al Dr. Juan Miguel Rodríguez Patino por permitirme formar parte de su grupo de trabajo durante dos meses en Sevilla y a la imprescindible ayuda y buen humor de su gente: Cecilio y Víctor.

A la Universidad de Buenos Aires por financiar mi trabajo de tesis.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por el financiamiento.

Y a todos que de alguna manera aportaron desde otros lugares, fundamentales a la hora de hacer que todo “funcione” quiero agradecer especialmente a la Dra. Uli; Dora Kitic, Viviana y a Juan.

# **IMPACTO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LAS PROTEÍNAS DE SOJA EN SUS PROPIEDADES INTERFACIALES, DE ESPUMADO Y EN LA INTERACCIÓN CON POLISACÁRIDOS**

## **Resumen**

El objetivo de la tesis fue estudiar el impacto de la hidrólisis enzimática de las proteínas de soja en sus propiedades interfaciales, de espumado y en la interacción con polisacáridos en condiciones de limitada compatibilidad termodinámica.

La hidrólisis de la proteína de soja (SP) produjo un aumento del carácter tensioactivo a concentraciones de subfase donde SP adopta una conformación más condensada en la monocapa. A concentraciones bajas en la subfase en las cuales SP adopta una estructura expandida en la monocapa, un bajo grado de hidrólisis (2%) también produjo un aumento del carácter tensioactivo. Sin embargo un mayor GH (5,35%) redujo la actividad superficial.

La hidrólisis también mejoró la elasticidad dilatacional y la viscoelasticidad relativa de las películas a concentraciones menores a la de colapso de la monocapa (2%).

La correlación entre las propiedades superficiales y las propiedades de las espumas, corroboró que efectivamente el GH que se debe lograr en la proteína de soja debe ser muy pequeño a fin de mejorar su CE sin perder las propiedades de gelificación interfacial necesarias para formar películas muy viscoelásticas que presenten una alta estabilidad al drenado de líquido y al colapso.

El efecto de los polisacáridos en las propiedades de espumado dependió del grado de hidrólisis de la proteína y del tipo de polisacárido de una manera compleja siendo la estabilidad de las espumas la resultante entre la contribución del polisacárido a la viscosidad del seno de la fase continua y a la viscoelasticidad y/o elasticidad de las películas interfaciales. Tanto los polisacáridos tensioactivos como los no tensioactivos, influyeron en la interfase aire-agua, promoviendo una mejora de las propiedades de las películas cuando se usan en combinación con proteína de soja. La presión superficial y viscoelasticidad de las películas de la proteína menos hidrolizada aumentó en presencia de los polisacáridos, sin embargo la de la más hidrolizada se redujo o no se modificó. Esto indica que una hidrólisis limitada es suficiente para mejorar las propiedades de la interfase aire-agua cuando la proteína se usa en combinación con polisacáridos.

El agregado combinado de kappa-carragenano e hidroxipropilmetilcelulosa resultó una estrategia adecuada para generar espumas en base a hidrolizados proteicos de soja, con una elevada estabilidad al drenado y colapso bajo condiciones de calentamiento, sin reducir el volumen de la espuma. Por otro lado, estas espumas bajo refrigeración presentan una alta estabilidad debido a la gelificación del carragenano.

Palabras clave: proteína, interfases, espumas, interacción

# **THE IMPACT OF ENZYMATIC SOY PROTEIN HYDROLYSIS ON THE INTERFACIAL AND FOAMING PROPERTIES AND INTERACTIONS WITH POLYSACCHARIDES**

## **Abstract**

The objective of the thesis was to study the impact of enzymatic hydrolysis of soybean proteins on their interfacial and foaming properties and on the interaction with polysaccharides in conditions of limited thermodynamic compatibility.

Soy proteins (SP) hydrolysis increased surface activity at subphase concentrations where SP adopts a condensed conformation at the monolayer. At concentrations where it adopts a more expanded conformation, a low degree of hydrolysis (2%) also promoted the enhancement of surface activity. However, higher degrees of hydrolysis (5,35 %) decreased surface activity.

The hydrolysis also improved the dilatational elasticity and viscoelasticity of the films at subphase concentrations below that corresponding to the monolayer collapse (2%).

The correlation between surface properties of films and foaming properties supported that a very low degree of hydrolysis is required to increase foaming capacity without lowering the interfacial gelation capacity needed to form viscoelastic interfacial films, with high stability against drainage and collapse.

The effect of polysaccharides on foaming properties depended in a complicated way on the degree of hydrolysis of soy protein and the kind of polysaccharide, being foam stability the consequence of the contribution of polysaccharide to bulk viscosity and to film elasticity/viscoelasticity.

Both surface-active and non-surface-active polysaccharides influenced the air-water interface, improving film properties when used in admixture with soy proteins.

Surface pressure and film viscoelasticity of films from the less hydrolyzed soy protein increased in the presence of polysaccharides, but decreased or did not change for the more hydrolyzed protein. This points out that a limited hydrolysis is sufficient to improve the properties of surface films when the protein is used in combination with polysaccharides.

The combination of kappa-carrageenan and hydroxypropylmethylcellulose was an adequate strategy to form hydrolyzed soy protein foams with a very high foam stability against drainage and collapse under heating, without decreasing foam volume. In addition, those foams were very stable under refrigeration due to carrageenan gelation.

Keywords: protein, soybean, interfaces, foams, interaction

## ***Objetivos***

- Estudiar el impacto de una hidrólisis enzimática limitada de la proteína de soja en las propiedades de espumado e interfaciales.
- Estudiar el impacto de la hidrólisis enzimática de la proteína de soja en la interacción con polisacáridos en condiciones de limitada compatibilidad termodinámica en espumas e interfases.
- Analizar la relación entre las propiedades de las películas interfaciales y las propiedades de espumado.
- Estudiar la estabilización de espumas de proteína de soja hidrolizada mediante la utilización en forma combinada de polisacáridos para una posible aplicación tecnológica como agente de batido.



# INDICE

## *Introducción*

<b>1. Proteínas de soja.....</b>	<b>1</b>
1.1 La soja en la alimentación.....	1
1.2 Aspectos nutricionales.....	4
1.3 Estructura y composición del grano de soja.....	5
1.4 Caracterización de las proteínas de soja.....	6
1.5 Características de la glicinina.....	8
1.6 Características de la $\beta$ -conglucina.....	9
1.7 Propiedades funcionales de las proteínas de soja.....	10
<b>2. Conceptos generales sobre propiedades interfaciales de proteínas..</b>	<b>13</b>
2.1 Termodinámica de la adsorción de proteínas.....	14
2.2 Cinética de adsorción de las proteínas en la interfase.....	16
2.3 Propiedades de las películas proteicas.....	18
<b>3. Conceptos generales sobre propiedades de espumado de proteínas..</b>	<b>21</b>
3.1 Estructura de espumas.....	22
3.2 Formación de espumas.....	23
3.3 Estabilidad de espumas.....	24
3.4 Métodos para el estudio de la formación y estabilidad de espumas.....	27
3.5 Factores que afectan a las propiedades de espumado.....	29
<b>4. Comportamiento interfacial y propiedades de espumado de proteínas de soja.....</b>	<b>30</b>
<b>5. Hidrólisis proteica.....</b>	<b>35</b>
5.1 Método enzimático .....	37
5.2 Caracterización del hidrolizado.....	39
5.3 Propiedades del hidrolizado.....	40
<b>6. Interacciones proteína-polisacárido.....</b>	<b>43</b>
6.1 Formación de complejos electrostáticos.....	46

6.2	Incompatibilidad termodinámica.....	47
6.3	Impacto de la incompatibilidad entre proteínas y polisacáridos en geles, espumas e interfases.....	50
<b>7.</b>	<b>Polisacáridos en alimentos.....</b>	<b>59</b>
7.1	Goma xántica (X).....	59
7.2	Carragenano $\kappa$ ( $\kappa$ C) y Carragenano $\lambda$ ( $\lambda$ C).....	62
7.3	Goma garrofín o locust bean gum (GG).....	65
7.4	Goma guar (G).....	66
7.5	Polisacáridos tensioactivos: hidroxipropil metil celulosa (HPMC).....	66
	<b>Objetivos.....</b>	<b>68</b>
	<b><i>Materiales y Métodos</i></b>	
	<b>Materiales.....</b>	<b>69</b>
	<b>Métodos.....</b>	<b>69</b>
<b>1.</b>	<b>Preparación de los hidrolizados .....</b>	<b>69</b>
1.1	Hidrólisis enzimática de la proteína de soja.....	69
1.2	Determinación del grado de hidrólisis.....	70
<b>2.</b>	<b>Caracterización de las proteínas de soja e hidrolizados.....</b>	<b>71</b>
2.1	Grado de desnaturalización.....	71
2.2	Estudio del tamaño de partícula.....	72
2.3	Solubilidad.....	72
2.4	Hidrofobicidad superficial ( $H_o$ ).....	73
2.5	Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	73
2.6	Electroforesis capilar.....	74
2.7	Cromatografía de exclusión molecular.....	75
<b>3.</b>	<b>Producción de espumas.....</b>	<b>76</b>
3.1	Preparación de soluciones .....	76
3.2	Método de batido .....	77

3.2.1 Capacidad de espumado.....	77
3.2.2 Drenado de líquido y colapso de las espumas.....	78
3.3 Método de burbujeo.....	80
3.3.1 Capacidad de espumado.....	81
3.3.2 Velocidad de drenado de líquido.....	81
<b>4. Propiedades interfaciales .....</b>	<b>82</b>
4.1 Preparación de las muestras.....	82
4.2 Tensiometría.....	82
4.2.1 Tensiómetro tipo Wilhelmy (determinación de isothermas $\pi$ vs. concentración).....	83
4.2.2 Tensiómetro de Gota.....	87
<b>5. Estudio del efecto combinado de proteína de soja hidrolizada y polisacáridos en las propiedades de espumado y de la fase continua de las espumas.....</b>	<b>92</b>
5.1 Propiedades de espumado.....	94
5.2 Propiedades reológicas y térmicas de la fase continua de las espumas.....	95

## ***Resultados***

### ***Capítulo I***

#### ***Efecto del grado de hidrólisis en las propiedades de espumado e interfaciales de proteína de soja.***

<b>I.1 Caracterización del aislado de proteína de soja (SP) e hidrolizados..</b>	<b>97</b>
I.1.1 Hidrólisis enzimática de la proteína de soja y determinación del GH....	97
I.1.2 Grado de desnaturalización.....	97
I.1.3 Solubilidad.....	98
I.1.4 Hidrofobicidad superficial (Ho).....	99

I.1.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	101
I.1.6 Electroforesis Capilar.....	102
I.1.7 Cromatografía de Exclusión Molecular.....	103
<b>I.2 Propiedades de espumado de proteína de soja e hidrolizados.....</b>	<b>104</b>
I.2.1 Propiedades de espumado por el método de batido.....	104
I.2.2 Propiedades de espumado por el método de burbujeo.....	108
I.2.3 Discusión de los resultados obtenidos por el método de batido y burbujeo.....	110
<b>I.3 Propiedades interfaciales.....</b>	<b>112</b>
I.3.1 Isotermas de adsorción ( $\pi$ -C).....	112
I.3.2 Cinética de adsorción en la interfase aire-agua y reología de la película superficial.....	117
I.3.2.1 Cinética de adsorción.....	117
I.3.2.2 Reología dilatacional de las películas.....	125
<b>I.4 Relación entre propiedades de espumado e interfaciales de la proteína de soja e hidrolizados.....</b>	<b>133</b>
<i>Conclusiones</i> .....	135

## **Capítulo II**

### ***Efecto de la hidrólisis enzimática de la proteína de soja en la interacción con polisacáridos en espumas e interfases.***

<b>II.1 Interacción entre la proteína de soja y polisacáridos en espumas....</b>	<b>138</b>
<b>II.2 Efecto de la hidrólisis enzimática de la proteína de soja en la interacción con polisacáridos en espumas.....</b>	<b>143</b>
<b>II.3 Interacción entre proteína de soja y polisacáridos en interfases.....</b>	<b>149</b>
II 3.1 Cinética de adsorción.....	148
II.3.1 Reología dilatacional.....	152

<b>II.4 Efecto de la hidrólisis de la proteína de soja en la interacción con polisacáridos en la interfase.....</b>	<b>162</b>
II.4.1 Cinética de adsorción.....	162
II.4.2 Reología dilatacional.....	169
<b>II.5 Relación entre propiedades de espumado e interfaciales.....</b>	<b>177</b>
<i>Conclusiones</i> .....	179

### ***Capítulo III***

#### ***Estudio del efecto combinado de proteína de soja hidrolizada y polisacáridos en las propiedades de espumado y de la fase continua de las espumas***

<b>III.1 Estudio del efecto combinado de proteína de soja hidrolizada y polisacáridos en las propiedades de espumado.....</b>	<b>181</b>
<b>III.2 Estudio del efecto combinado de proteína de soja hidrolizada y polisacáridos en las propiedades reológicas y térmicas de la fase continua de las espumas.....</b>	<b>196</b>
III.2.1 Propiedades viscoelásticas de la fase continua de las espumas.....	199
III.2.2 Transiciones térmicas de la fase continua de las espumas.....	206
<b>III.3 Comportamiento térmico de los polisacáridos durante la etapa de enfriamiento y durante el almacenamiento refrigerado.....</b>	<b>214</b>
<i>Conclusiones</i> .....	216

<b><i>Bibliografía</i>.....</b>	<b>218</b>
---------------------------------	------------

## *Introducción*

## **1. Proteínas de soja**

### *1.1 La soja en la alimentación*

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

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

La soja es actualmente la semilla oleaginosa de mayor importancia en el mundo y su cultivo es la actividad más relevante del sector agropecuario argentino. En nuestro país los primeros lotes fueron sembrados en la década de 1960 en el sur de Santa Fe. A partir de los años 70 protagonizó una fuerte expansión, que continúa en la actualidad y que modificó profundamente la estructura de la producción agropecuaria y agroindustrial argentina.

Distintos tipos de productos proteicos derivados de la soja están disponibles comercialmente. Los métodos de preparación y procesado de dichos productos afectan a la composición y las propiedades funcionales de los componentes proteicos. A partir de la soja molida y desgrasada se obtienen concentrados (~70% de proteína) y aislados proteicos

(~90% de proteína). Estos productos pueden obtenerse con distinto tipo de textura: polvos, fibras, granulados, texturizados.

#### El mercado internacional

La soja es el cultivo oleaginoso de mayor importancia mundial. Estados Unidos, Brasil y Argentina son los principales productores.

Las favorables condiciones agroecológicas sumadas a una adecuada infraestructura para el almacenaje y transporte son los factores que sitúan a estos países en posiciones de liderazgo.

La producción primaria en Estados Unidos tiene mayores costos que en Argentina y Brasil. Sin embargo esta desventaja es atenuada por menores costos de transporte interno y comercialización.

Las cifras de producción mundial de soja para los últimos cinco años se resumen en la Tabla 1:

	1999/00	2000/01	2001/02	2002/03*	2003/04**
Producción mundial (miles de ton.)	159.930	175.180	184.870	196.770	198.730
Estados Unidos	72.220	75.060	78.670	74.830	65.800
Brasil	34.200	39.000	43.500	52.500	60.000
Argentina	20.200	26.900	30.000	34.800	36.500
China	14.290	15.400	15.410	16.510	16.200
India	5.200	5.250	5.400	4.000	6.200
Paraguay	2.910	3.500	3.550	4.200	4.500

Tabla 1: Producción anual de soja en miles de toneladas

\* Datos preliminares \*\* Datos estimados, fuente: Dirección de Industria Alimentaria sobre la base de datos del USDA y la SAGPyA.



## Producción nacional

El cultivo de la soja se ha convertido en la actividad económica de mayor importancia del sector agropecuario argentino. Durante la última década su producción creció en forma sostenida, a una tasa del 2,8 % promedio anual entre las campañas 90/91 a 95/96. Desde la campaña 97/98 hasta la de 2002/03 esa tasa se incrementó al 13,2%.

La principal razón de ese incremento fue la adopción de la semilla genéticamente modificada. El empleo de esta semilla, resistente al herbicida glifosato, permite reducir el uso de agroquímicos además de facilitar la siembra directa y así disminuir costos de producción.

La soja ha modificado profundamente la estructura de la producción agropecuaria y agroindustrial en nuestro país. La expansión de su cultivo desplazó a otros tradicionales como girasol, maíz o sorgo e incluso numerosos productores ganaderos o lecheros, abandonaron su actividad para dedicarse al cultivo de soja, alentados por los numerosos costos de producción y mayores márgenes de ganancia.

La semilla transgénica tuvo amplia aceptación entre los productores: casi la totalidad de la superficie sembrada corresponde a la soja genéticamente modificada. La semilla no transgénica sólo es empleada en la elaboración de productos específicos como bebidas a base de soja o alimentos proteicos, en consonancia con la imagen natural que caracteriza a estos productos. En estos casos la comercialización se realiza a través de la coordinación contractual entre productor y elaborador.

Por otro lado, las proteínas de soja también se aplican en productos no alimentarios como adhesivos (especialmente para maderas), papeles revestidos, plásticos y fibras textiles (Hettiarachchy y Kalapathy, 1997), espumas de poliuretano (Lin y col., 1996), biosensores de membrana para determinación de urea (García y col., 1997), entre otros. Pueden utilizarse también, para la producción de embalajes biodegradables y renovables y para la formación de recubrimientos comestibles (Cuq y col., 1998; Shih, 1994) dependiendo las características de estos últimos de las interacciones de la proteína con los plastificantes y los agentes de entrecruzamiento.

## 1.2 Aspectos nutricionales

El principal problema nutricional de los países subdesarrollados o en desarrollo es la malnutrición proteínico - energética. En la Argentina, tradicionalmente la población posee como fuentes proteicas aquellas de origen animal (carne y derivados, leche y productos lácteos, huevos y pescado). Motivos económicos, cuestiones de salud o metabólicas, o razones culturales, provocan que se busquen fuentes nutritivas alternativas. Muchas proteínas de origen vegetal (cereales, leguminosas y oleaginosas) contienen proteínas de baja calidad, por la deficiencia de aminoácidos esenciales. Los aislados proteicos de soja proveen una fuente proteica completa y de alta calidad, digestibilidad y disponibilidad, que cumple los requerimientos de aminoácidos esenciales para niños y adultos definidos por FAO/WHO/UNU (Food and Agricultural Organization / World Health Organization and United Nations University) (report FAO / WHO,1990). La metionina y la cisteína son los aminoácidos limitantes, pero puede mejorarse su valor nutricional en alimentos formulados sobre la base de cereales dado que se suplementan las deficiencias de cada uno en aminoácidos esenciales. En los últimos años, se han desarrollado avances en ingeniería genética con estrategias para incrementar el contenido de metionina en leguminosas (Lumen, 1990).

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

a) antinutrientes termolábiles: inhibidor de tripsina (impide la digestión proteica a nivel intestinal), hemaglutininas o lectinas (provocan la aglutinación de glóbulos rojos en la sangre), goitrógenos (impiden la asimilación de yodo), antivitaminas D, E, B<sub>12</sub> y fitatos (complejan metales como calcio, hierro, magnesio, etc. disminuyendo la asimilación intestinal). Estos factores antinutricionales, debido a su labilidad al calor, son destruidos o inactivados con tratamientos térmicos controlados.

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

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

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

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

### *1.3 Estructura y composición del grano de soja*

El poroto de soja tiene tres partes estructurales principales: a) la cáscara o envoltura ( $\cong 8\%$  del grano), que contiene aproximadamente un 86% de fibra dietaria compuesta por celulosa, lignina, hemicelulosa y pectinas; b) los cotiledones ( $\cong 90\%$  del grano), formados por células alargadas llenas de cuerpos proteicos (son esféricos, de diámetro 2-10  $\mu\text{m}$ , resisten la molienda moderada del grano, pueden aislarse por solubilización y contienen las proteínas de reserva del grano), estos se hallan rodeados por esferosomas (esféricos, diámetro 0,1-0,5  $\mu\text{m}$ , contienen aceite compuesto mayoritariamente por triglicéridos y en menor proporción fosfolípidos) y c) el hipocotiledón ( $\cong 2\%$  del grano) (Wolf, 1970; Nielsen, 1985a; Cheftel y col. 1989).

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

El contenido y la composición de proteínas, hidratos de carbono, lípidos y de minerales de las diferentes especies de soja, depende de factores genéticos, ambientales y de condiciones de cultivo y crecimiento (temperatura, humedad, características del suelo como acidez y nivel de fósforo, etc.).

#### 1.4 Caracterización de las proteínas de soja

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

a) proteínas de reserva: son las proteínas mayoritarias en el poroto maduro y actúan como fuente de carbono y nitrógeno en el desarrollo y el crecimiento de la planta posterior a la germinación. Se localizan en los cuerpos proteicos y se hidrolizan durante la germinación. Las más importantes son las globulinas: glicinina (11S),  $\beta$ - y  $\gamma$ - conglucina (7S).

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

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

El extracto acuoso de proteínas de soja a pH 7-8, puede ser fraccionado por distintos métodos: cromatografía de exclusión molecular, precipitación fraccionada (isoeléctrica, crioprecipitación, con sulfato de amonio, con solventes orgánicos), extracción fraccionada, ultracentrifugación y métodos inmunológicos, entre otros. En base a los coeficientes de sedimentación, se encuentran 4 fracciones mayoritarias 2S, 7S, 11S y 15S siendo cada fracción una mezcla compleja de proteínas (Wolf, 1970). Por inmunoelectroforesis (Catsimpoolas y col., 1969) se clasifican en glicinina,  $\alpha$ -conglucina,  $\beta$ -conglucina y  $\gamma$ -conglucina (Tabla 2).

Fracción	Proteína Total (%)	Componentes	Peso molecular (Da)
2S	~22	Inhibidores de tripsina Citocromo C Globulina: $\alpha$ -conglucina	8000; 21500 12000 18000 – 33000
7S	~37	Hemaglutininas, Lipoxigenasas, $\beta$ -Amilasas Globulinas: 7S básica $\gamma$ - conglucina $\beta$ - conglucina	110000; 102000 61700 168000 105000 – 150000 180000 – 210000
11S	~31	Globulina: glicina	300000 – 350000
15S	~11	Dímeros de glicina	~600000

**Tabla 2:** Cantidades aproximadas y componentes de las fracciones obtenidas por ultracentrifugación de las proteínas de soja extraídas en agua (Wolf, 1970 y Fukushima, 1991).

Con el fin de caracterizar y estudiar las globulinas mayoritarias, se han desarrollado numerosos métodos para separarlas y purificarlas: cromatografía de exclusión molecular con ConA-Sepharose 4B y Sepharose 6B (Yamagishi y col., 1980), precipitación con ácido clorhídrico y Tris (trihidroximetilaminometano) a pH 6,4 – 6,6 (11S) y a pH 4,8 (7S) (Thanh y Shibasaki, 1978), afinidad de proteínas para formar quelatos metálicos, cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC).

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

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

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

### 1.5 Características de la glicinina

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

Cada una de las 6 subunidades (no idénticas), está compuesta por un polipéptido ácido "A" (PM 34,8-45 kDa, pI 4,75-5,40) y un polipéptido básico "B" (PM 19,6-22 kDa, pI 8,05-8,5) (Hermansson, 1986), ambos son sintetizados por un mismo precursor que sufre una modificación post-translacional, quedando unidos por una unión disulfuro. Los polipéptidos presentan polimorfismos, siendo sintetizados por familias de genes homólogos (Moreira y col., 1979), asociándose en forma no azarosa. Se han purificado y caracterizado 5 subunidades principales, clasificándose en dos grupos según la homología de la secuencia de aminoácidos: Grupo I (PM ~ 58 kDa): A<sub>1a</sub>B<sub>2</sub>, A<sub>1b</sub>B<sub>1b</sub>, A<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> y grupo II (PM ~ 62-69 kDa): A<sub>3</sub>B<sub>4</sub>, A<sub>5</sub>A<sub>4</sub>B<sub>3</sub> (Nielsen, 1985). El contenido de residuos de cisteína (Cis) y metionina (Met) es mayor en el grupo I (Cis: 8 y Met: 5-7) que en el grupo II (Cis: 6 y Met: 2-4), formándose varios enlaces disulfuro, de los cuales uno sólo está involucrado en la unión de los polipéptidos A y B (a excepción del polipéptido A<sub>4</sub> que se encuentra en forma libre), y encontrándose también sulfhidrilos libres (Utsumi y col., 1997). El polimorfismo en la composición de las subunidades también se presenta en distintos cultivares, exhibiendo diferencias en las propiedades funcionales y nutricionales.

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

La estructura cuaternaria presenta reacciones de asociación – disociación, dependiendo de las condiciones del medio (pH, fuerza iónica  $\mu$ , temperatura, etc.) (Hermansson, 1986). La glicinina (11S) se disocia a bajas  $\mu$  (< 0,01M) y pH neutro a formas 2S-3S

(probablemente subunidades) y 7S (trímeros), mientras que a altas  $\mu$  ( $> 0,1-0,2M$ ) se asocia parcial y reversiblemente a forma 15S y 19S (posiblemente dímeros y trímeros, unidos vía -S-S-) (Brook y Morr, 1985; Wolf, 1993; Utsumi y col., 1997). También se han encontrado en el estado nativo polipéptidos A y B no unidos por enlace disulfuro (Wang y Damodaran, 1990; Wolf, 1993).

### 1.6 Características de la $\beta$ -conglucina

La  $\beta$ -conglucina es una glicoproteína globular trimérica (PM 150-200 kDa) que aparenta un disco plano. Está compuesta por la combinación de subunidades con secuencias aminoacídicas similares, tres mayoritarias:  $\alpha$  (PM 57 – 72 kDa, pI 4,9),  $\alpha'$  (PM 57 – 68 kDa, pI 5,2) y  $\beta$  (PM 42 – 52 kDa, pI 5,7-6,0) (Hermansson, 1986; Yamauchi y col., 1991) y una subunidad minoritaria  $\gamma$  similar en tamaño a la subunidad  $\beta$  (Utsumi y col., 1997). La molécula de  $\beta$ -conglucina presenta heterogeneidad, encontrándose siete tipos diferentes de oligómeros: B<sub>1</sub> ( $\alpha'\beta_2$ ), B<sub>2</sub> ( $\alpha\beta_2$ ), B<sub>3</sub> ( $\alpha\alpha'\beta$ ), B<sub>4</sub> ( $\alpha_2\beta$ ), B<sub>5</sub> ( $\alpha_2\alpha'$ ), B<sub>6</sub> ( $\alpha_3$ ) (Thanh y Shibasaki, 1978) y B<sub>0</sub> ( $\beta_3$ ) (Yamauchi y col., 1981). El contenido de triptófano ( $\alpha'$ : 2,  $\alpha$ : 1,  $\beta$ : 0 residuos) y aminoácidos sulfurados (Cis:  $\alpha'$ : 1,  $\alpha$ : 1,  $\beta$ : 0, Met:  $\alpha'$ : 4,  $\alpha$ : 1,  $\beta$ : 0) es muy bajo y no se forman uniones disulfuro entre las subunidades, siendo las interacciones principalmente hidrofóbicas y puente hidrógeno (Thanh y Shibasaki, 1976b).

El contenido de carbohidratos es de aproximadamente el 5% y consisten en una (en  $\beta$ ) o dos (en  $\alpha$  y  $\alpha'$ ) cadenas de (glucosa – N-acetil-glucosamina)<sub>2</sub> – manosa<sub>7,8,9</sub> unidas a residuos de asparagina (Utsumi y col., 1997). Las subunidades  $\alpha$  y  $\alpha'$  presentan mayor carácter hidrofílico debido a la mayor glicosilación y a la inserción de un dominio hidrofílico  $\alpha$ -hélice que no está presente en la subunidad  $\beta$  y que les confiere un mayor peso molecular.

La  $\beta$ -conglucina exhibe comportamiento de asociación – disociación dependiendo del pH y de la fuerza iónica del medio. La estructura trimérica (7S) es estable a pH neutro y alta fuerza iónica ( $\mu > 0,5M$ ) o a pH ácido (pH  $< 4,8$ ) y dimeriza (excepto los oligómeros B<sub>0</sub> y B<sub>6</sub>) a baja fuerza iónica (7S  $\mu = 0,5M \leftrightarrow 9S \mu = 0,1M$ ) (Brook y Morr, 1985). A fuerzas iónicas aún menores ( $\mu < 0,01M$ ) o en medio ácido o alcalino y a  $\mu = 0,5M$ , las subunidades  $\alpha$  y  $\alpha'$  se disocian del protómero (Thanh y Shibasaki, 1979; Iwabuchi y col., 1981).

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

La glicina y la  $\beta$ -conglucina presentan considerable homología en las secuencias genéticas, compartiendo características estructurales y relacionándose probablemente con un mismo gen ancestral. La principal diferencia entre ellas es la inserción de una región hipervariable en la glicina, de naturaleza ácida (con alto contenido de aspartato y glutamato). Las moléculas están compuestas por tres dominios primarios. El COOH-terminal incluye la mitad de cada molécula, es la región más conservada, contiene hojas plegadas y curvaturas  $\beta$  y es altamente hidrofóbica, localizándose en el interior de la molécula y tiene una función importante en el mantenimiento de la estructura. El dominio central contiene una mezcla de  $\alpha$  hélices, curvaturas y hojas  $\beta$  (en este dominio estaría incluido el inserto de hélice de la 11S, aumentando su tamaño) y el dominio NH<sub>2</sub>-terminal que varía mucho entre ambas globulinas, contiene  $\alpha$  hélices y curvaturas  $\beta$  y estaría localizado en el exterior de la molécula (Nielsen, 1985b).

### *1.7 Propiedades funcionales de las proteínas de soja*

Se definen como propiedades funcionales a las propiedades físico-químicas que afectan al comportamiento de las proteínas en los alimentos durante la preparación, el procesado, el almacenamiento y el consumo de los mismos. Estas propiedades no sólo son importantes en la calidad del producto final, sino también durante el procesamiento del mismo (Kinsella, 1979). Las proteínas representan una clase importante de ingredientes funcionales porque poseen un amplio rango de propiedades funcionales (Tabla 3). Adicionalmente, interactúan con otros componentes y mejoran los atributos de calidad de los alimentos. Las propiedades funcionales están vinculadas a las interacciones de las proteínas con el agua, lípidos, hidratos de carbono, hidrocoloides, entre moléculas de la misma proteína entre sí y entre distintas proteínas (Phillips y col., 1994a).



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

Tabla 3: Propiedades funcionales de proteínas (Phillips y col. 1994a).

La diversidad de factores que afectan a las propiedades funcionales de una proteína pueden apreciarse en la Tabla 4.

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

Tabla 4: Algunos factores que influyen en las propiedades funcionales de las proteínas (Kinsella, 1979).

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

mayores cantidades, permite evaluar la contribución funcional real de la proteína o “performance”, a través de las cualidades organolépticas y de textura del producto final. Es indispensable en etapas de optimización y definición de la tecnología industrial de producción. iii) análisis a nivel molecular: se estudia la estructura molecular, tipos de enlace, características eléctricas, características térmicas, etc. Permite conocer las causas moleculares de la funcionalidad lo cual permite el avance en el diseño de proteínas de características específicas.

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

Las proteínas de soja en sus diversas formas tienen variadas propiedades funcionales que las hacen adecuadas para ser utilizadas en diversos alimentos. Algunas de las numerosas aplicaciones pueden apreciarse en la Tabla 5.

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

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

<sup>a</sup> denominaciones: F (harina), C (concentrado), A (aislado), H (hidrolizado), S (suero) de soja.

Tabla 5: Propiedades funcionales de productos proteicos de soja en alimentos (basado en Kinsella, 1979).

## 2. *Conceptos generales sobre propiedades interfaciales de proteínas*

Una aplicación de las proteínas es su uso como surfactantes en alimentos emulsionados o espumados. Esto es posible porque las proteínas pueden ubicarse en la interfase orientando las zonas no-polares hacia la fase no-polar y las polares hacia la fase polar. El comportamiento de las moléculas de proteína en la interfase es diferente al de moléculas simples y pequeñas de otros surfactantes (Phillips y col., 1994b). Las moléculas de proteínas son anfifílicas, poseen flexibilidad molecular y capacidad de alterar su conformación para reorientarse y presentar asociaciones intermoleculares en la interfase formando películas estables. Las propiedades superficiales de las proteínas, generalmente reflejan la facilidad relativa con la cual las proteínas pueden difundir, adsorberse,

desplegarse y acomodarse en una superficie o en una interfase (MacRitchie, 1978), siendo numerosos los factores que influyen sobre las mismas (Tabla 6).

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

Tabla 6: Factores que afectan a las propiedades superficiales e interfaciales de las proteínas (Phillips y col., 1994b).

### 2.1 Termodinámica de la adsorción de proteínas

En el seno de una solución, las moléculas están rodeadas de otras de su misma especie, y las fuerzas de interacción entre ellas son iguales en todas las orientaciones. Sin embargo, las moléculas en la superficie del líquido (o en una interfase entre dos líquidos inmiscibles) están sujetas a una fuerza neta, porque las fuerzas de atracción ejercidas por las moléculas en el seno de la solución son diferentes a las ejercidas por las de la fase vapor (o la otra fase líquida). El desbalance de fuerzas se traduce en una energía libre de superficie (o interfacial) o energía libre de Gibbs. Como la energía libre de las moléculas en la interfase es mayor que en el seno de la solución, el líquido tiende a contraerse para minimizar la superficie expuesta. Una expansión de dicha superficie ( $\Delta A$ ) de contacto requiere de un trabajo proporcional a dicha expansión ( $W$ ) según:  $W = \sigma \Delta A$ , donde  $\sigma$  es la tensión superficial si la interfase es aire – líquido o la tensión interfacial para interfases líquido/líquido y tiene unidades de [fuerza]/[longitud] (ej.: N/m). Cuanto menor es  $\sigma$ , menor es el trabajo necesario para aumentar la superficie. Debido a su naturaleza anfílica, las proteínas pueden concentrarse en la superficie formando películas (films) mono o multimoleculares disminuyendo la tensión superficial y generando una presión superficial “ $\pi$ ”, que se define como  $\pi = \sigma_{\text{solv}} - \sigma_1$  donde  $\sigma_{\text{solv}}$  y  $\sigma_1$  son la tensión superficial del solvente y la solución respectivamente.

La adsorción espontánea de las moléculas anfifílicas en las interfaces aire-líquido o líquido - líquido es un fenómeno directamente relacionado con las tensiones interfaciales existentes y dependerá del gradiente del potencial químico  $d\mu/d\xi$ , donde  $\mu$  es el potencial químico y  $\xi$  es la distancia de la proteína a la interfase. El flujo a la interfase "J", en ausencia de una fuerza externa, dependerá del gradiente de concentración y del coeficiente fenomenológico "L" (dependiente a su vez de la concentración, del coeficiente de difusión y de la temperatura). Deben considerarse las distintas contribuciones por las interacciones moleculares (Xu y Damodaran, 1993) según:

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

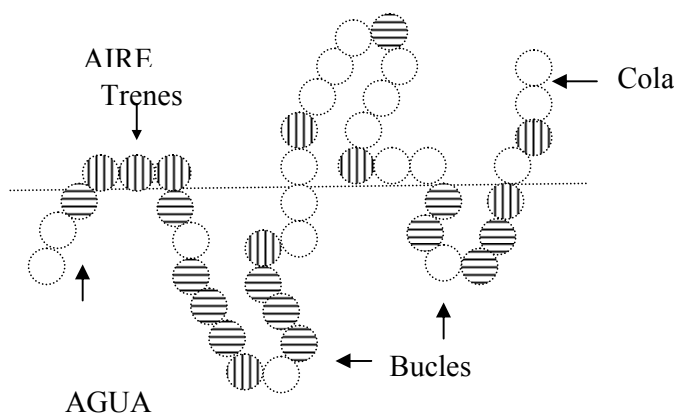
donde los términos corresponden al potencial ideal (id), electrostático (ele), hidrofóbico ( $H\phi$ ), de hidratación (hid) y conformacional (conf) de la proteína, respectivamente. Si la suma de los gradientes de los potenciales químicos es negativa a una dada distancia de la interfase, la proteína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

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

## 2.2 Cinética de adsorción de las proteínas en la interfase

### *Difusión, adsorción y reordenamiento*

La adsorción de proteínas globulares generalmente procede por fijación de cantidades variables de segmentos polipeptídicos a la interfase, y en muchos casos, largas porciones de la molécula proteica permanecen en la fase acuosa. En la Figura 1 se muestran las distintas conformaciones que adquieren las proteínas en la interfase aire-agua. Los “trenes” son los segmentos adsorbidos en la interfase; los “bucles”, son segmentos de las cadenas que se extienden en la fase líquida, y las “colas”, los extremos de la cadena polimérica que, por tener menor energía libre de adsorción que otros segmentos, tienden a extenderse hacia el aire. La distribución de estas partes dependerá de la energía libre de adsorción de los segmentos de la molécula polimérica y de la flexibilidad de las cadenas (Kim, 1985).



**Figura 1:** Representación esquemática de una cadena proteica cuando se adsorbe en la interfase. ● : residuos polares, ◐ : residuos apolares y ○: residuos neutros.

En un sistema acuoso no agitado, inicialmente, la molécula de proteína hidratada difunde rápidamente a la interfase y el proceso de adsorción está controlado por la difusión, dependiendo la velocidad de difusión del tamaño y la forma molecular y de la posibilidad de que la misma se adsorba al colisionar con la interfase (dependiente de la hidrofobicidad y del impedimento electrostático) (Tornberg, 1978). La superficie de la película se encuentra en continua formación, y para cubrir la máxima área, las moléculas que arriban a

la interfase se despliegan y se desnaturalizan parcialmente, dependiendo la capacidad de adsorción de la flexibilidad de la molécula. La fase siguiente a la adsorción involucra un ensamblaje de las moléculas proteicas en la interfase que está acompañada por un incremento en la presión superficial (esto es, una disminución en la tensión superficial). Cuando la concentración de la proteína adsorbida ( $\Gamma$ ) se incrementa, se genera una barrera electrostática sobre el lado acuoso de la superficie debido a la orientación preferencial de los grupos proteicos cargados hacia la fase acuosa polar. Las moléculas proteicas requieren entonces una energía cinética adecuada para superar la barrera electrostática (que involucra fuerzas repulsivas, impedimentos estéricos y osmóticos) y comprimir las moléculas ya adsorbidas en la interfase, para permitir la adsorción de proteína adicional. La habilidad de dichas moléculas para adsorberse, penetrar y crear espacio en la película preexistente y reordenarse en la interfase, es ahora la determinante de la velocidad. Una vez adsorbidas en la interfase, las moléculas proteicas interactúan en la misma, para lograr un estado de menor energía libre (Phillips y col., 1994b). Con el incremento de la cantidad de proteína adsorbida el ordenamiento de las moléculas en forma extendida disminuye y la película cambia de expandida a comprimida (Kinsella y Phillips, 1989). El proceso de desnaturalización puede comenzar segundos u horas luego de la adsorción, dependiendo de la flexibilidad y de la estructura de la proteína, y puede continuar en un grado más bajo durante días, reteniéndose la estructura terciaria de la proteína en algunas películas (Wilde y Clark, 1996).

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

Para estudiar la cinética de adsorción proteica en la interfase se mide la variación de la concentración superficial y de la presión superficial en función del tiempo. Se alcanza un valor de equilibrio, presentando la adsorción cierto grado de reversibilidad (Gonzalez y

Mac Ritchie, 1970). Los procesos de desorción pueden ser muy lentos, siendo las barreras energéticas mayores a menor concentración proteica (Narsimhan y Uraizee, 1992).

### *2.3 Propiedades de las películas proteicas*

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

Para la formación de una película cohesiva, 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 de la película (Halling, 1981). El desarrollo de películas apropiadas, con óptimas propiedades viscoelásticas, no sería posible en el caso de películas constituidas por polipéptidos simples de bajo peso molecular, donde las interacciones intermoleculares son débiles; las interacciones en la interfase deben maximizar las propiedades de cohesión y resistencia mecánica.

Las propiedades viscoelásticas de 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: a) tensión de corte, que produce cambios de forma y b) compresión/dilatación que produce cambios en el área. Debe especificarse que clase de tensión fue aplicada en las mediciones de viscosidad superficial (Lucassen-Reynders, 1993).

#### *Viscosidad superficial de corte:*

Es la fuerza requerida para desplazar y mover las moléculas de un punto a otro y refleja la atracción neta entre las proteínas de la película interfacial y entre esta última y las capas de líquido adyacentes. Esta viscosidad superficial o resistencia a los esfuerzos de corte de la superficie de la película suele ser muy alta, refleja la resistencia mecánica de la misma y es un parámetro importante relacionado con la estabilidad de películas y espumas. Las



monocapas proteicas en las interfases contienen entre 1 a 8 mg proteína/m<sup>2</sup> y exhiben una viscosidad y elasticidad considerable no obstante su extrema delgadez (1 a 10 nm). Luego de cierta compresión de la película, las proteínas dentro de la misma colapsan y coagulan, reflejando una extensiva interacción entre ellas. La viscosidad superficial se incrementa con el espesor de la película y varía con el tipo de proteína, el tiempo y el pH (Phillips y col., 1994b).

*Elasticidad y viscosidad de dilatación:*

Ambas propiedades pueden ser combinadas en un único parámetro, el módulo viscoelástico superficial de la película “ $\epsilon$ ” que vincula la variación de la tensión superficial con los cambios del área superficial “ $A$ ” ( $\epsilon = -d\pi/d(\ln A)$ ) (Kim, 1985). Durante la expansión de la película ocurren diversos fenómenos: i) difusión del surfactante desde la subcapa en la solución a la interfase y ii) reordenamientos de las moléculas adsorbidas dentro de la superficie (los cuales pueden ser retardados por varios eventos: presencia de una barrera de adsorción, lentos reordenamientos moleculares, formación de complejos, transiciones de fase en la superficie y formación o destrucción de una estructura tridimensional) (Lucassen – Reynders, 1993).

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

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

Tensión superficial: puede ser medida por el método del volumen de las gotas (estalagmómetro de Traube), por caracterización de la forma y del tamaño de la gota

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

Características de flujo de películas superficiales (umbral de fluencia, viscosidades, comportamiento no-newtoniano): viscosímetro de tracción viscosa de un canal (Mannheimer y Schechter, 1970), viscosímetros de anillo (Blank y col., 1969; Blank y Britten, 1970) o péndulo rotatorio (Miller y col., 1998), cilindros de sobreflujo (Prins, 1999).

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

Concentración superficial ( $\Gamma$ ): técnicas con marcadores radioactivos (Hunter y col., 1991), incluyendo elipsometría (Graham y Phillips, 1979b); FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) donde se determinan por difusión con marcadores isoterma de adsorción ( $\sigma$  vs  $\Gamma$ ), características de drenado y de angostamiento de la película (Clark y col., 1994), interferometría laser donde también se determina el espesor de la películas (Damodaran, 1989; Wilde y Clark, 1996).

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

Estudios morfológicos: microscopía del ángulo de Brewster (Rodríguez Niño y col., 1998), microscopía electrónica con digitalización de imágenes de la formación de finas películas líquidas suspendidas en aire (Clark y col., 1994; Miller y col., 1998); microscopía de

fuerza atómica (AFM) por medio de la cual se observan las redes interfaciales (Gunning y col., 1996).

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

Estabilidad de la película: drenado de la película usando platos porosos, celda de Sheludko. Estudios de interacciones moleculares: las interacciones coloidales que involucran biopolímeros adsorbidos en la interfase ocurren en general a distancias de nanómetros y son una combinación de fuerzas de Van der Waals, electrostáticas y de interacciones entrópicas y estéricas. La técnica de medición de fuerzas superficiales permite la determinación de las magnitudes de las fuerzas moleculares entre dos películas superficiales, resultando una técnica útil para determinar bases fundamentales de la funcionalidad y el comportamiento de proteínas (Leckband y Israelachvili, 1993; Toprakcioglu, 1994).

### ***3. Conceptos generales sobre propiedades de espumado de proteínas***

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

### 3.1 Estructura de espumas

Las espumas son sistemas coloidales termodinámicamente inestables, en los cuales una fase dispersa gaseosa es mantenida en una matriz continua, líquida o semisólida, que contiene un agente con actividad superficial. En la dispersión, las burbujas de gas se encuentran separadas por una fase continua de capas delgadas de líquido (lamelas), que pueden tener espesores del orden de nanómetros. Como consecuencia del gran área interfacial líquido - gas existente entre las interfases no miscibles, se requiere energía para producir las espumas y éstas son altamente inestables (Halling, 1981).

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

La fracción de volumen de gas en la espuma " $\phi$ " 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 una película espesa de líquido y, en la segunda situación, que puede derivarse luego de un excesivo drenado o formarse directamente a valores de  $\phi$  bajos, la espuma se transforma en una "espuma seca", de burbujas polihédricas.

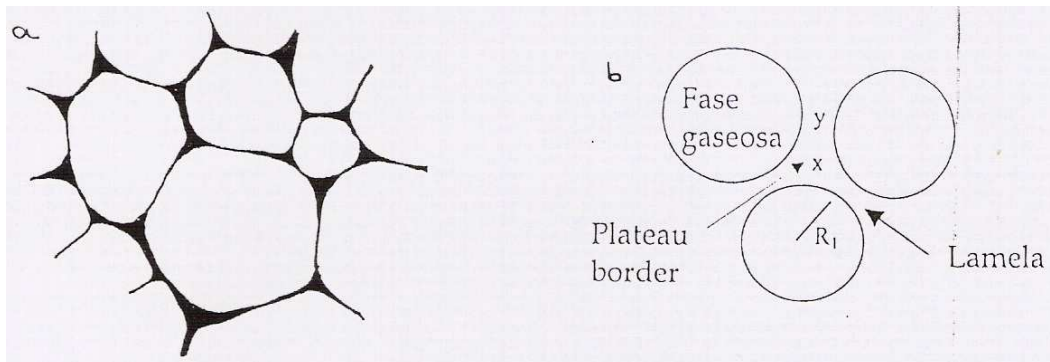


Figura 2: a) Esquema de la estructura de burbujas de una espuma y b) Formación del “plateau border” en la intersección de tres burbujas de gas. La curvatura negativa en X provoca que la presión sea menor que en Y, fluyendo líquido hacia X.

La deformación de las burbujas también se observa cuando  $\phi$  es muy alta ( $\phi > 0,75$ ), pues no es posible un empaquetamiento del gas en esferas, presentándose una compresión de las burbujas y adquiriendo formas poliédricas con caras parcialmente planas. La capa fina de líquido que separa dos caras de poliedros adyacentes se denomina “lamela” y los canales de encuentro de estas lamelas se conocen como “plateau border” (Figura 2) (Kim, 1985; Damodaran, 1997).

### 3.2 Formación de espumas

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

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

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

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

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

### *3.3 Estabilidad de espumas*

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

#### *Cremado (o sedimentación):*

Por diferencia de densidad las burbujas de aire ascienden a través de la fase acuosa y ésta fluye alrededor de las burbujas. En este mecanismo el movimiento de las burbujas es más importante que el del líquido y la velocidad del mismo depende de la ley de Stokes

$v = \frac{2g\delta R^2}{9\eta}$ , donde  $g$  es la aceleración de la gravedad,  $\delta$  y  $\eta$  son la densidad y la viscosidad de la fase continua respectivamente y  $R$  es el radio de la burbuja (Walstra, 1989).

#### *Drenaje de líquido:*

A altas  $\phi$  las burbujas pasan de esféricas a poliédricas, y el líquido drena por gravedad. Dicho drenado ocurre por: a) efecto de la gravedad, b) pasaje de líquido desde la región laminar entre 2 burbujas hacia el plateau border (PB) situado en la intersección de 3 burbujas (Figura 2), debido a la succión capilar del PB provocada por una diferencia de presión  $\Delta P$  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  $\gamma$  es la tensión superficial) y c) pasaje del líquido a través del plateau border a la fase continua por influencia de la gravedad (Wagner, 2000). El drenaje debido a la gravedad se puede asemejar al flujo viscoso de un líquido entre dos placas paralelas, donde la velocidad promedio ( $v_{av}$ ) está dada por la ecuación de Gibbs:  $v_{av} = \frac{d^2 \cdot g \cdot \delta}{8\eta}$  donde  $d$  es la distancia entre los platos (Kim, 1985).

#### *Desproporción o maduración de Ostwald:*

La presión dentro de una burbuja, dada por la ecuación de Laplace, es mayor a menor radio de las burbujas. De acuerdo a la ley de Henry, la solubilidad de un gas es proporcional a su presión, siendo esta mayor en la vecindad de una burbuja chica, causando el transporte de gas por difusión, desde las burbujas chicas hacia las grandes, aumentando el tamaño promedio de las burbujas. Este proceso se acelera a sí mismo, pues las burbujas pequeñas disminuyen su tamaño. Este proceso es dependiente de la solubilidad y de la difusión del gas en el líquido y de la permeabilidad y tensión superficial de la película (Prins, 1988). La solubilidad de los gases en agua es mayor que la de los aceites, siendo este mecanismo mucho más importante en espumas que en emulsiones.

*Colapso:*

Consiste en la ruptura de la película 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 las películas: presencia de partículas hidrofóbicas rígidas mayores que el espesor de la película y que contactan dos burbujas o de partículas dispersas que desplazan al surfactante o que generan un movimiento de angostamiento de la película dando lugar a su ruptura (Prins, 1988); en películas muy delgadas (en el orden de los 10 nm), ocurre una ruptura espontánea, por formación de un agujero (para lo cual primero debe incrementarse el área superficial) y es dependiente de la tensión superficial y de las propiedades viscoelásticas de la película (Walstra, 1988). Los cambios de tamaño de burbuja resultantes de la desproporción, provocan un estrés considerable en las espumas polihédricas y esto podría iniciar la ruptura de la lamela (Halling, 1981).

Cuando las superficies de dos burbujas se aproximan, las fuerzas atractivas (tipo Van der Waals o electrostáticas) y repulsivas (electrostáticas o estéricas) comienzan a ser determinantes en el espesor de la lamela, presentándose efectos estéricos por efectos del volumen de restricción (perdiéndose la configuración entrópica) y efectos de presión osmótica por interpenetración de las capas adsorbidas (Kim, 1985). Los efectos de las fuerzas coloidales en las interacciones energéticas de dos superficies que se aproximan, fueron analizadas en la teoría DLVO (Deryagin y Landau, Verwey y Overbeek) donde se postula que las repulsiones pueden llevar a una barrera energética importante a distancias de pocos nm y a una separación mayor (del orden de 10 nm), un mínimo de energía secundario podría dar una floculación reversible (Halling, 1981).

*Otros mecanismos:*

Configuraciones inestables: en espumas polihédricas, cuando una burbuja desaparece por desproporción o ruptura de la película, se genera una configuración inestable en el cual tres



películas se encuentran en el plateau border. Este arreglo inestable se transforma en una configuración estable por formación de una nueva película (Prins, 1988).

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

#### *Efecto Gibbs-Marangoni:*

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

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

### *3.4 Métodos para el estudio de la formación y estabilidad de espumas*

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

#### *Espumas formadas por burbujeo o inyección:*

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

Mediciones conductimétricas: métodos semi-micro y microconductimétricos (Kato y col., 1983b; Wright y Hemmant, 1987; Torikata y col., 1991; Tömösközi y Pungor, 1993; Loisel y col., 1993; Wagner y col., 1996;), métodos adicionando imágenes tomadas por video para el análisis simultáneo de textura (Guillerme y col., 1993), métodos conductimétricos múltiples (Rodríguez Patino y col., 1997; Phianmongkhol y Varley, 1999)

Mediciones de cambio de presión por decaimiento del área interfacial (Yu y Damodaran, 1991 a ; Dickinson y col., 1992).

Mediciones con un sensor de fibra óptica móvil para el análisis de distribución de burbujas y determinación de volumen de gas en espumas líquidas por diferencias en índices de refracción (Bisperinik y col., 1992; Murray y col., 2002; Söderberg y col., 2003).

#### *Espumas formadas por batido:*

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

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

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

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

Se realizan también estudios morfológicos de espumas por microscopía óptica y macrofotografía, microscopía electrónica, crio-fijación y criomicroscopía, microscopía a bajas temperaturas que permite el estudio de estabilidad, cambio de forma (esférica a

polihédrica), cambios configuracionales en la lamela y el plateau border, observación de desproporción, ruptura y floculación (Wilson, 1989). Métodos como el reómetro óptico (reómetro, microscopio y analizador de imágenes) y las tomografías ópticas tridimensionales (Monnereau y Adler, 1998).

### 3.5 Factores que afectan a las propiedades de espumado

Los factores que afectan la formación y estabilidad de espumas proteicas se mencionan en la Tabla 7.

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

Tabla 7: Factores que afectan a la formación y estabilidad de espumas proteicas (basado en Kinsella, 1981a y b).

Los factores que gobiernan la creación de la 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 y ser capaz de disminuir rápidamente la tensión superficial (German y col., 1985). La estabilidad de la espuma

refleja las propiedades reológicas, eléctricas y de hidratación de la película proteica. La formación de una película estable requiere de moléculas largas (para permitir mayores interacciones en la interfase fortaleciendo las películas), anfifílicas (para proveer una distribución balanceada de residuos cargados y apolares que mejoran las interacciones interfaciales) y capaces de retener parte de la estructura (mejora la superposición e interacción de segmentos en la película). Deben poseer regiones interactivas (la disposición de diferentes segmentos funcionales facilita las interacciones secundarias en la fase acuosa, la fase gaseosa y la interfase), grupos cargados (afectan las interacciones proteína - proteína en la película y producen repulsiones electrostáticas entre burbujas adyacentes) y residuos polares (residuos cargados o hidratables que mantienen las burbujas apartadas, unen y retienen agua) (Kinsella y Phillips, 1989).

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

#### ***4. Comportamiento interfacial y propiedades de espumado de proteínas de soja.***

En la interfase aire-agua las proteínas a causa de su naturaleza química anfifílica, es decir, afinidad por el agua y por la fase no polar, se adsorben y orientan con los grupos no polares hacia el aire y los grupos polares hacia el agua. Este orden molecular y formación de la película por un surfactante, reduce la tensión superficial y contribuye a la estabilidad de la dispersión. Se forman estructuras que pueden ser descritas en términos de segmentos de una cadena de polipéptidos formando tanto lazos de residuos peptídicos en la interfase como bucles o colas de residuos que sobresalen hacia el seno de la fase acuosa (Dickinson y col, 1989). La reducción de la tensión superficial es un importante atributo que optimiza la energía involucrada en el proceso de espumado (Walstra,1993) y la producción de burbujas más pequeñas, lo cual es un importante factor en la estabilidad de las mismas (Dickinson,1992).

La tensión superficial del agua pura es alrededor de  $\sigma = 73,5\text{mN/m}$ , se define la presión superficial,  $\pi$  como  $\pi = \sigma_0 - \sigma$ , donde  $\sigma_0$  y  $\sigma$  son la tensión superficial del agua pura y de la

solución respectivamente. A su vez, a tiempos largos se la denomina presión de equilibrio ( $\pi_e$ ).

La presión superficial depende de factores intrínsecos de la proteína como de la interacción con otras moléculas como así también de la interacción con el solvente. Son de especial importancia las propiedades físicas, químicas, conformacionales, que incluyen, tamaño, forma, secuencia de aminoácidos; carga y distribución de carga de los polipéptidos, esto va a determinar la concentración superficial de los segmentos adsorbidos, las interacciones laterales segmento-segmento, de las interacciones electrostáticas y segmento-solvente y el grado de desdoblamiento de la proteína adsorbida (Narsimhan y Uraizee, 1992).

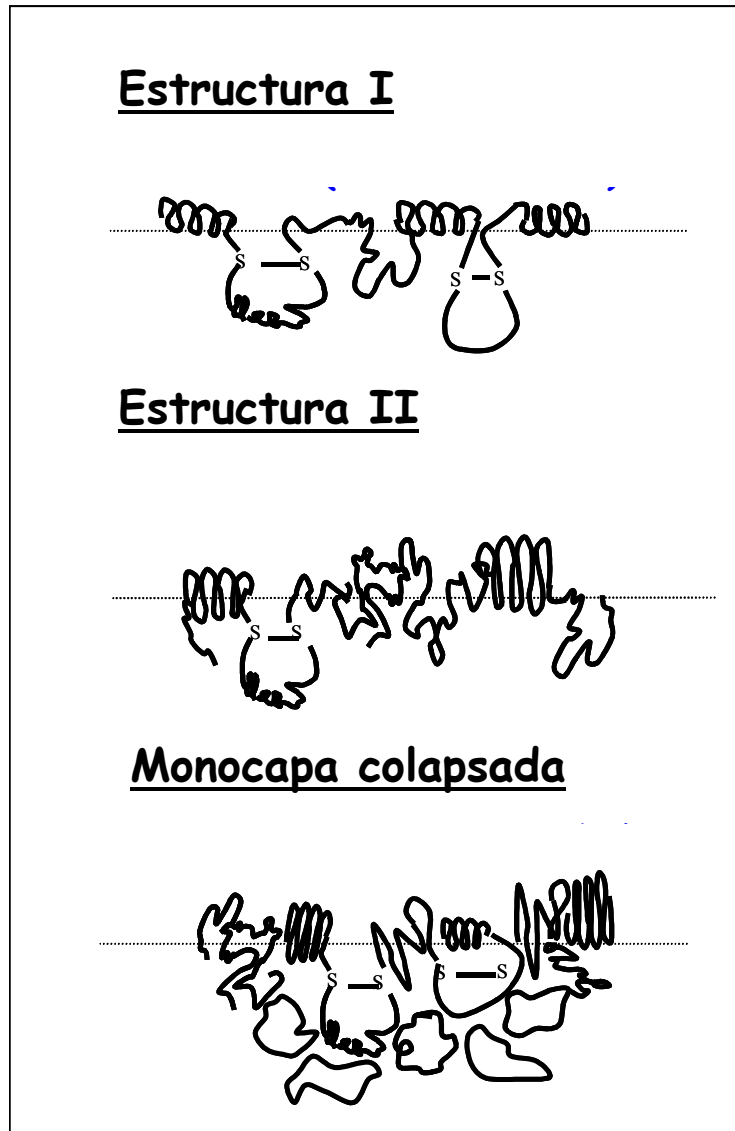
Otra característica es la llamada “ eficiencia de adsorción” la que corresponde a la menor cantidad de proteína que produce la máxima presión superficial (Graham y Phillips, 1979b).

Dos tipos de películas superficiales extremos pueden existir: películas diluídas, donde la monocapa consiste principalmente en moléculas desplegadas en la interfase en una configuración entrelazada y películas concentradas, donde gran parte de la estructura nativa está retenida (Tornberg, 1978).

El grado de estructuración de la monocapa es la asignada por los estados de expansión, (estructura I) condensación (estructura II) y colapso (estructura III) de la misma determinado principalmente por la concentración de la proteína en la interfase. Los patrones estructurales en la monocapa son la consecuencia de la conformación de las moléculas adsorbidas en la interfase aire-agua.

La estructura I tiene una conformación llamada de tren ya que los péptidos se encuentran principalmente en secuencia de aminoácidos adsorbidos a la monocapa. Cuando la presión superficial aumenta, pasan a formarse colas y bucles determinándose una estructura tipo II. La transición desde la estructura tipo I a la tipo II representa rearrreglos de una estructura “expandida” a una estructura “condensada”. El “colapso” (estructura III) de la monocapa está asociada con un mayor aumento de la presión superficial que lleva a la formación de multicapas de proteína en la interfase aire-agua (Wollenweber, 2000). La transición desde estructura I a II ocurre a un valor definido de presión superficial llamado presión crítica ( $\pi_{cr}$ ), mientras que el cambio de estructura de II a III ocurre a una presión denominada como presión de colapso ( $\pi_c$ ) (Graham & Phillips, 1979b). Se ha reportado el valor de dichas presiones para las fracciones de la proteína de soja alrededor de 20 y 27 mN/m

respectivamente (Carrera Sanchez y col, 2004). La Figura 3 ofrece una secuencia de las estructuras moleculares adoptadas por la película de una proteína a medida que aumenta la presión superficial.



**Figura 3:** Estructuras moleculares de la monocapa de una proteína en la interfase aire – agua con el incremento de la presión superficial.

Se ha sugerido que las proteínas de soja son agentes espumantes pobres, principalmente por la estructura compacta que resiste la adsorción y el desplegamiento en la interfase, previniendo una adecuada formación de la película (German y col., 1985).

La proteína de soja difunde a menor velocidad que otras proteínas, lo cual puede deberse al alto peso molecular de las partículas que migran, probablemente con la estructura cuaternaria intacta, que se desnaturalizaría al adsorberse en la interfase. La estructura cuaternaria de las globulinas de soja está estabilizada por uniones hidrofóbicas y es compacta, siendo la estructura plegada fácilmente destruible tras la disociación de las globulinas en subunidades (Tornberg, 1979).

Rodríguez Niño y col., (2005) han estudiado la dinámica de adsorción de las principales fracciones (7S y 11S) de la proteína de soja a la interfase aire-agua. Como regla general, pudo verse que la tasa de cambio de la presión superficial ( $\pi$ ) en función del tiempo de adsorción (segundos) aumenta cuando es mayor la concentración del biopolímero en la subfase. Esto significa que a mayores concentraciones de proteína, la actividad superficial de la misma también es mayor, lo cual concuerda con datos previos de la literatura (Damodaran, 1990, 1997; Halling, 1981). Además, la velocidad de adsorción ( $d\pi/dt$ ) de soluciones de proteína depende del tipo de proteína estudiada y del pH del medio. En algunos casos se encontró un período lag en la adsorción de las fracciones de la proteína de soja a concentraciones de 0,01% p/p, a pH 5. Esto no sucedió a mayores concentraciones en dicho pH. Este período lag es debido a que a pH 5 las fracciones, están cerca del punto isoeléctrico y por tal motivo, se encuentran agregadas. A mayores concentraciones (1%p/p) no se adsorbieron a causa de la baja solubilidad a pH 5. En cambio, a pH 7 el período lag desapareció, apareciendo sólo a muy bajas concentraciones (0,001%p/p) (Molina y col., 2003; Carrera y col., 2003). Esto concuerda con el hecho de que la flexibilidad y susceptibilidad a cambios conformacionales son menores para proteínas globulares (Miller y col., 2001).

Desde el punto de vista cinético, el desarrollo de la presión superficial por proteínas posterior al período lag, es causado por diferentes procesos (MacRitchie, 1989): (1) la proteína tiene que difundir desde la solución hacia la subfase por difusión y/o convección, (2) este paso es seguido por la penetración y reacomodamiento de la proteína a la interfase. Para todas las concentraciones de proteína de soja en solución, los datos experimentales ajustan satisfactoriamente a la ecuación de Ward y Tordai (1946). Así, se concluye que

durante el período inicial de la adsorción para globulinas de soja, éste estaría controlado por el mecanismo de difusión. Este período aumenta al disminuir la concentración proteica de subfase. A altas concentraciones, el paso de difusión es demasiado rápido como para ser detectado los métodos convencionales. Para monitorear la penetración y rearrreglo configuracional de las globulinas de soja, se ha utilizado una ecuación que promedia dos regiones lineales en la etapa subsiguiente de adsorción. La primera corresponde a la penetración de las globulinas a la interfase, mientras que la segunda pendiente corresponde al rearrreglo de las mismas en la interfase. Como regla general, los valores de la primer pendiente aumentan con la concentración, es decir, la penetración es facilitada a altas concentraciones de proteína en la subfase.

Con el fin de mejorar las propiedades interfaciales, diversos procesos han sido aplicados.

*Tratamientos físicos:* térmicos (Kato y col., 1983a, Sorgentini y col., 1995) encontrándose una mayor capacidad de formación de espuma y aumento de la estabilidad debido a un incremento en la hidrofobicidad; alta presión (Heinzelmann y col., 1994) la cual produce disociación y reformación de agregados proteicos e incrementa las regiones hidrofóbicas (Kajiyama y col., 1995); mecanólisis (Rawel y Muschiolik, 1994).

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



*Tratamientos reductores:* aumento de hidrofobicidad y viscosidad por cambios conformacionales (Chen y Morr, 1985; Kim y Kinsella, 1987a); adicionando tratamiento térmico (German y col., 1985); junto con sulfonación y tratamiento térmico (Petrucci y Añon, 1994b), mejorando la capacidad de formación y de estabilidad de espumas.

*Tratamientos enzimáticos:* diversas enzimas se han utilizado para la modificación de las propiedades funcionales por proteólisis enzimática. Horiuchi y col. (1978) y Bernardi y col. (1991) utilizaron enzimas fúngicas y bacterianas, obteniendo una mayor capacidad de espumado (CE) pero menor estabilidad (ED); Pusky (1975) y Shih y col. (1993) utilizaron enzimas fúngicas (*Aspergillus oryzae*) y obtuvieron mayor CE al aumentar el grado de hidrólisis; Kim y col. (1990) utilizando distintas proteasas bacterianas mejoraron también la solubilidad, la capacidad emulsionante y la agregación térmica. Las subunidades de la globulina 7S ( $\alpha$ ,  $\alpha'$  y  $\beta$ ) resultaron más susceptibles a la hidrólisis que las de la 11 S, lo cual se debería a una mayor superficie hidrofílica de la primera y a una estructura más compacta en la segunda; Hamada y col. (1989) obtuvieron mayor CE pero pocas variaciones en ED por deamidación de hidrolizados utilizando dos enzimas bacterianas.

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

Sin embargo, existen pocos trabajos sobre las modificaciones de las propiedades de espumado de las proteínas de soja por presencia de polisacáridos (Carp y col., 1999; 2001; 2004) y no existiendo trabajos en relación a su impacto en las propiedades de interfase.

## **5. Hidrólisis proteica**

En todo el mundo se produce una cantidad del orden de millones de toneladas al año de residuos agroindustriales ricos en proteína. Debido fundamentalmente a la mala calidad de

las proteínas tal como se presentan en dichos subproductos, este tipo de residuos no se utilizan o se utilizan deficientemente. Sin embargo, los mismos constituyen uno de los reservorios de proteína con mayor potencial de aplicación, tanto en la industria alimentaria, como en la fermentación –fuente de nitrógeno-, producción de piensos compuestos, etc. Por ello, el desarrollar procesos adecuados para extraer y mejorar la calidad de las proteínas, constituye una meta importante.

El desarrollo de un proceso encaminado a la utilización racional de este tipo de subproductos, para que pueda desarrollarse industrialmente de una manera competitiva y viable, debe ser un proceso económicamente rentable. Entre los factores que más claramente influyen sobre la viabilidad económica, caben destacarse dos: a) producción elevada y b) bajos costos de fabricación.

En los últimos años, el consumo creciente de proteínas vegetales ha dado lugar a la obtención de productos proteicos de gran calidad, tales como concentrados y aislados proteicos. Sin embargo, su uso se encuentra limitado a causa de la baja solubilidad y el carácter potencialmente alergénico de los mismos. Estas razones, unidas a la necesidad de desarrollar nuevos productos proteicos con características nutricionales y/o funcionales definidas, ha conducido al estudio de procesos de hidrólisis enzimática utilizando como sustrato fuentes proteicas alternativas (Tabla 8) (Mahmoud, 1992). En este sentido, la calidad proteica de la harina de girasol, colza, lupino, garbanzo, etc., los convierten en materiales adecuados para la obtención de hidrolizados proteicos.

Los métodos utilizados usualmente son químicos físicos y enzimáticos, siendo estos últimos los más usados en la industria alimenticia. Son utilizados preferentemente para producir hidrolizados con finalidades nutricionales, ya que el tratamiento térmico, bajo condiciones ácidas o básicas, puede producir la pérdida de L-aminoácidos, formación de D-aminoácidos así como de compuestos tóxicos tales como la lisino-alanina. En cambio, la hidrólisis enzimática, realizada en condiciones moderadas de pH y temperatura, (pH 5-9; temperatura entre 40 y 60°C), mantiene inalterada la calidad nutricional de los aminoácidos. Además, presenta otras ventajas importantes respecto a los métodos fisico-químicos, tales como la rapidez con que transcurren las reacciones y la alta especificidad de la enzimas, que aseguran e incrementan la eficacia del proceso (Millán y col, 1999).

<b>Propiedades físico-químicas</b>	<b>Propiedades</b>
Tamaño molecular	Alergenicidad
	Solubilidad
	Osmolaridad
	Viscosidad
	Gelificación
	Emulsificación
	Turbidez
	Flavor
Actividad superficial e hidrofobicidad	Capacidad espumante
Interacción con carbohidratos	Reacciones de Maillard
	Gelificación
	Flavor

### 5.1 Método enzimático

La hidrólisis enzimática es llevada a cabo por proteasas, las cuales hidrolizan enlaces peptídicos, dando lugar a una mezcla de péptidos y aminoácidos. Los efectos de la hidrólisis, se traducen en la reducción del tamaño molecular así como cambios en la estructura y en la polaridad de las proteínas. En relación a la polaridad, se incrementa el carácter hidrofílico por el aumento de la exposición de grupos carboxílicos y amino libres, y el carácter hidrófobo, por la exposición de restos de aminoácidos apolares.

La hidrólisis enzimática puede dar lugar a la exposición de regiones hidrófobas causantes de amargor, constituyendo una de las principales limitaciones en el uso de los hidrolizados proteicos. En este sentido la industria alimentaria ha empleado diversos métodos para la eliminación del amargor en los hidrolizados proteicos tales como la utilización de absorbentes hidrofóbicos, mezclas de extracción y la combinación secuencial de endo y exoproteasas.

Uno de los factores que determinan la producción comercial de hidrolizados proteicos es la elección apropiada de enzimas para producir compuestos con características fisicoquímicas y nutricionales definidas (*taylor made hydrolysates*) según la aplicación que se vaya a

hacer del producto final. Atendiendo al tipo de acción catalítica, las proteasas pueden ser clasificadas en endopeptidasas y exopeptidasas. La endopeptidasas se caracterizan por romper ciertos tipos de enlaces peptídicos en cualquier lugar de la cadena en que se hallen situados, a diferencia de las exopeptidasas, que sólo pueden escindir enlaces peptídicos terminales.

Las proteasas también se clasifican de acuerdo a:

Origen: animal, vegetal, microbiano;

Naturaleza del sitio activo: entre la endopeptidasas más utilizadas se encuentran:

-Serina-proteasas :(alcalinas) –OH en el sitio activo.

-Cisteína-proteasas: (neutras) –SH en el sitio activo.

-Metallo-proteasas: (neutras)  $Zn^{+2}$  (u otro metal).

-Aspártico-proteasas: (ácidas) –COOH del aspártico en el centro activo.

El uso de cada una está determinado por el pH de la reacción de hidrólisis.

Las variables importantes a tener en cuenta durante la reacción de hidrólisis son:

La temperatura óptima que depende de un balance entre el aumento de la actividad enzimática y la desnaturalización de la enzima.

La relación enzima/sustrato (E/S).

El pH que depende de la enzima y del método.

El tiempo de hidrólisis.

La hidrólisis se puede realizar en sistemas discontinuos o en batch con enzimas solubles, o continuos con enzimas inmovilizadas. En los últimos años la obtención de hidrolizados en sistemas discontinuos está siendo sustituido por el uso de enzimas inmovilizadas, debido a las siguientes ventajas: se aumenta la calidad del producto al mejorarse el control de la reacción; la enzima se puede reusar; no es necesaria la inactivación de la enzima por calentamiento o acidificación; el producto final está libre de enzima; se incrementa el rendimiento del proceso al aumentar la estabilidad de la enzima.

La elección de la enzima es fundamental por la especificidad del hidrolizado según el producto que se quiera obtener. Entre las más utilizadas se encuentran la Alcalasa (*Bacillus licheniformis*) y Flavourzyme (*Aspergillus oryzae*), pudiendo usarse por separado o en tratamientos secuenciales.

El proceso se detiene inactivando la enzima mediante ajuste de temperatura de pH o de ambos a la vez. La inactivación ácida no suele utilizarse a nivel industrial, ya que se necesitan grandes cantidades de base para la neutralización del hidrolizado, formándose una gran cantidad de sales, la cuales deberían ser eliminadas posteriormente. El tratamiento térmico constituye el método de inactivación enzimática irreversible más usado a escala industrial. No obstante, éste debe llevarse a cabo con precaución, ya que el exceso de calentamiento puede conducir a destrucción de compuestos nutricionales, provocar reacciones no deseadas, tales como las de Maillard o incluso dar lugar a la formación de compuestos tóxicos que estarían en el hidrolizado final. La filtración mediante tierra de diatomeas o la utilización de membranas de ultrafiltración constituyen otros métodos alternativos para eliminar la actividad enzimática (Lahl y Braun, 1994).

### *5.2 Caracterización del hidrolizado*

El grado de hidrólisis (GH) se define como:

$$GH = h / h_t \cdot 100$$

Donde h es el nº de uniones clivadas/ g de proteína y  $h_t$  es el nº de uniones totales/ g proteína.

Para la evaluación del GH hay diferentes métodos que difieren en complejidad y precisión y su fundamento se indica en la Tabla 9.

Método	Fundamento
OPA	Reacción entre grupos aminos y o-phthaldehído (OPA) en presencia de $\beta$ -mercaptoetanol formando una sustancia coloreada que se mide a 340 nm en un espectrofotómetro
pH-stat	Ocurre a pH constante, no neutro (entre 5 y 6), se titulan los grupos aminos y carboxilos liberados con un ácido o una base y la cantidad de enlaces escindidos son equivalentes a la cantidad de ácido o base usado.
Osmometría	Mide el punto de congelamiento, durante intervalos de tiempo durante la hidrólisis, construyéndose una curva con la depresión del punto.
Solubilidad en ácido tricloacético (TCA)	Se monitorea la hidrólisis analizando la cantidad de nitrógeno soluble en TCA. La técnica requiere el uso de actividad endopeptidasa de la enzima.
Determinación con ác. trinitrobenceno sulfónico (TNBS)	Reacción de grupos aminos primarios con TNBS, obteniéndose un producto medible espectrofotométricamente.

Tabla 9: Métodos principales utilizados en la determinación del grado de hidrólisis (GH) y el fundamento físico-químico implicado.

El material de partida puede ser de origen animal, vegetal o bacteriano. Las proteínas que más se hidrolizan son: caseína (importante fuente proteica de alto valor nutricional para niños), lactosuero, soja (combinado con otros hidrolizados o con proteína no hidrolizada, en fórmulas para adultos), girasol, guisante, garbanzo, lupino.

### 5.3 Propiedades del hidrolizado

El nivel de hidrólisis depende del objetivo buscado, se distinguen tres grandes grupos:

GH menor al 10% o hidrólisis limitada

GH al rededor del 10%

GH mayor al 10% o hidrólisis extensiva.

Cada grupo se caracteriza por alcanzar propiedades definidas para distintos usos. La Tabla 10 resume dichas características (Villanueva y col., 1999 a; Villanueva y col., 1999 b).

<b>GH</b>	<b>Utilidad</b>	<b>Características</b>
Menor al 10%	Mejora propiedades funcionales	Aumenta la solubilidad el poder espumante y emulsificante y la absorción de aceite Disminuye la absorción de agua y la viscosidad
10%	Aporta propiedades flavorizantes	Aumenta el sabor y aroma
Mayor al 10%	Para uso en alimentación especializada	Uso en suplementos proteicos o dietas médicas Uso en tratamiento de enfermedades o síndromes específicos.

Tabla 10: Hidrolizados de distinto nivel y sus propiedades.

Una hidrólisis en forma limitada (menor al 10%) mejora las propiedades funcionales de las proteínas originales permitiendo el uso de estos hidrolizados proteicos en numerosos alimentos que requieren un alta absorción de agua o de aceite o buen poder espumante o emulsificante como por ej. en postres, pan, helados, pasteles, mayonesas, salchichas derivados cárnicos y productos con bajo contenido en grasas.

El aumento de la solubilidad en condiciones ácidas es una gran ventaja, dado al pH de los alimentos, permaneciendo los péptidos en solución incluso después de tratamientos térmicos como la pasteurización.

La menor absorción de agua se atribuye a que la proteína entera actúa como una red que tendría la capacidad de absorber el agua (sin solubilizarse) y al estar hidrolizada, no se forma el mismo tipo de red, disminuyendo la capacidad de retenerla.

El aumento de absorción de aceite se atribuye a la mayor exposición de residuos hidrofóbicos, los cuales estaban ocultos antes de hidrolizar.

La menor viscosidad producto del menor tamaño molecular, permite el enriquecimiento de bebidas y zumos, con altas concentraciones de hidrolizados.

Un grado de hidrólisis del 10% aproximadamente aporta propiedades flavorizantes aportando sabor y aromas. El flavor depende de la cantidad y tipo de péptidos o aminoácidos libres como el ácido glutámico, el cual potencia el sabor; glicina y alanina los cuales endulzan; como así también se producen péptidos amargos por aminoácidos hidrofóbicos, generando cierta restricción en el uso de los hidrolizados de la proteína de soja en alimentos (Adler-Nissen, 1986). El amargor crece conforme aumenta el grado de hidrólisis. Estudios estructurales revelan que los péptidos amargos fueron caracterizados como leucina N o C (principalmente) terminal.

En hidrólisis extensivas (más del 10%) se busca un objetivo nutricional y terapéutico, pero, los péptidos obtenidos tienen menor funcionalidad.

Se distinguen dos grupos de hidrolizados extensivos de acuerdo a su uso:

1) Suplementos proteicos para dietas médicas:

Permiten su uso en alimentos líquidos por el aumento de la solubilidad y la reducción de la osmolaridad, pero no tanto como los aminoácidos libres. Usos en la tercera edad ya que hay pérdida de apetito lo cual genera mal nutrición y al no poder incrementar la ingesta por esta causa, se deben ingerir alimentos líquidos con mayor poder nutritivo.

2) Tratamientos de enfermedades o síndromes específicos:

Producción de alimentos hipoalergénicos a causa del aumento de personas con problemas de alergia alimentaria. Las consecuencias de las alergias pueden ir desde pequeños trastornos hasta la muerte por shock anafiláctico. En los hidrolizados hipoalergénicos la hidrólisis extensiva produce la rotura de epítotes antigénicos de las proteínas responsables de la alergia alimentaria (Vioque, y col., 1999). Existe incluso la posibilidad de producir hidrolizados “hechos a medida” usando enzimas específicas producidas a través de ingeniería genética que potencian y afinan la especificidad combinado a métodos de separación del hidrolizado final por ultrafiltración. Las aplicaciones de esta técnica se muestran en la Tabla 11.

<b>Hidrolizado</b>	<b>Aplicaciones</b>
Sin fenilalanina	Tratamiento de la Fenilcetonuria
Sin tirosina	Tratamiento de la Tirosinamia
Ricos en aa azufrados	Estados hipermetabólicos (quemados, operados)
Ricos en péptidos inhibidores de ACE	Presión arterial alta
Ricos en péptidos estimulantes de fagocitosis	Infecciones
Ricos en aa ramificados y pobres en aromáticos	Encefalopatías

Tabla 11: Principales aplicaciones de hidrolizados “hechos a medida”



## 6. Interacciones proteína-polisacárido

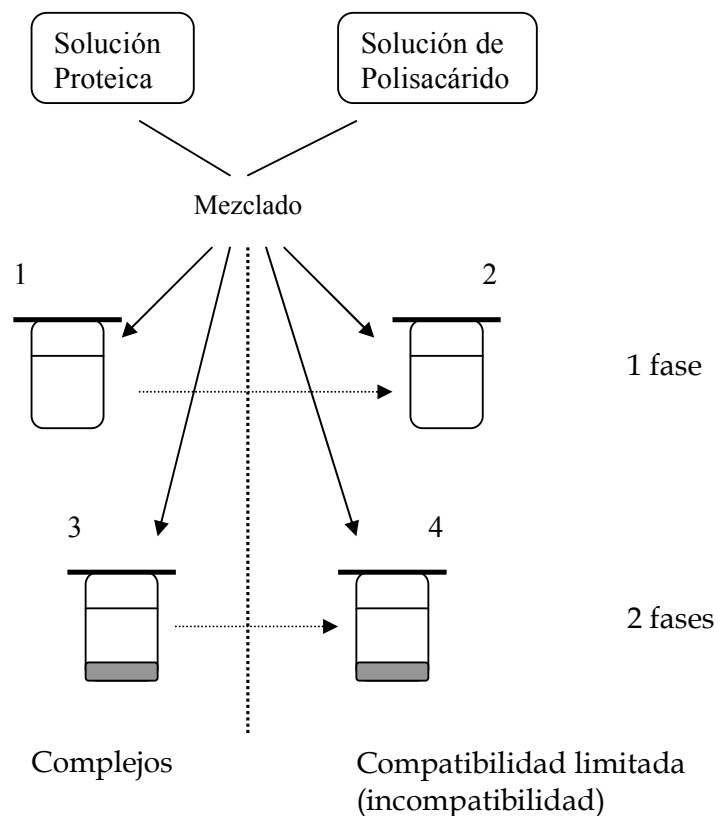
Proteínas y polisacáridos (hidrocoloides) contribuyen a propiedades estructurales y texturales en los alimentos a través de sus propiedades de agregación y gelificación. Las proteínas tienen propiedades de espumado y emulsificación y los polisacáridos poseen capacidad de absorción de agua y aportan viscosidad. La Tabla 12 muestra una simplificación de semejanzas y diferencias entre los biopolímeros. La funcionalidad de las biomoléculas en forma individual en alimentos es también afectada por la interacción con otros componentes: proteínas, polisacáridos, lípidos, azúcares y el medio (pH, fuerza iónica, iones específicos).

Semejanzas	Proteínas	Polisacáridos
Polímeros naturales		
Ampliamente usados en alimentos		
Usos en farmacia;cosméticos y productos personales		
Estructura compleja		
Compatibles		
Comportamiento de agregación complejo		
Agentes estabilizantes y gelificantes		
Diferencias		
	Amplio rango estructural	Estructuras similares
	Reactivos	No reactivos
	Monodispersos	Polidispersos
	Muchos tipos de segmentos	Pocos tipos de segmentos
	Cadenas lineales	Cadenas lineales con ramificaciones
	Cadenas flexibles	Cadenas rígidas
	Peso molecular medio	Peso molecular alto
	Pequeño volumen molecular	Gran volumen molecular
	Amfifílicos	Hidrofílicos
	Tensioactivos	No tensioactivos
	Poliectrolito	No iónico o cargado -
	Agente espumante/emulsificante	Agente viscosante/absorbente de agua
	Termosensible	No termosensible
	Fuerte unión a surfactantes	Débil unión a surfactantes

Tabla 12: Semejanzas y diferencias principales entre proteínas y polisacáridos

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

La mezcla de proteínas y polisacáridos puede originar una fase estable o fases paradas, dando cuatro tipos de sistemas que difieren en sus estructuras y propiedades (Figura 4): 1) una sola fase conteniendo complejos solubles (estabilizadas por interacciones electrostáticas y uniones hidrógeno); 2) una sola fase conteniendo los diferentes biopolímeros en dominios en los cuales ambos polímeros se excluyen mutuamente debido a una limitada incompatibilidad termodinámica; 3) formación de un complejo electrostático insoluble y una fase soluble (coacervación); 4) un sistema de dos fases en que ambos biopolímeros están principalmente en fases diferentes (emulsión agua – agua) debido a una incompatibilidad termodinámica (Samant y col., 1993; Ledward, 1994).



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

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

### 6.1 Formación de complejos electrostáticos

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

La formación de complejos electrostáticos es usualmente un proceso reversible que depende del pH y la fuerza iónica del medio, entre otros factores (Tabla 13) y está favorecida cuando los componentes presentan cargas opuestas. Ambos biopolímeros presentan un comportamiento electrostático dependiente del pH del medio: carga (–) si  $\text{pH} > \text{pI}$  (pH al cual el biopolímero tiene carga neutra); carga (+) si  $\text{pH} < \text{pI}$ , siendo en general  $\text{pI}_{\text{polisacárido}} < \text{pI}_{\text{proteína}}$ . A pH neutro pueden ocurrir interacciones electrostáticas entre polisacáridos aniónicos y regiones cargadas positivamente de proteínas oligoméricas (Tolstoguzov, 1997).

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

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

**Tabla 13:** Factores que influyen en la formación de complejos proteína – polisacárido

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

Algunas aplicaciones industriales de complejos proteína – polisacárido son la purificación de macromoléculas (ej. proteínas); microencapsulación en biotecnología, cosméticos, farmacia y medicina; ingredientes alimenticios: sustitutos de grasas, aceites, crema, análogos de carne, biomateriales: formación de películas comestibles, empaquetamiento, injertos y bioprótesis en medicina (Schmitt y col., 1998). En alimentos se aplican en la estabilización de productos lácteos procesados, inhibición de la precipitación de proteínas (en bebidas lácteas saborizadas), recuperación de proteínas (de plasma y lácteas), estabilización de calcio en proteínas vegetales sensibles al calcio, formación de geles, concentración y purificación de proteínas, texturización de proteínas, extrusión termoplástico (Samant y col., 1993).

## 6.2 Incompatibilidad termodinámica

Este fenómeno se observa en condiciones en las cuales la formación de complejos está inhibida y se promueve la asociación entre macromoléculas del mismo tipo. La Figura 5

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

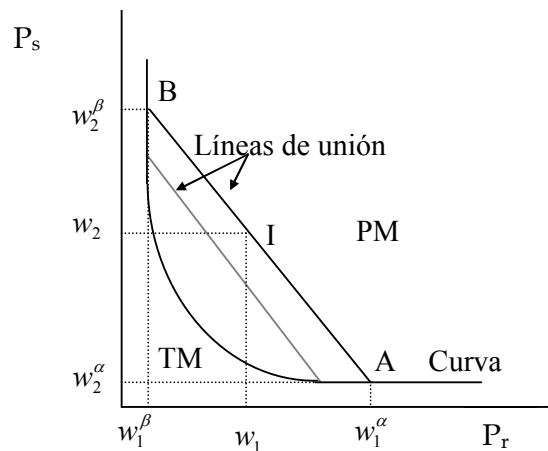


Figura 5: Composición de fases en un sistema termodinámicamente incompatible agua + proteína + polisacárido.

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

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

incompatibilidad entre los biopolímeros incrementa la actividad termodinámica, es decir la concentración efectiva y el potencial conformacional de ambos. El potencial conformacional puede definirse como la habilidad de una proteína para formar uniones intermoleculares que contribuyen a potenciar propiedades físico – químicas, reológicas y estructurales (por ej. la formación de geles, estabilización de espumas y emulsiones) (Tolstoguzov, 1993b).

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

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

La incompatibilidad de los biopolímeros depende de la intensidad de las interacciones entre ellos, entre las moléculas de cada uno consigo mismas y con el solvente (diferencias en la hidrofiliidad de los biopolímeros). A una concentración total de biopolímero moderada, la separación del sistema en dos fases depende de la carga del biopolímero, del pH y la fuerza iónica, siendo el factor entrópico determinante en la posibilidad de dicha separación (Alves y col., 1999). Otros factores también influyen sobre la incompatibilidad, la cual puede aumentar por: i) el aumento del peso molecular y la rigidez estructural de los biopolímeros; ii) la desnaturalización de proteínas globulares debido al incremento de la hidrofobicidad y al tamaño de las cadenas polipeptídicas agregadas; iii) aumento de la concentración de sales y de la temperatura (Tolstoguzov, 1997). Los polisacáridos con

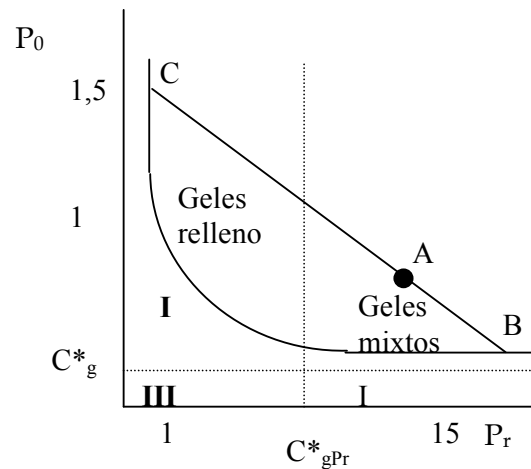
estructura lineal presentan mayor incompatibilidad que los de estructura ramificada, y disminuye la incompatibilidad en el orden polisacáridos con grupos carboxilo > neutros > sulfato (Grinberg y col., 1997). La compatibilidad termodinámica también varía por la presencia de otros componentes como moléculas lipofílicas y de sacarosa, los cuales presentan en general un efecto negativo y positivo respectivamente (Semenova, 1996).

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

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

### *6.3 Impacto de la incompatibilidad entre proteínas y polisacáridos en geles, espumas e interfases.*

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



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

En las interacciones entre  $\beta$ -lactoglobulina y polisacáridos (X,  $\lambda$ C,  $\kappa$ C, G y PGA) en sistemas gelificados se observó que a pH 7 y en menor medida a pH 6 por debajo de la curva binodal, 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 (Baeza, 2003). Además podrían existir fenómenos de complejamiento durante el calentamiento a  $pH > pI$  en presencia de PGA.

A pH neutro los polisacáridos aumentan la estabilidad térmica de la  $\beta$ -lg lo cual se manifiesta por un aumento en la temperatura de inicio de desnaturalización, un aumento del cambio de entalpía y en el caso de sistemas deshidratados en un aumento de la temperatura de pico de desnaturalización (Baeza y col., 2002).

Los polisacáridos promueven la agregación de la  $\beta$ -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  $\beta$ -g, se traduce en la posibilidad de formación de geles de  $\beta$ -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 gelificación de  $\beta$ -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  $\lambda$ C y X 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 X presentaron 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  $\lambda$ C también presentaron una estructura particulada pero son más viscoelásticos y duros que los de X, exhibiendo la mayor pérdida de agua.

Los geles con PGA tuvieron características muy distintas 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.

Las diferencias entre los diferentes sistemas mixtos en la dinámica de gelificación es menor que a pH 6 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  $\beta$ -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/ $\beta$ -lg. Se obtuvieron geles de buenas propiedades viscoelásticas, dureza y retención de agua, ya sea a baja 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/ $\beta$ -lg los geles fueron más débiles y tuvieron mayor pérdida de agua, presentando la característica de ser esparcibles.

Las mezclas de proteína de suero lácteo (WPC) con hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC del tipo E4M) a pH neutro son sistemas termodinámicamente incompatibles a temperatura

ambiente, por lo cual tienden a separarse fácilmente en dos fases (Pérez y col., 2006). Al ser sometidas estas mezclas a un calentamiento tienen lugar una serie de complejos fenómenos, algunos de los cuales pueden ocurrir simultáneamente: a) deshidratación de las moléculas de HPMC y consiguiente exposición de grupos hidrofóbicos susceptibles de agregarse entre sí. Este fenómeno se refleja como una disminución del módulo elástico  $G'$  al comienzo del calentamiento de las mezclas; b) agregación/gelificación de E4M; c) agregación/desnaturalización de WPC; d) separación de fases.

La dinámica de gelificación térmica así como la macroestructura de los sistemas luego del enfriamiento señalan que existen dos fenómenos competitivos: la separación de fases y la gelificación.

Justamente, debido a la competencia entre velocidad de gelificación y de separación de fases, es que se logra obtener geles con una macroestructura muy interesante, cual son los de tipo “core-shell”, a concentraciones de proteína mayores o iguales al 12% y concentración variable de E4M (1 - 4%). Este tipo de estructura puede encontrar aplicación como sistema de microencapsulamiento o de liberación controlada, en los cuales algún componente activo se particiona entre las fases separadas y puede concentrarse en la fase HPMC, o bien para desarrollar nuevas estructuras y alimentos.

Otro de los beneficios de la incompatibilidad entre los componentes es la aparición de sinergismo en algunas propiedades. Así, el desarrollo del carácter sólido de las mezclas presenta sinergismo cuando la concentración de WPC es mayor a 8% y cuando la relación WPC/E4M es mayor a 4. Esto indica que con pequeños agregados de HPMC se puede lograr un efecto sinérgico muy importante y controlar propiedades del sistema como el punto gel, características elásticas y propiedades físicas.

Desde un punto de vista más básico es interesante destacar que es necesario caracterizar estos sistemas con un conjunto de técnicas a fin de comprender su complejo comportamiento. De hecho las técnicas calorimétricas reflejaron la separación de fases mientras que la reología dinámica no parece distinguir sistemas con separación de fases de aquellos sin separación, reflejando principalmente los efectos de concentración de cada componente y la relación entre los mismos. Por último la macroestructura aporta la información visual para caracterizar a estos sistemas como geles con separación de fases macroscópica.

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

Carp (Tesis Doctoral, 2001) estudió las propiedades de espuma de proteína de soja nativa y desnaturalizada en presencia de goma X y  $\kappa$ C.

Más allá de su efecto espesante que conduce a una mayor estabilidad, la goma X modificó sustancialmente el grado de agregación de las fracciones proteicas que conforman el aislado proteico de soja tanto en solución como en la interfase aire-agua, debido a una limitada incompatibilidad termodinámica entre la proteína y el polisacárido a pH neutro. Además de este efecto, la goma X participaría en la interfase por interacción electrostática con la proteína adsorbida, dominando la reología de la misma. Estas interacciones específicas contribuyen ulteriormente a la estabilización de las espumas.

En presencia de goma X, las especies proteicas que estabilizan la película interfacial de la proteína desnaturalizada, presentaron menor grado de agregación que los que estabilizan la película de la proteína nativa cumpliendo un rol importante el polipéptido básico e hidrofóbico B de la glicinina (Carp y col., 1999). Estas diferencias promovidas por la goma X determinan entre otras cosas que las espumas de proteína desnaturalizada colapsen mucho más rápidamente que las de proteína nativa.

Los efectos contrapuestos de la desnaturalización en los diferentes mecanismos de desestabilización de espumas formuladas con goma X, señalan la necesidad de evaluar en que caso es conveniente la desnaturalización, de acuerdo a la concentración de proteína y polisacárido utilizada en la formulación del producto final y a los requerimientos de estabilidad de la espuma.

La interacción entre la proteína de soja y el  $\kappa$ C mostró a través de la tensión y viscosidad superficial que dicho polisacárido no participa de la interfase (Carp y col., 2004), aunque no se puede excluir la formación de complejos electrostáticos débiles con la proteína. El efecto de estabilización del  $\kappa$ C está vinculado principalmente con la posibilidad de gelificar en las lamelas. Pueden observarse diferentes situaciones: si se almacenan las espumas a temperaturas mayores a la temperatura de gelificación del  $\kappa$ C ( $T_{gel}$ ), la pregelificación no provee una mayor estabilidad adicional; si se almacenan a temperaturas mayores que  $T_{fusión}$  del  $\kappa$ C, las espumas se desestabilizan rápidamente, las gelificadas porque funden y las no gelificadas por un mayor drenaje a altas temperaturas. Se observó que las espumas pregelificadas drenaron más rápido, que las no pregelificadas, lo cual podría deberse a una disminución de la movilidad de la proteína en la interfase, impidiéndole reacomodarse y estabilizar la película a medida que drena. La estabilidad de las espumas pregelificadas entre  $T_{gel} < T < T_{fusión}$ , es mucho mayor que la de las no pregelificadas, pues las primeras no funden y las segundas no gelifican. En este rango de temperaturas se observa la influencia del fenómeno de histéresis.

Por lo tanto, la pregelificación a  $5^{\circ}C$ , representa un beneficio ya que permite aumentar enormemente la estabilidad de las espumas, que de otra forma se desestabilizarían rápidamente.

El cambio estructural debido a la desnaturalización térmica de la proteína de soja tiene especial influencia cuando el  $\kappa$ C gelifica, induciendo un mayor efecto sinérgico el cual se traduce en una mayor velocidad de formación del gel, una mayor histéresis y una mayor estabilidad de las espumas. Esta histéresis se puede explotar para definir condiciones que permitan optimizar la estabilidad de las espumas (Carp, Tesis Doctoral, 2001).

En los últimos años se han realizado una serie de trabajos concernientes al impacto de la incompatibilidad termodinámica entre proteínas y polisacáridos en las propiedades interfaciales (Baeza, Tesis Doctoral, 2003; Pérez, Tesis Doctoral, 2005).

En condiciones en las que la  $\beta$ -lg satura la interfase y en la presencia de polisacáridos ( $\lambda$ C, X y PGA) se encontró que la interfase aire-agua está dominada principalmente por la  $\beta$ -lg. Tanto a través del estudio de las monocapas esparcidas como adsorbidas se concluyó que ya sea los polisacáridos que poseen actividad interfacial (PGA) como los que no la poseen (X y  $\lambda$ C) participan a través de diferentes mecanismos modificando tanto la presión

superficial como las propiedades reológicas de las interfases (Baeza y col., 2004). El comportamiento del  $\lambda C$  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 es más compleja.

Al estudiar el efecto de los polisacáridos en monocapas esparcidas de  $\beta$ -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 éster fue el que mostró una mayor actividad superficial entre los PGA dado que produjo el mayor aumento de la presión superficial “obligando” a la  $\beta$ -lg a adoptar rápidamente la estructura 2 y produciendo la mayor reducción en el módulo dilatacional elástico (Baeza y col., 2004).

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 éster es el PGA que más participa en la interfase, ya que presentó una adsorción más competitiva con la  $\beta$ -lg (Baeza y col., 2005a).

La comparación de los resultados dinámicos con los obtenidos en monocapas esparcidas debería realizarse a largos tiempos de adsorción (de equilibrio), en donde la monocapa proteica se encontraría ya formada y estructurada. Esta situación es reflejada por los valores finales de la elasticidad dilatacional superficial dinámica en donde se observó una disminución del módulo elástico de las películas en presencia de los PGA, lo cual tuvo concordancia con los resultados obtenidos en monocapas esparcidas.

La mayor habilidad del Manucol frente a los otros PGA para penetrar en la interfase en presencia de  $\beta$ -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 por un fenómeno de volúmenes de exclusión.

En el otro extremo el PGA 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  $\beta$ -lg en forma similar a la X que no posee actividad interfacial. El

grado de incompatibilidad del K-LVF con la  $\beta$ -Ig sería mayor debido a su mayor carga negativa por el bajo grado de esterificación.

Con respecto a la goma X, 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 las cercanías de la interfase que se manifiestan en aumentos de la presión superficial y del carácter viscoelástico y elasticidad de las monocapas de proteína.

Por contribuir además con una alta viscosidad a la fase continua, las espumas de  $\beta$ -Ig 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 polisacárido y de la proteína.

En estudios de interfases mixtas HPMC + WPC los resultados de los ensayos dinámicos como los correspondientes a condiciones de equilibrio (isotermas  $\pi$  vs concentración y monocapas esparcidas) indican que WPC y HPMC compiten por la interfase (Pérez y col., 2007). Sin embargo, se observan diferentes comportamientos dependiendo de las concentraciones relativas de ambos componentes en el sistema. En condiciones de altas concentraciones de WPC en la subfase (1%), donde esta puede saturar la interfase, o de bajas concentraciones de HPMC, WPC domina la presión superficial final de equilibrio, aún cuando a cortos tiempos de adsorción predomina HPMC.

Análogamente, la elasticidad dilatacional de las películas mixtas a cortos tiempos de adsorción presenta características similares a las de HPMC y cerca del equilibrio se asemeja a la de WPC. Los estudios de monocapas esparcidas indican que la elasticidad de las monocapas mixtas y también su elasticidad dilatacional se asemejan a la de la monocapa de WPC a presiones menores que la de colapso de la proteína.

En las mezclas con menor concentración de WPC ( $10^{-2}\%$ ), de acuerdo a la concentración de HPMC presente en la subfase se puede observar un predominio de WPC en la presión superficial. En particular, en condiciones donde ninguno de los dos componentes por sí

mismo satura la interfase (por ejemplo, WPC=10<sup>-2</sup>% y HPMC=10<sup>-4</sup>%) no se observa un comportamiento competitivo, si no más bien aditivo o sinérgico, indicando que ambos componentes coexisten en la interfase contribuyendo en forma cooperativa al aumento de la presión superficial. En este caso, sin embargo, la elasticidad dilatacional de las películas mixtas muestra valores menores que los componentes puros señalando que en condiciones de no saturación, la presencia de HPMC interfiere en la agregación interfacial de WPC necesaria para estructurar la interfase.

Con respecto a las diferencias en el efecto mostrado por las distintas HPMC estudiadas se puede concluir que las mayores diferencias se observan a nivel de la presión superficial. En los ensayos en monocapas esparcidas, el agregado de E4M mostró aumentar la presión superficial de la monocapa para todas las áreas moleculares, indicando una mayor actividad superficial de esta celulosa, la cual puede además contribuir a un ulterior aumento de  $\pi$  debido a fenómenos de incompatibilidad acrecentados por su mayor peso molecular en comparación con las otras HPMC.

Es evidente que no se puede predecir en forma simple el efecto de la HPMC en las propiedades interfaciales de WPC debido a la coexistencia de diferentes fenómenos: a) Incompatibilidad entre biopolímeros tanto a nivel de la subfase como de la interfase; b) Fenómenos competitivos o cooperativos que predominan de acuerdo a la concentración de cada componente en la subfase.

En un trabajo reciente (Martínez y col., 2005) se estudió el efecto de una hidrólisis limitada de la proteína de girasol en la interacción con polisacáridos en espumas. Se utilizaron los polisacáridos (PS) goma xántica (X), carragenanos lambda y kappa ( $\lambda$ C,  $\kappa$ C), goma guar (G), y garrofin (GG).

El objetivo fue estudiar la interacción de los PS con hidrolizados con GH=1,5 y 9,8% a pH neutro donde existe una limitada incompatibilidad termodinámica entre macromoléculas. Las espumas fueron evaluadas mediante el método de batido. Se evaluó la capacidad de espumado (CE), la velocidad de drenado de líquido y el colapso de las espumas.

Una hidrólisis limitada mejoró sustancialmente las propiedades de espumado de la proteína 1,5% de girasol. Un bajo GH mejoró la CE y la estabilidad de las espumas. Sin embargo, un incremento del GH a 9,8% no mejoró las propiedades de espumado.

La CE se redujo en presencia de todos los PS pero la performance de los PS como estabilizantes de espumas, dependió del grado de hidrólisis, de la estructura del PS y concentración de ambos.

X a 0,25% y 0,5%, debido a su alta viscosidad, estabilizó tanto a la proteína intacta como a los hidrolizados. Los otros PS a 0,25% de concentración estabilizaron cuando fueron agregados a las espumas de SP pero desestabilizaron las espumas preparadas con los hidrolizados. Al aumentar la concentración del PS el efecto negativo fue revertido parcialmente. Los resultados pueden ser interpretados en términos de la viscosidad del seno de la solución y de las propiedades reológicas superficiales de las espumas con proteína/PS y sugiere que las interacciones proteína-PS son fuertemente afectadas por la hidrólisis de la proteína.

Estos resultados demuestran que las propiedades de espumado de mezclas de proteínas y polisacáridos están determinados por diferentes factores, los cuales derivan de una complicada interacción entre las propiedades interfaciales de las películas como de propiedades de la fase continua.

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

## **7. Polisacáridos en alimentos**

### **7.1 Goma xántica (X)**

El xantano es un heteropolisacárido extracelular de alto PM:~2,5 .10<sup>6</sup> Da producido como metabolito secundario durante la biosíntesis microbiana, cuya función es proteger al



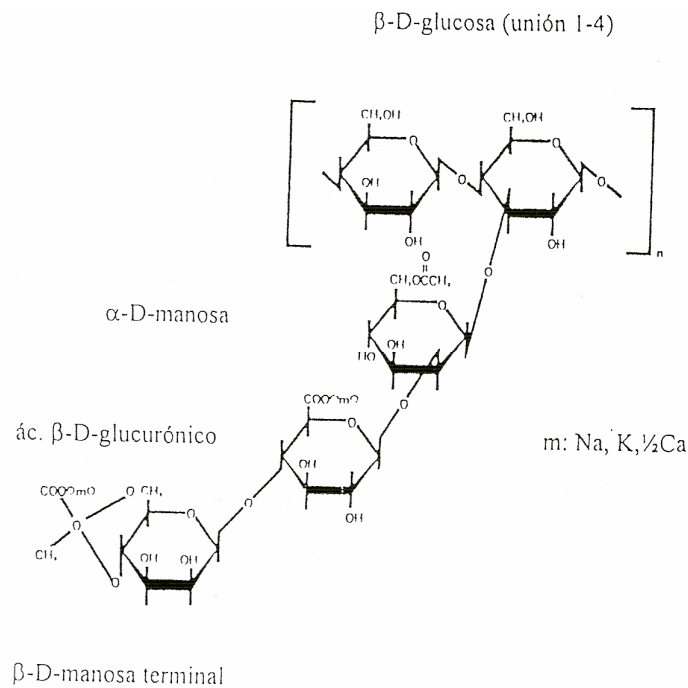
microorganismo manteniendo una mínima humedad y dar adherencia a un soporte. Su producción se realiza por fermentación en condiciones aeróbicas de diversas especies de *Xanthomonas*, siendo *X. Campestris* el microorganismo utilizado comercialmente para su síntesis (Urlacher y Dalbe, 1992). No presenta valor nutricional para los mamíferos (Staub y Ali, 1983).

La estructura del polisacárido está formada por una cadena de celulosa (1,4- $\beta$ -D-glucosa) con cadenas laterales formadas por un trisacárido de  $\alpha$ -D manosa, ácido  $\beta$ -D glucurónico y  $\beta$ -D manosa (Figura 7). El trisacárido está unido en posición 3 de la glucosa y ocurre en residuos de glucosa alternados, formándose una estructura repetitiva y regular del pentasacárido. La mitad de las manosas terminales contienen un residuo de ácido pirúvico unido en la posición 4 y 6 formando una unión quelato. La D-manosa unida a la cadena principal contiene un grupo acetilo en la posición 6. La distribución de grupos acetilo y pirúvico es irregular, dependiendo de la cepa y las condiciones de fermentación. La conformación molecular, determinada por estudios de difracción de rayos-X de fibras de xantano, fue interpretada como una hélice estabilizada posiblemente por uniones de puente hidrógeno, y las macromoléculas en solución podrían ser consideradas como hélices rígidas que pueden sufrir una transición conformacional hacia un estado más flexible y desordenado a altas temperaturas. La temperatura de transición conformacional depende de la concentración de polímero y se puede determinar por distintas técnicas analíticas: rotación óptica, calorimetría, dicroísmo circular y viscosimetría (Urlacher y Dalbe, 1992); la presencia de sales provoca un aumento de dicha temperatura.

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

Las soluciones de goma xántica son estables en un amplio rango de pH: sólo pH extremos <2,5 ó >11, afectan las propiedades de las soluciones. El incremento de la temperatura de 10 a 90°C, en presencia de sales, afecta levemente la viscosidad de las soluciones. Las

soluciones también son resistentes a la degradación enzimática, a ciclos de congelado - descongelado y a tiempos de mezclado prolongados, debido al carácter compacto de las dobles hélices que protegen el desdoblamiento de las cadenas (Urlacher y Dalbe, 1992). El xantano presenta estabilidad y compatibilidad a altas concentraciones de sales, pero es incompatible con cationes multivalentes presentando cierto carácter aniónico y siendo compatible con surfactantes y preservativos no-iónicos o aniónicos e insoluble en muchos solventes orgánicos.



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

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

de almidón más estables durante el almacenamiento a temperatura ambiente, a bajos pH y a ciclos de congelado-descongelado (Urlacher y Dalbe, 1992).

Las interacciones de goma xántica con distintas proteínas comenzaron a estudiarse en los últimos años, encontrándose tanto formación de complejos electrostáticos como condiciones de incompatibilidad termodinámica. Se han realizado trabajos con proteínas lácteas, prevaleciendo las interacciones hidrofóbicas; ovoalbúmina, caseína (Schmitt y col., 1998), proteínas de suero (Syrbe y col., 1995; Sanchez y col., 1997; Bryant y col., 2000), aislado de soja (Sánchez y col., 1995; Xie y col., 1997 y 1998 ; Carp y col, 1999 y 2001),  $\beta$ -lactoglobulina (Zasytkin y col., 1996; Baeza y col, 2004 y 2005 a,b).

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

## 7.2 Carragenano $\kappa$ ( $\kappa C$ ) y Carragenano $\lambda$ ( $\lambda C$ )

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

Los carragenanos son una compleja mezcla de al menos cinco polímeros diferentes, designados kappa ( $\kappa$ ), lambda ( $\lambda$ ), mu ( $\mu$ ), iota ( $\iota$ ) y nu ( $\nu$ ). Estos hidrocoloides son polisacáridos lineales de alto PM constituidos por unidades de galactosa y/o 3,6-anhidrogalactosa (3,6-AG), ambos sulfatados (lo cual les confiere carácter aniónico) o no

sulfatados, unidos por uniones glicosídicas  $\alpha$ -(1,3) y  $\beta$ -(1,4) (Figura 8). Las distintas fracciones difieren en el contenido de éster sulfato ( $\kappa$ : 25%;  $\iota$ : 32% y  $\lambda$ : 35%) y de 3,6-anhidrogalactosa ( $\kappa$ : 34%;  $\iota$ : 30% y  $\lambda$ : bajo o nulo%). El carragenano  $\iota$  se diferencia del  $\kappa$  por la presencia de un grupo sulfato adicional en el C2 de la 3,6-anhidro  $\alpha$ -D-galactosa. Las fracciones  $\mu$  y  $\nu$  están formadas por cadenas lineales de  $\beta$ -(1,4)-Dgalactosa-4-sulfato y  $\beta$ -(1,3)-Dgalactosa-6-sulfato, teniendo el carragenano  $\nu$  un grupo sulfato adicional en el C2; por tratamiento en medio básico de las fracciones  $\mu$  y  $\nu$  se obtienen los carragenanos  $\kappa$  e  $\iota$  respectivamente (se elimina el grupo 6 sulfato y se forma el grupo anhidro, de forma similar como ocurre en las algas por transformación enzimática, por lo cual las formas  $\mu$  y  $\nu$  se denominan precursores biológicos). El carragenano  $\lambda$  está formado por una cadena lineal de  $\beta$ -(1,4)-Dgalactosa-2-sulfato y 2,6-disulfato- $\alpha$ -(1,3)-D-galactosa (Sand, 1983). Los carragenanos tienen propiedades diferentes según su composición. Todos los carragenanos son solubles a altas temperaturas, formando soluciones de baja viscosidad; a bajas temperaturas sólo son solubles el  $\lambda$ C y las sales de  $\text{Na}^+$  del  $\kappa$ C e  $\iota$ C. No presenta carácter viscosante a altas temperaturas, presentando un importante aumento de la viscosidad en el punto de gelificación. Los polímeros son estables por encima de  $\text{pH}=7,0$ , se degradan ligeramente a  $\text{pH } 5,0-7,0$  y rápidamente por debajo de  $\text{pH } 5,0$ . Por espectrometría infrarroja puede determinarse las características estructurales de los carragenanos, presentando zonas regulares de cadenas enrolladas.

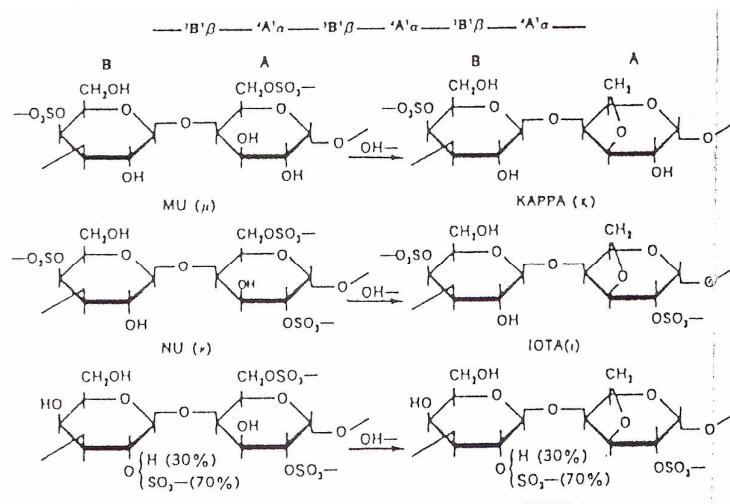


Figura 8: Estructura primaria de los carragenanos (Sand, 1983).

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

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

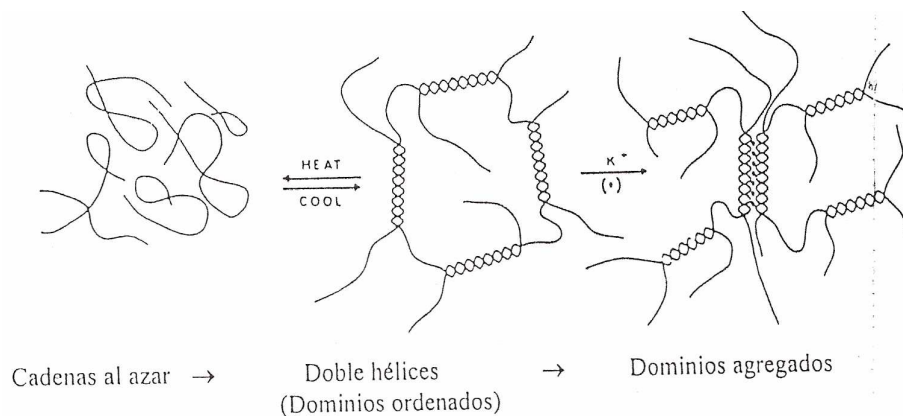


Figura 9: Formación de geles de  $\kappa$ -carragenano (Glicksman, 1983)

En helados, el carragenano protege a la caseína y previene la precipitación durante el procesado inducida por otros componentes como CMC (carboximetilcelulosa), galactomananos o goma xántica. En el producto final reduce la sinéresis y favorece la textura. Su poder estabilizante es usado también en postres a base de leche y flanes "sin huevo". En productos a base de queso actúa como estabilizante de la emulsión, y en

postres helados inhibe la formación de grandes cristales de hielo (se lo usa generalmente con otras gomas). En productos de panadería actúa como acondicionante de las masas, contribuyendo al incremento del volumen final. Su uso en tartas mejora el aspecto y la textura de las masas, mientras que en alimentos sometidos a fritura reduce la absorción de aceite (Whistler y Daniel, 1993).

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

$\lambda$ C es extraído de diferentes especies de los géneros *Gigartina* y *Chondrus*. El esporofito de estas algas produce  $\lambda$ C mientras que el gametofito produce un tipo híbrido de  $\kappa/\lambda$  carragenano que son ambos tipos juntos (Van de Velde, 2001) en diferentes proporciones (Bixler, 1996). Aunque  $\lambda$ C no es gelificante como  $\kappa$ C, es capaz de hacerlo en combinación con otros biopolímeros.

### 7.3 Goma garrofin o locust bean gum (GG)

Los galactomananos son polisacáridos de reserva de energía en semillas de plantas leguminosas. Estos polímeros consisten en una cadena principal con unión (1-4) de residuos  $\beta$ -D-manopiranosil, la mayoría sustituidos con una única unidad de  $\alpha$ -D-galactopiranosil a lo largo de la cadena. La relación manosa/galactosa (M/G) depende de la fuente vegetal y del método de extracción pudiendo variar desde 1 a 5 (Morrison, 1975; Dey, 1978). Locust bean gum o goma carob se obtiene a partir de la molienda del

endosperma de la semilla de *Ceratonia siliqua*, un árbol leguminoso que crece en los países mediterráneos. Es una molécula lineal de manosas con residuos de galactosa cada 4 o 5 monómeros de manosa. El peso molecular promedio es de  $3 \cdot 10^5$ .

#### 7.4 Goma guar (G)

Este galactomanano es simple, no iónico y mejor caracterizado de los polisacáridos ramificados extraído de las semillas de *Cyanopsis tetragonoloba*. También es llamado de otras formas: guaran; clusterbean, Calcutta lucern; Gum cyanopsis, Cyanopsis gum, Guarina; Glucotard, Guayarem, entre otros. La composición de la goma guar es 75% de fibra soluble; 7,6% de fibra insoluble; 2,16 de proteína; 0,78 % de lípidos totales; 0,54% de cenizas y 9,55% de humedad (Frias,1998). La goma guar es un galactomanano de alto peso molecular con uniones (1-4) en la cadena de  $\beta$ -D manopiranososa con puntos de ramificación en carbono 6 de  $\alpha$ -D-galactosa (1-6) (Crescenzi, (2004).

Las propiedades de los galactomananos depende de su estructura química como longitud de la cadena; disponibilidad de grupos *cis*-OH; hidratación estérica; grado de polimerización; y sustituciones de grupos, los cuales varían considerablemente las características funcionales (Daas, 2000). La relación G/M es aproximadamente 1/2 y los pesos moleculares varían entre  $0,5 \cdot 10^6$  y  $11 \cdot 10^6$ .

#### 7.5 Polisacáridos tensioactivos: hidroxipropil metil celulosa (HPMC)

La celulosa se encuentra en casi todas las plantas terrestres, conforma la pared celular. Químicamente difiere del almidón simplemente por tener uniones  $\beta$ -1,4 en lugar de  $\alpha$ -1,4 con la glucosa. Sin embargo, este pequeño cambio se traduce en una gran diferencia en propiedades funcionales. La celulosa es insoluble en agua aunque es altamente hidrofílica debido a su estructura cristalina. No es digerible por el cuerpo humano. Para uso en alimentos es necesario hacerla soluble mediante diferentes métodos produciendo derivados de la celulosa. La solubilidad se alcanza alterando sus regiones cristalinas ordenadas por sustitución química (Sarkar, 1995). Los derivados principales son carboximetilcelulosa (CMC), disponible en varias formas y grado de sustitución, y su uso depende de la aplicación requerida. La función básica es absorber agua o impartir viscosidad con el fin de

estabilizar o prevenir sinéresis. Otros derivados son las metilcelulosas (MC) y las hidroxipropilmetilcelulosas (HPMC) que gelifican con la temperatura. Esta última, posee grupos metilos e hidroxipropilos adicionados al esqueleto principal de celulosa. Están incluidos en la familia de los éteres de celulosa que difieren principalmente en peso molecular, viscosidad, grado de sustitución y sustitución molar. El grado de sustitución define el número promedio de grupos hidroxilos por unidad de anhidroglucosa, donde el hidrógeno es reemplazado por un grupo metilo. La sustitución molar representa el número promedio de grupos óxido de propileno por unidad de anhidroglucosa (Nahringbauer, 1995). Los grupos metilos constituyen zonas hidrofóbicas a lo largo de la cadena de celulosa, mientras que los grupos hidroxipropilos, son más hidrofílicos. Esto ayuda a la molécula de HPMC a comportarse como surfactante, reduciendo la tensión superficial al acomodarse y reorganizarse en la interfase aire-agua (Nahringbauer, 1995; Wollenweber, 2000).

HPMC es usado en la industria de alimentos, tecnología de impresión y aplicaciones farmacéuticas a causa de sus propiedades no tóxicas y mecánicas. En la industria farmacéutica HPMC es de especial interés por controlar la liberación de drogas (McCristal, 1997; Ford, 1999). En la industria de alimentos, es usado para mejorar la calidad de productos horneados (Bell, 1990; Rosell, 2001) en panes libre de gluten (Toufeili, 1994; Kobylasny y col, 2004), en productos de batido (Sanz, 2004) y coberturas comestibles bajas en grasa (Balasubramaniam, 1997; Albert, 2002). La utilidad del HPMC está basada en cuatro atributos principales: agente viscosante; tensioactividad; habilidad de formar películas y la capacidad de formar geles reversibles por calentamiento. Los geles producidos disminuyen la absorción de aceite. La formación y estabilidad de espumas y emulsiones es fuertemente influenciada por las propiedades superficiales e interfaciales de los componentes activos superficialmente del sistema (Dickinson, 2001), como así también la competencia entre proteínas y polisacáridos, factor importante en la estabilidad de espumas y emulsiones (Wilde, 2004). Los polisacáridos activos superficialmente se encuentran en expansión creciente en la industria alimenticia, en especial por las propiedades tensioactivas (Rosell y col., 2001), capacidad de retención de agua (Sarkar, 1995) y viscosidad (Wollenweber, 2000).



## ***Capítulo I***

*Efecto del grado de hidrólisis en las propiedades de espumado e interfaciales de proteína de soja.*

## ***1.1 Caracterización del aislado de proteína de soja (SP) e hidrolizados.***

### *1.1.1 Hidrólisis enzimática de la proteína de soja y determinación del GH*

Se obtuvieron dos hidrolizados proteicos utilizando relaciones enzima/sustrato (E/S), de 0,5/100 y 2/100, durante 1 hora a pH = 7. Los grados de hidrólisis medidos mediante la técnica de OPA, fueron de 2 y 5,35% y los hidrolizados correspondientes fueron denominados H1 y H2.

### *1.1.2 Grado de desnaturalización*

Se analizó el grado de desnaturalización de la proteína de soja (SP) que fue usada como material de partida y de los hidrolizados obtenidos, H1 y H2, mediante DSC. Se realizó un barrido desde 0°C hasta 95°C. Según la bibliografía los picos principales endotérmicos de desnaturalización de las globulinas 7S y 11S se encuentran en 77 °C y 94 °C respectivamente (Sorgentini y col.,1999). Debido a que no se encontró ningún pico endotérmico se concluye que la proteína de soja comercial y los hidrolizados obtenidos se encuentran totalmente desnaturalizados. Este dato revela el entorno químico presente en el momento de la hidrólisis enzimática, el cual influye en el tipo de productos de hidrólisis generados (Adler-Niessen, 1986).

Durante la hidrólisis de la fracción 11S de la proteína de soja nativa se forman intermediarios estables mediante la digestión con tripsina (Katamata y Shibasaki, 1978 a ; 1978 b). También cuando la fracción 7S de la proteína de soja es modificada con renina (Lewis y Chen, 1979) o con tripsina, se forman intermediarios estables (Katamata y col.,1982). Si continúa la hidrólisis sobre la fracción 11S con tripsina se forman una gran cantidad de fracciones de bajo peso molecular (Lynch y col., 1977 a; 1977 b). La rápida conversión de proteína nativa a desnaturalizada, sería la consecuencia de que el aumento del GH es acompañado por grandes cambios en la conformación proteica. Por lo tanto la reacción proteolítica no sólo afecta la estructura primaria, sino también la secundaria y la terciaria en hidrólisis extensivas.

En cambio, si el sustrato de partida son proteínas inicialmente desnaturalizadas por calor, como es el caso del presente trabajo, existen gran número de enlaces peptídicos accesibles a las proteasas, lo que indicaría que la distribución de pesos moleculares de los péptidos

originados por la hidrólisis de estas proteínas debería ser amplio, comparado al obtenido en la hidrólisis de la proteína nativa (Addler-Niessen,1986). El efecto de la hidrólisis en proteínas desnaturalizadas es más complicado porque la desnaturalización sufrida no sólo implica un desenrollamiento inicial de las cadenas polipeptídicas, sino también la subsecuente agregación irreversible e insolubilización.

A fin de caracterizar mejor el grado de agregación del material de partida se midió mediante dispersión dinámica de luz el tamaño de partícula del aislado de soja comercial (Figura 1). Se aprecia un perfil multimodal con la presencia de agregados producto del proceso industrial. Se observa la presencia de tres fracciones de agregados mayoritarias: una alrededor de  $0,4\mu\text{m}$ ; otra de  $7-8\mu\text{m}$  y la mayor de  $70\mu\text{m}$ .

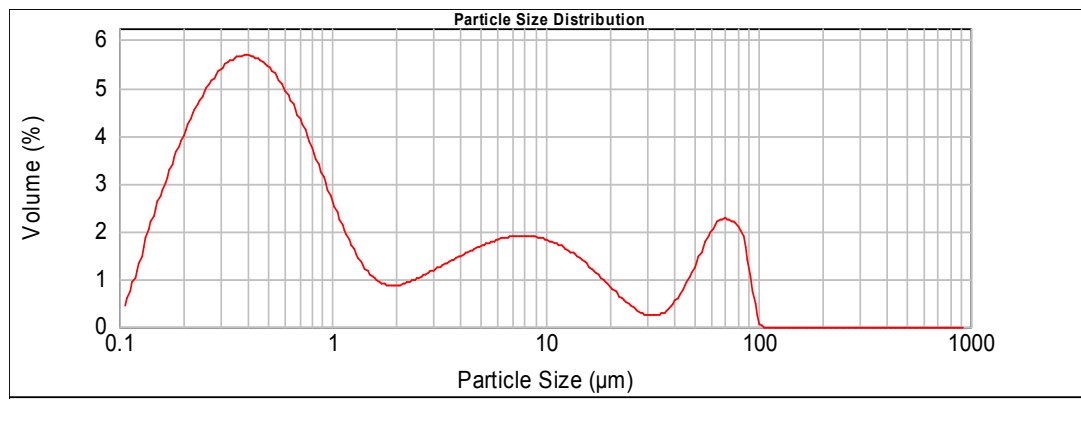


Figura 1: Distribución del tamaño de partículas del aislado de proteína de soja comercial.

### 1.1.3 Solubilidad

La solubilidad en agua destilada expresada como sólidos solubles varió desde 55% para SP hasta 35% y 48% para los hidrolizados denominados H1 y H2 (GH= 2% y 5,35%). En buffer *Trizma* la solubilidad fue de 42%, 46% y 71% para SP, H1 y H2 respectivamente. Se atribuye esta reducida solubilidad a la desnaturalización de la proteína de soja, y en particular a la presencia de agregados de alto peso molecular. El aumento de la solubilidad en buffer *Trizma*, sobretudo en el hidrolizado H2, sería consecuencia de la interacción

entre el buffer y las uniones iónicas presentes en los hidrolizados. Dicho buffer, rompe estas uniones que en principio están presentes en mayor cantidad en los hidrolizados de alto grado de hidrólisis a consecuencia de la mayor cantidad de extremos iónicos producidos por la hidrólisis de los enlaces peptídicos (y consiguiente formación de las uniones iónicas).

#### 1.1.4 Hidrofobicidad superficial ( $H_o$ )

Se analizó la hidrofobicidad superficial a dos voltajes de lámpara distintos de 400 y 700volts, lo cual influye en la sensibilidad de la determinación. La pendiente de la gráfica de la intensidad de la fluorescencia en función de la concentración de la proteína es la hidrofobicidad superficial ( $H_o$ ) (Kato y Nakai, 1980).

La Figura 2 muestra los resultados para la proteína de soja comercial para ambas intensidades.

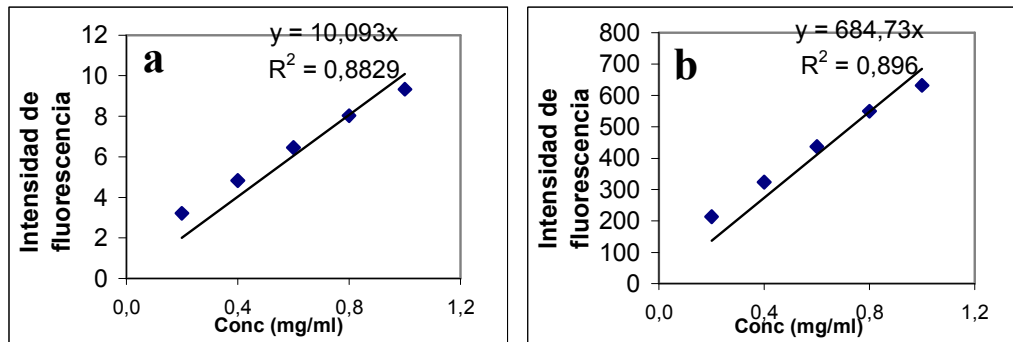


Figura 2: Hidrofobicidad superficial ( $H_o$ ) de proteína de soja (SP) representada a través de la pendiente de intensidad en función de la concentración para (a) 400, (b) 700 volts.

Los cambios introducidos en la hidrofobicidad superficial de las proteínas por la acción hidrolítica se muestran en las Figuras 3 y 4

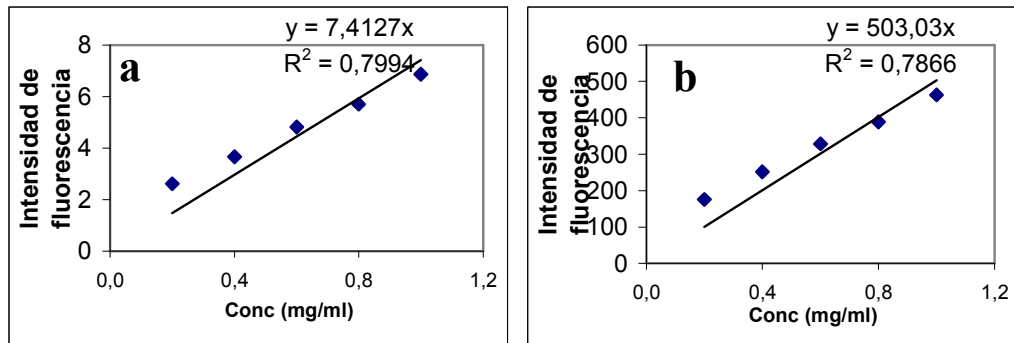


Figura 3: Hidrofobicidad superficial ( $H_o$ ) del hidrolizado H1 a dos intensidades de lámpara, (a) 400; (b) 700 volts.

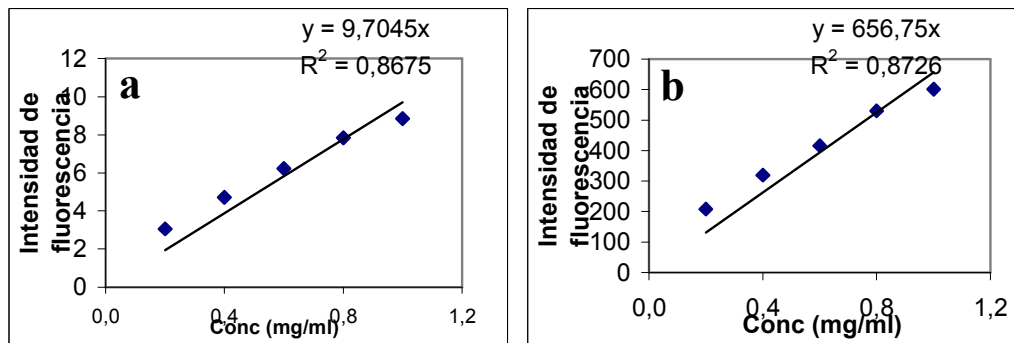


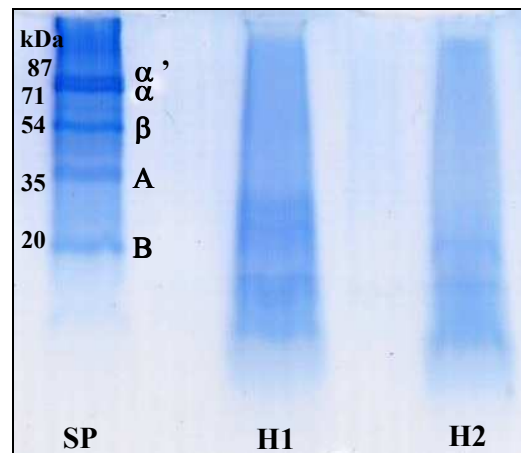
Figura 4: Hidrofobicidad superficial ( $H_o$ ) del hidrolizado H2 a dos intensidades de lámpara, (a) 400; (b) 700 volts.

La hidrólisis produjo una reducción de la hidrofobicidad superficial. Esto podría ser el resultado de la formación de agregados insolubles, via interacciones hidrofóbicas durante la hidrólisis. La formación de dichos agregados reduciría la interacción con el reactivo ANS usado para la determinación de hidrofobicidad superficial (Tolstoguzov, 2003).

Sin embargo debe notarse que la mayor disminución de  $H_o$  ocurrió para el menor GH. Al aumentar el GH a 5,35% los valores de  $H_o$  aumentaron, aproximándose a los de la proteína no hidrolizada.

### 1.1.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se realizaron electroforesis SDS-PAGE, con 15% de concentración de poliacrilamida, con la que se obtiene un rango de resolución de separación entre 15-45 kDa. En la Figura 5 se muestra el perfil electroforético de SP y los hidrolizados H1 y H2.



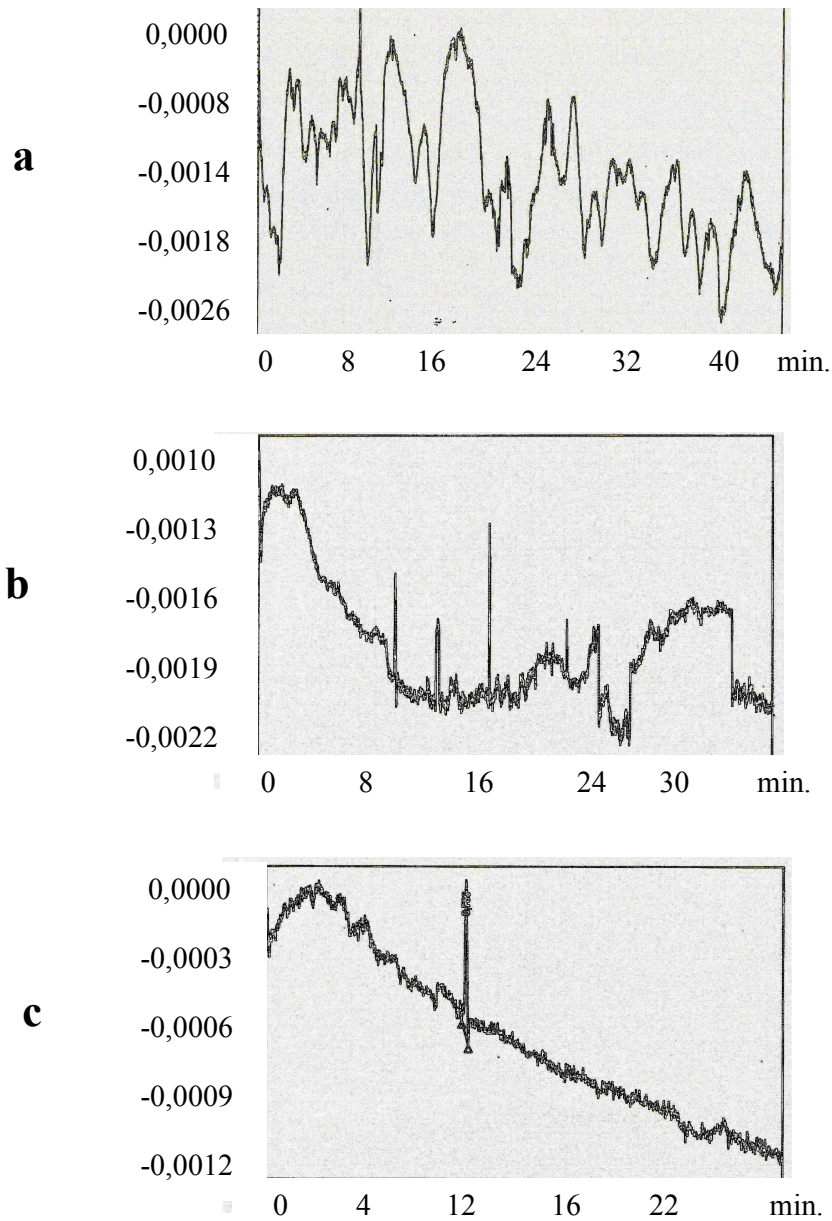
**Figura 5:** SDS-PAGE de la proteína de soja (SP) e hidrolizados H1 y H2.

En la proteína de soja se observa la presencia de las subunidades  $\alpha$ ,  $\alpha'$  y  $\beta$  de la  $\beta$ -conglucina (fracción 7S) y los polipéptidos A y B de la glicina (fracción 11S). No aparece la banda correspondiente al polipéptido A-B, debido a la ruptura del mismo como consecuencia del procesamiento industrial. La subunidad A-B es reducida por el tratamiento térmico, Carp, y col. (1999), lo cual concuerda con el hecho de que la proteína de soja hidrolizada estuviera totalmente desnaturalizada.

En los hidrolizados se observa una desaparición de las bandas correspondientes a todos los polipéptidos y un chorreado continuo hacia valores de PM menores a 20 kDa. Esto indicaría la formación de polipéptidos en todo el rango de pesos moleculares. Este tipo de perfil en los hidrolizados sería consecuencia de la desnaturalización de la proteína de soja, usada como sustrato de la hidrólisis proteica (Adler-Niessen, 1986).

### 1.1.6 Electroforesis Capilar

Se efectuó la electroforesis capilar de la proteína de soja comercial y de los hidrolizados proteicos H1 y H2. La Figura 6 a-c muestra los resultados de dicho análisis. Los ejes corresponden a la absorbancia a 214 nm en función del tiempo de retención en minutos.



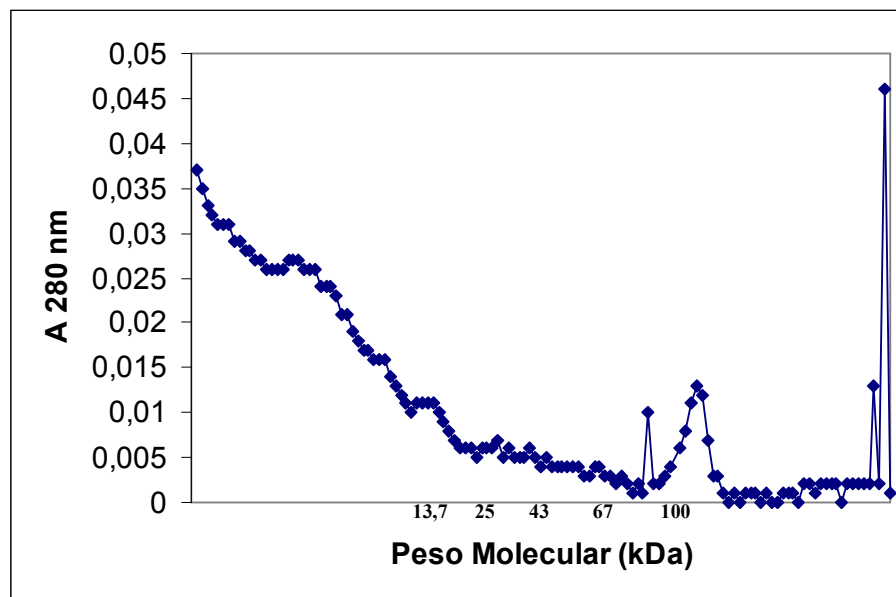
**Figura 6:** Electroferogramas correspondientes a: (a) SP, (b) H1 y (c) H2, a pH= 7, I=0,05M.

A bajos tiempos de migración como resultado de la movilidad en función de la relación carga-tamaño, aparecen las fracciones de menor peso molecular–mayor carga.

Los resultados de la electroforesis capilar muestran la presencia de gran variedad de proteínas presentes en el aislado comercial representado por la extensa cantidad de fracciones que salen a diferentes tiempos. Se observa que el proceso enzimático indujo cambios en el perfil indicando una modificación estructural significativa aportada por la hidrólisis. Conforme aumenta el nivel de hidrólisis, se aprecia un aumento en cantidad de fracciones proteicas de menor tamaño molecular-mayor carga (bajos tiempos de migración) y una disminución significativa de las fracciones de mayor tamaño molecular-menor carga (largos tiempos de migración).

### *I.1.7 Cromatografía de Exclusión Molecular*

Se analizó el hidrolizado H2 a fin de corroborar por otra técnica la existencia de un perfil peptídico muy polidisperso como se mostró por el análisis electroforético.



**Figura 7:** Cromatografía de exclusión molecular del hidrolizado H2 a pH =7 , I=0,01 M ,temperatura ambiente.

En la Figura 7 se observa un perfil continuo en tamaños moleculares. Se observa gran cantidad de fracciones por debajo de los 20 kDa, correspondientes a fracciones producidas por el tratamiento enzimático (Figura 5). Entre 20 y 80 kDa aparecen una pequeña cantidad



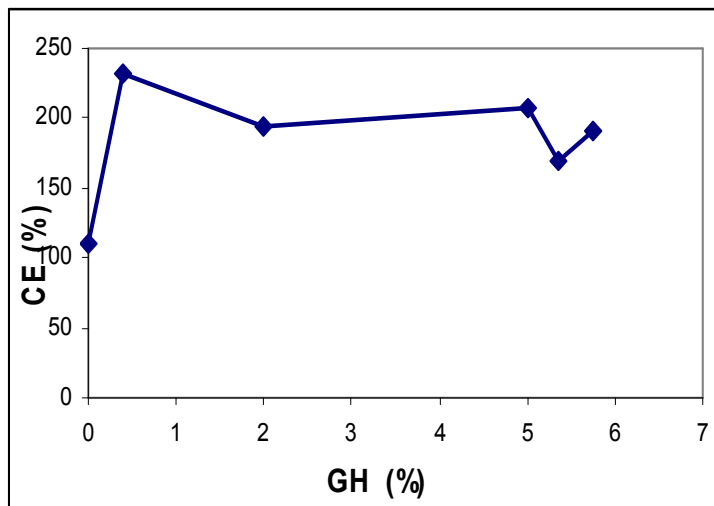
de las fracciones que corresponderían a los componentes mayoritarios del aislado de soja original que a juzgar por la técnica electroforética (Figura 5) se encuentran prácticamente digeridos en H2. Se observa también la presencia de fracciones mayores a 100 kDa que podrían pertenecer a agregados de alto peso molecular (no visualizados en la Figura 5, ya que no entraron en el gel de electroforesis), producto del tratamiento térmico industrial que no fueron digeridos por la proteasa y/o producidos durante la inactivación térmica de la enzima.

## ***1.2 Propiedades de espumado de proteína de soja e hidrolizados***

### *1.2.1 Propiedades de espumado por el método de batido.*

#### Capacidad de espumado

La Figura 8 muestra la CE en función del GH. Las muestras estudiadas corresponden a SP, a los hidrolizados H1(GH=2%) y H2(GH=5,35%) y además a hidrolizados con GH 0,4, 5 y 5,21%.



**Figura 8:** Capacidad de espumado en función del grado de hidrólisis de la proteína de soja.

Los resultados muestran los beneficios del proceso hidrolítico en la CE de la proteína de soja la cual aumentó casi un 100%, destacándose un máximo a muy bajos GH (0,4%). Por lo tanto una hidrólisis limitada es óptima con el fin de incrementar el volumen de la

espuma. Este comportamiento ha sido reportado repetidas veces en diferentes hidrolizados de proteínas y en particular en proteínas de soja (Panyam y Kilara, 1996; 1999; Ipsen y col., 2001; Molina Ortiz y Wagner, 2002; Zylberman y Pilosof, 2002; Martínez y col., 2005).

### Drenado de líquido

El drenado de líquido de la espuma en función del tiempo se modeló de acuerdo a la ecuación (5) (apartado 3.2.3 de Materiales y Métodos), dicho ajuste resultó muy bueno en todos los casos ( $R^2 > 0,90$ ).

Las espumas drenan en primer lugar por un mecanismo gravitacional, que es esencialmente independiente de la distribución del tamaño de burbujas y está dominado por las características fluidodinámicas de la fase continua. Luego de un tiempo, las interfases de dos burbujas adyacentes se acercan reduciendo el espesor de la lamela, y un segundo mecanismo comienza a ser dominante, conocido como drenaje capilar. Las películas se angostan por acción de las diferencias de presión entre las mismas y el plateau border y posterior succión de este último, drenando luego por acción de la gravedad. Mientras el primer mecanismo es independiente del espesor de la película, en el segundo se incrementa la velocidad con la disminución de la misma (Narsimhan y col.,1992) hasta un espesor crítico, determinado por el espesor de la capa adsorbida y las fuerzas repulsivas entre dos interfases, a partir de la cual las propiedades reológicas superficiales de la película son dominantes y la velocidad disminuye (Clark y col.,1994). El drenaje de líquido es retardado porque en la capa superficial (que es estanca) se genera un gradiente interfacial de moléculas adsorbidas (Prins, 1990), apareciendo un gradiente de tensión superficial y disminuyendo el flujo interfacial por el efecto Marangoni y por expansiones de la superficie viscoelástica para disipar las deformaciones locales en la interfase (Lucassen-Reynders, 1993; Tsekov,1999). Estos mecanismos determinan las características de las curvas de drenado de líquido obtenidas, donde se alternan procesos de aceleración y desaceleración.

En la Figura 9 se muestra la velocidad de drenado de líquido ( $K_{dren}$ ) en función del GH de las proteínas de soja para los mismos hidrolizados indicados anteriormente. La  $K_{dren}$  fue evaluada según la ecuación (9) (Apartado 3.2.3 de Materiales y Métodos).

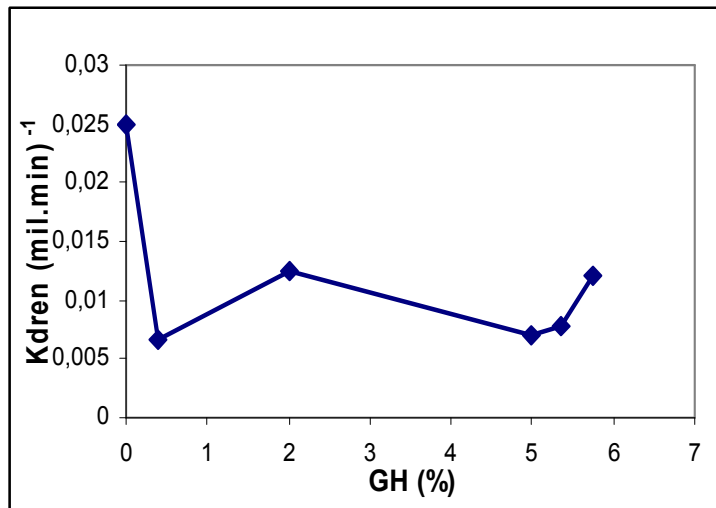


Figura 9: Velocidad de drenado de líquido ( $K_{dren}$ ) en función del grado de hidrólisis de la proteína de soja.

Los resultados indican que el proceso de hidrólisis en términos generales, mejoró la estabilidad al drenado de líquido, debido a la disminución de la velocidad de drenado.

#### Colapso de la espuma

Antes de que las burbujas puedan coalescer, lo cual implica la ruptura de la película proteica (Mita y col.,1977) ésta debe ser lo suficientemente fina como para romperse, alcanzando un espesor crítico.

La estabilidad al colapso se evaluó registrando el descenso de la altura de la espuma en función del tiempo. Se determinó como medida de la velocidad de colapso el tiempo requerido para que la altura inicial de la espuma disminuya 10 ml ( $t_{col}$  10ml).

La Figura 10 muestra la velocidad de colapso de las espumas en función del GH de la proteína de soja.

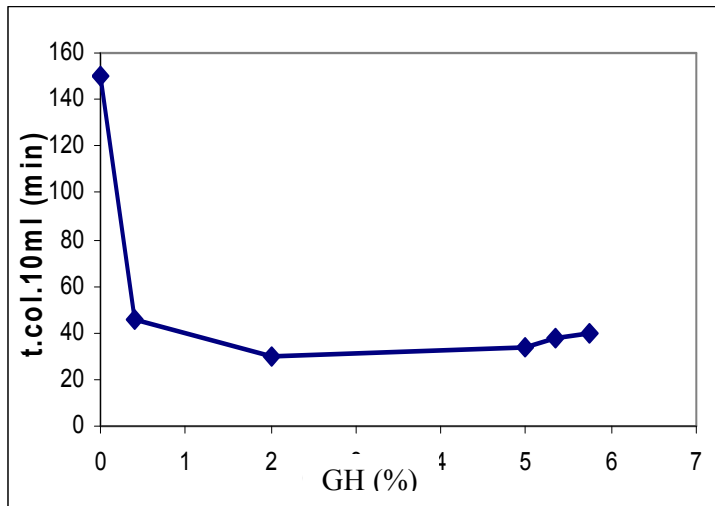


Figura 10: Tiempo requerido para el colapso de 10 ml de espuma en función del grado de hidrólisis de la proteína de soja.

Contrariamente a las demás propiedades de espumado, la velocidad de colapso de las espumas no se vió mejorada al hidrolizar la proteína de soja ya que el tiempo requerido para el colapso de 10 ml de espuma se redujo 3 veces aproximadamente respecto a SP. Es decir, esta propiedad se ve perjudicada con la hidrólisis.

Los resultados indican que la estabilidad al colapso estaría gobernada por factores distintos a los que determinan la estabilidad al drenado y la CE .

También se determinó el tiempo requerido para que comience el colapso, denominado tiempo lag (Figura 11). Este tiempo refleja el retardo que tiene cada espuma en comenzar a colapsar.

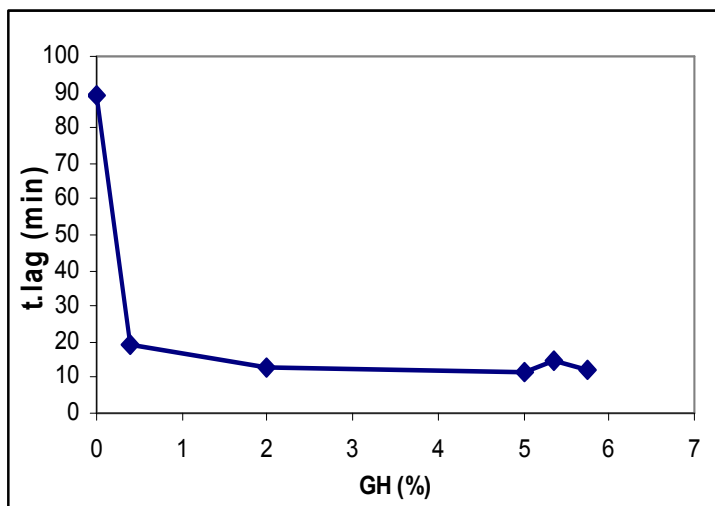


Figura 11: Tiempo lag de colapso en función del grado de hidrólisis de la proteína de soja.

El tiempo lag presenta la misma tendencia que el tiempo de colapso, sin embargo el t.lag se redujo casi 6 veces con respecto a SP. Para todas las propiedades de espumado analizadas se observó que el mayor cambio ocurrió a un GH muy bajo (0,4%), no observándose a mayores GH ulteriores modificaciones importantes. La existencia de un GH óptimo y generalmente bajo ha sido descrito anteriormente. Bernardi Don y col., (1991) encontraron que hidrolizados de proteína de soja desnaturalizada obtenidos con dos enzimas diferentes, una bacteriana y otra fúngica, presentaban las mejores propiedades de espumado, (capacidad de espumado y drenado de líquido) a GH alrededor del 10%. Mayores niveles de hidrólisis (medidos mediante técnica de TCA) en cambio, promovían un descenso muy apreciable en dichas propiedades.

### *1.2.2 Propiedades de espumado por el método de burbujeo*

#### Capacidad de espumado

En el método de burbujeo (realizado a volumen constante de la espuma), la capacidad de espumado es mayor cuanto menor es el volumen de gas incorporado lo cual corresponde a un menor tiempo de burbujeo y por lo tanto a un mayor rendimiento del gas insuflado. Esto ocurre cuando se forman burbujas muy pequeñas rodeadas de películas bien hidratadas, lo que minimiza la difusión de gas. Así, en la técnica por burbujeo (ya sea a tiempo fijo de espumado o volumen final de espuma fijo) el mayor poder espumante de una proteína está dado por la habilidad de incorporar más líquido durante el proceso de formación de espuma, o sea formar espumas densas (Wagner, 2000). Por tal motivo, una mayor densidad “ $\delta$ ” de la espuma indica una mayor capacidad de espumado o un mayor volumen de líquido incorporado.

En la Tabla 1 se exponen los parámetros que reflejan la capacidad de espumado por el método de burbujeo para SP y los hidrolizados H1 y H2.

Proteína	$\delta$	Vo(ml)	Vi(ml/s)
SP	0,07	8,44	0,06
H1	0,13	15,1	0,11
H2	0,05	6,32	0,07

Tabla 1: Parámetros para determinar la capacidad de espumado por el método de burbujeo.

Donde:

$\delta = \frac{V.l.i - V.l.f}{V.esp.f.} = \frac{\text{Volumen del líquido en tiempo inicial} - \text{Vol. del líquido en tiempo final}}{\text{Vol. de la espuma en tiempo final (120ml)}}$ . Es la densidad máxima de la espuma, da idea de la capacidad de incorporación de líquido.

Vo= Volumen máximo de líquido incorporado a la espuma al momento de alcanzar la altura de 120 ml de espuma.

Vi= Tasa de incorporación de líquido a la espuma, pendiente de graficar el volumen de líquido en la espuma en función del tiempo de burbujeo.

La Figura 12 muestra las curvas experimentales de las cuales se extraen los parámetros para analizar las propiedades de espumado.

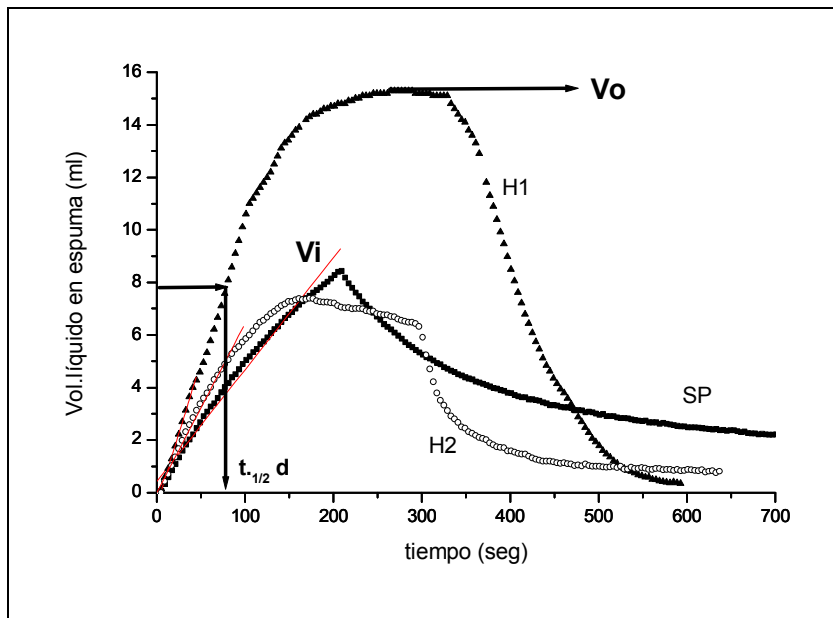


Figura 12: Volumen del líquido de las espumas en función del tiempo de burbujeo, del cual se extrae la tasa de incorporación de líquido a la espuma (Vi) y el volumen máximo de líquido incorporado (Vo) y el  $t_{1/2}$  de drenado.

La densidad máxima de la espuma ( $\delta$ ), correlaciona bien con el  $V_o$  (volumen de líquido máximo incorporado). Los resultados indican un aumento muy importante de la capacidad de espumado de H1 dado que este hidrolizado es el que mayor cantidad de líquido incorpora en la formación de la espuma, como así también la tasa de dicha incorporación ( $V_i$ ). La magnitud de este aumento es similar a la observada por el método de batido. Sin embargo la CE de H2 determinada por el método de burbujeo es más similar a la de SP, no correspondiéndose este resultado con lo observado por el método de batido donde la CE de H2 es mucho mayor que la de SP.

#### Drenado de líquido

La Tabla 2 muestra la estabilidad al drenado de líquido de las espumas por el método de burbujeo.

Proteína	$t_{.1/2d}$ (s)
SP	153
H1	81
H2	31

Tabla 2: Tiempo medio de drenado de líquido de las espumas.

El  $t_{.1/2}$  drenado es el tiempo requerido para que el líquido máximo incorporado a la espuma haya drenado a la mitad del valor inicial. Se extrae del gráfico de volumen de líquido en la espuma en función del tiempo (Figura 12).

Los parámetros de estabilidad indican efectos negativos de la hidrólisis sobre el drenado de líquido ya que conforme aumenta el grado de hidrólisis, el  $t_{1/2}$  d, es menor.

En este caso se encontraron resultados opuestos al método de batido, ya que por este último se observó un efecto estabilizador de la hidrólisis.

#### *1.2.3 Discusión de los resultados obtenidos por el método de batido y burbujeo*

Los dos métodos utilizados para la obtención de espumas (batido y burbujeo) indican que la capacidad de espumado aumenta en la proteína hidrolizada y en especial a bajos niveles de hidrólisis. Por otro lado con respecto a la estabilidad de las espumas el método de batido muestra que aumenta la estabilidad al drenado de líquido y que disminuye la estabilidad al

colapso de las espumas, mientras que el método de burbujeo indica que las espumas son menos estables al drenado de líquido como consecuencia de la hidrólisis.

En principio las diferencias en los resultados pueden atribuirse a que los dos métodos tienen fundamentos físicos totalmente diferentes y producen distinto tamaño y distribución de las burbujas, con lo cual los patrones de espumado y estabilidad se ven directamente influenciados por la macroestructura de la espuma. Aún así, comparando el mismo método, hay varias fuentes de variabilidad según la forma de producir la espuma: volumen de líquido inicial, tipo, modelo y geometría del batidor, velocidad, tiempo y temperatura de agitación. Tan sólo la modificación de una de estas variables, llevaría a diferentes espumas. Esto se amplifica si comparamos dos métodos en sí muy diferentes, como en este caso. Por lo dicho, las comparaciones deben ser muy cuidadosas (Naofumi y col., 1982).

En el método de batido, la agitación se efectúa durante un tiempo fijo, y generalmente se incorpora todo el líquido a la espuma, por lo tanto, cuanto menor sea la densidad de la espuma mayor será el poder espumante. Por otro lado, en el método de burbujeo, la espuma llega a un volumen máximo y la cantidad de líquido incorporado va a estar determinado por la eficiencia en producir espuma de esa solución; es decir, cuanto mayor sea la densidad de la espuma resultante, mayor capacidad de espumado tendrá esa solución. En consecuencia, la estabilidad medida como drenaje del líquido va a estar influenciado por la densidad de la espuma (German y col.,1985; Baniel y col.,1997; Phianmongkhal y col.,1999).

Se han reportado trabajos en donde se puede medir la cantidad de líquido incorporado durante el burbujeo a lo largo de la altura de la espuma la cual depende de la tasa de flujo de gas. La diferencia en la velocidad de flujo determina una incorporación diferencial de líquido que lleva así a diferentes tasas de drenado. Una mayor tasa de flujo de gas promueve mayor incorporación de líquido en la parte alta de la columna de la espuma y esto lleva a una mayor velocidad inicial de drenaje de líquido (Barigou, y col., 2001). Esto explicaría porqué el hidrolizado H1 al presentar mayor CE (reflejado en una mayor cantidad de líquido incorporado y mayor densidad) presentó una mayor velocidad de drenado.

Respecto al tamaño de poro, se encontró en espumas de seroalbúmina bovina que es mayor la capacidad de espumado y estabilidad cuando menor es el tamaño de poro por el cual fluye el gas formador de la espuma (Phianmongkhal y col.,1999). Se ha reportado el mismo resultado en espumas preparadas a partir de proteínas de suero lácteo. Esto es



debido a que las burbujas producidas son de menor tamaño y en consecuencia, más estables al colapso. Burbujas pequeñas (150-210  $\mu\text{m}$ ) forman una estructura fina caracterizada por alta firmeza y bajo drenado (Bals y col., 2003).

Otra diferencia reside en la energía entregada en el método de batido. Está comprobado que la agitación mecánica aporta cierta energía superficial causando el desplegamiento de las proteínas, modificando las fuerzas secundarias (interacciones hidrofóbicas e iónicas) y eventualmente rompiendo uniones disulfuro lo que permite mayor flexibilidad conformacional, afectando la formación de la película proteica adsorbida en la interfase. Esto lleva a un incremento del volumen de la espuma y disminución del drenaje, por formación de películas estables y cohesivas (Rawel y col., 1994).

Otra diferencia que radica en la técnica es la presencia de fracciones proteicas insolubles e impurezas presentes en el aislado o producidos durante la hidrólisis (Carp, y col., 1999). Esta fracción insoluble se incorpora totalmente a la espuma en el método de batido, pero no hay incorporación en el método de burbujeo, lo que también hace además a una diferencia en la concentración efectiva de proteínas. Estas partículas, bien podrían tener efecto en la difusión de las proteínas a la interfase, lo cual afectaría directamente las propiedades de espumado, como así también en la estabilidad a través de cambios en la viscosidad en el seno de la solución (Hermansson y col, 1971).

Resultados similares se han obtenido respecto a la capacidad de espumado de la proteína de soja nativa y desnaturalizada con el agregado de diferentes concentraciones de goma xántica, comparando el método de batido y burbujeo (Carp y col., 2001). Se encontró que el aumento de la concentración de la goma xántica producía una disminución de la capacidad de espumado de la proteína de soja y también de la desnaturalizada en ambos métodos, difiriendo en el valor de concentración del polisacárido en donde se comenzaba a observar tal reducción. Sin embargo, en este caso también se observó una buena correlación entre los métodos respecto a la estabilidad de las espumas estudiadas. En ambos métodos la adición de la goma xántica influyó disminuyendo la velocidad de drenado de líquido, es decir, aumentando la estabilidad al drenado, en forma similar.

### ***1.3 Propiedades interfaciales***

#### *1.3.1 Isotermas de adsorción ( $\pi$ -C)*

En la interfase aire-agua las proteínas a causa de su naturaleza anfifílica, es decir, afinidad por el agua y por la fase no polar, se adsorben y orientan con los grupos no polares hacia el aire y los grupos polares hacia el agua. Este orden molecular y formación de la película por un surfactante, reduce la tensión superficial y contribuye a la estabilidad de la dispersión. Se forman estructuras que pueden ser descritas en términos de segmentos de una cadena de polipéptidos formando tanto lazos de residuos peptídicos en la interfase como bucles o colas de residuos que sobresalen hacia el seno de la fase acuosa (Dickinson y col., 1988). La reducción de la tensión superficial es un importante atributo que optimiza la energía involucrada en el proceso de espumado (Walstra y col., 1993) y la producción de burbujas más pequeñas, lo cual es un importante factor en la estabilidad de las espumas (Dickinson y col., 1992).

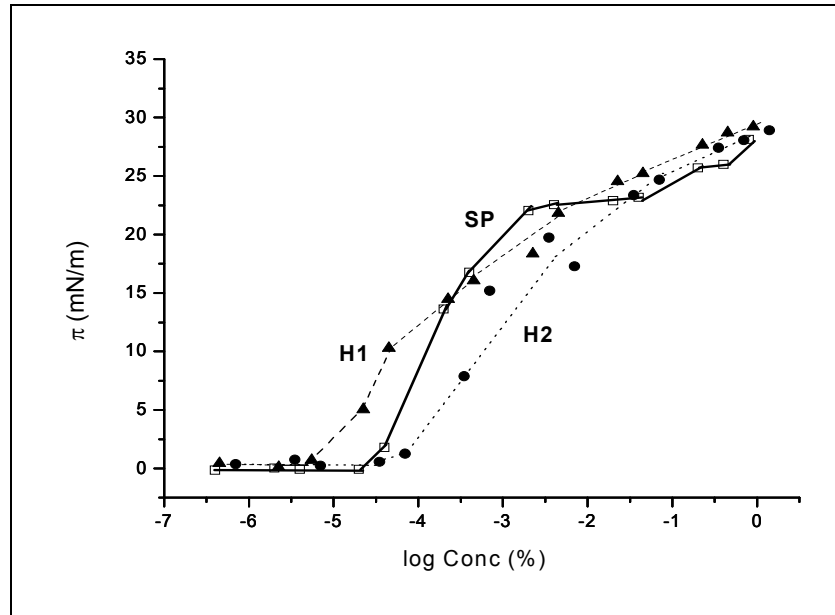
El grado de estructuración de la monocapa proteica estaría relacionada a los estados conformacionales que adopta la proteína, de expansión (estructura I), condensación (estructura II) y colapso (estructura III) los cuales son función de la concentración de la proteína en la subfase.

En la estructura I la proteína adopta una conformación llamada de tren ya que los péptidos se encuentran en secuencia lineal de aminoácidos adsorbidos. Cuando la presión superficial aumenta, pasan a formarse colas y bucles adoptando la proteína una estructura tipo II. La transición desde la estructura I a la II involucra cambios conformacionales pasando de una estructura “expandida” a una estructura “condensada”. El “colapso” (estructura III) de la monocapa está asociada con un mayor aumento de la presión superficial que lleva a la formación de multicapas de proteína en la interfase aire-agua (Wollenweber, 2000). La transición desde estructura I a II ocurre a un valor definido de presión superficial llamado presión crítica ( $\pi_{cr}$ ), mientras que el cambio de estructura de II a III ocurre a una presión denominada presión de colapso ( $\pi_c$ ).

Mediante el tensiómetro de Wilhelmy y siguiendo el protocolo del apartado 4.2.1 de Materiales y Métodos, se obtuvieron las isothermas de adsorción de las tres muestras proteicas estudiadas: proteína de soja e hidrolizados de GH 2 y de 5,35% (SP, H1 y H2 respectivamente). Dichas isothermas representan la variación de la presión superficial en el equilibrio con la concentración de proteína en la subfase.

En la Figura 13 se muestran las isothermas de adsorción en la interfase aire-agua para concentraciones de proteína en la subfase desde  $1 \cdot 10^{-7}$  hasta 2% p/p. Cada punto representa

el promedio de las determinaciones. La desviación media de los resultados fue del 3 %. Las soluciones se hicieron en buffer *Trizma*, pH=7, I=0,05M, 20°C donde las solubilidades para SP, H1 y H2 eran de 42, 46 y 71% respectivamente. Por lo tanto en la Figura 13 las concentraciones graficadas corresponden a la proteína efectivamente solubilizada en dicho buffer.



**Figura 13:** Isotermas de adsorción a 20°C para SP, H1 y H2. Subfase: pH= 7; I=0,05M, T =20°C

En general, se observa que la presión superficial en el equilibrio aumenta al aumentar la concentración de proteína en el seno de la fase, presentándose un comportamiento sigmoideo el cual es similar al obtenido para otras proteínas (Tornberg, 1978; Graham y col., 1979b; Phillips 1981; Damodaran y col., 1988; Suttiprasit y col., 1992; Rodríguez Niño y col., 1998).

En la Figura 13 puede observarse que a las menores concentraciones estudiadas (menor a  $10^{-5}\%$ ) las proteínas no presentan actividad superficial alguna.

En el caso de SP se observa que la mínima concentración de subfase en donde presenta presión superficial es alrededor de  $0,5 \cdot 10^{-4}\%$ . Se observó un punto de inflexión alrededor de 22 mN/m y a partir de una concentración de  $10^{-3}\%$  la isoterma muestra un “plateau” para luego seguir aumentando hasta una presión superficial de aproximadamente 27 mN/m.

Los cambios observados en la isoterma de adsorción de SP podrían ser adjudicados a las transiciones estructurales de la proteína en la interfase aire-agua. Se han reportado para la fracción 7S, 11S y 11S reducida con 10Mm de DTT, cambios estructurales determinados a partir de la isoterma de presión superficial en función del área ( $\pi$ -A) (Carrera Sanchez y col, 2004). En estos estudios, se midió la presión superficial de las fracciones principales de SP, esparcidas sobre agua (directamente en la interfase) en una balanza de superficie tipo Langmuir (Rodríguez Patino y col, 1992; Carrera y col, 1999). Luego del esparcimiento de las muestras se esperó 24 horas para permitir la adsorción y rearreglo de la proteína en la interfase. Se comprimieron las interfases esparcidas y se determinó la presión superficial en función del cambio del área interfacial.

Los resultados indicaron que las monocapas de 7S, adoptaron dos diferentes estados de condensación y una fase de colapso. Para la mayoría de las proteínas globulares (Phillips y col, 1975; Graham y col., 1979; Benjamins, 2000 ; Rodríguez Patino y col., 2001) a bajas presiones superficiales la globulina 7S adopta una conformación expandida en la interfase aire-agua. Esta conformación es más condensada a mayores presiones superficiales y la proteína es desplazada hacia el seno de la solución en el punto de colapso. La transición hacia la estructura más condensada fue observada a una presión superficial de 19 mN/m (presión crítica,  $\pi_{cr}$ ), deducida a partir de la pendiente de la isoterma  $\pi$ -A. Mientras que el colapso de la monocapa se observó a una presión superficial mayor a 27 mN/m (presión de colapso,  $\pi_c$ ).

La fracción 11S presentó resultados similares. La isoterma  $\pi$ -A mostró también dos estados de condensación de la monocapa y un punto de colapso. En este caso la transición hacia el segundo estado de condensación sucedió a 20 mN/m ( $\pi_{cr}$ ) y la transición hacia el colapso de la monocapa sucedió a un valor de 27,6 mN/m ( $\pi_c$ ).

Asimismo, se estudió la fracción 11S previo tratamiento con DTT, la cual, al presentar la ruptura del polipéptido A-B, resulta comparable con la SP comercial utilizada en el presente trabajo. La isoterma  $\pi$ -A de dicha fracción, mostró la transición hacia el segundo estado de condensación a una  $\pi_{cr}$  de 20 mN/m y hacia el punto de colapso a una  $\pi_c$  mayor a 22,8 mN/m.

Dado que los puntos de inflexión de las isotermas de presión superficial en función del área se corresponden con puntos de inflexión y “plateau” en las isotermas de presión superficial en función de la concentración, (Graham y col., 1976), la presión superficial de

22 mN/m correspondiente al punto de inflexión y plateau en la Figura 13 representaría la  $\pi_{cr}$  para el aislado SP estudiado, correspondiendo a la transición de estructura I a II. La fase de colapso ( $\pi_c$ ) de las proteínas de soja ocurriría a 27 mN/m a concentración de subfase de 2% (Figura 13).

El hidrolizado H1 presentó un aumento de la presión superficial a menores concentraciones en comparación con SP lo cual indica una mayor actividad superficial. Este fenómeno se ha descrito también en isotermas de adsorción para proteínas de girasol hidrolizadas (Minoñes y col., 2005). Esto podría deberse a aminoácidos anfifílicos producidos durante la hidrólisis, que se comportan como tensioactivos de bajo peso molecular (Rodríguez Niño y col., 1997); es decir, serían activos superficialmente a muy baja concentración (Miñones y col, 2005).

Además, para H1 no se observó la formación de un “plateau” definido como en el caso de SP, creciendo la presión superficial en forma continua hasta las mayores concentraciones. Sin embargo presentó mayores valores de presión superficial que SP a menores concentraciones en la subfase y a concentraciones superiores a  $10^{-2}\%$ , lo cual indica que H1 tiene mayor actividad superficial que SP.

Este comportamiento puede ser atribuido a la flexibilidad molecular que adquieren las proteínas al ser hidrolizadas; además el menor tamaño de las mismas (Figuras 5 y 7) permitiría un mayor empaquetamiento en la interfase sin que ocurran cambios estructurales. Los hidrolizados constan de un conjunto de péptidos con una distribución de pesos moleculares muy amplia pero mayoritariamente menor a 20 kDa. Esto resultaría en la adsorción en la interfase de un gran número de péptidos de diferente peso molecular pero suficientemente pequeños para que puedan empaquetarse en la interfase sin sufrir transiciones estructurales como las observadas para SP donde la fracción 7S y 11S o los polipéptidos que la forman poseen una estructura grande y compleja que se modifica en la interfase de acuerdo a la presión superficial/área interfacial. Esto explicaría la ausencia de puntos de inflexión en las isotermas  $\pi$ -C de H1 y H2. Resultados similares se obtuvieron en el caso de hidrolizados de proteína de girasol; las isotermas de adsorción de hidrolizados con GH= 5,62%, presentaron mayor presión superficial que la proteína sin hidrolizar (Miñones Conde y col, 2006b). La máxima presión superficial alcanzada por los hidrolizados durante la adsorción en solución acuosa (la actividad superficial) fue mayor que la correspondiente a las proteínas sin hidrolizar. A diferencia de los resultados

observados para los hidrolizados de proteína de soja H1 y H2 resultados recientes (Miñones y col., 2005), muestran que las monocapas esparcidas de hidrolizados de proteína de girasol adoptan dos estructuras diferentes o estados de condensación y la fase de colapso. Se observó que el grosor de la película aumentó cuando se incrementó la presión superficial desde una estructura expandida a una más condensada seguida por el colapso de la monocapa (Miñones y col., 2005).

La isoterma de adsorción de H2 requirió una concentración similar a SP para presentar presión superficial (mayor a  $10^{-4}$ %) y presentó menor presión superficial a todas las concentraciones de subfase por debajo de  $10^{-2}$ %. A concentraciones mayores a  $10^{-2}$ %, la isoterma de H2 se aproximó a la isoterma de H1.

Por lo tanto H2 presenta menor actividad superficial que H1 y SP a concentraciones menores de  $10^{-2}$ % y menor actividad superficial que H1 a toda concentración de subfase.

Tales interpretaciones de las isotermas de adsorción permiten inferir que los hidrolizados no presentan los cambios estructurales que presentó SP en el rango de concentraciones estudiadas. Probablemente, una vez saturada la interfase se pase al estado colapsado directamente, sin presentar un segundo estado de condensación o bien la transición de un estado I a II sucedería a concentraciones mayores que las estudiadas.

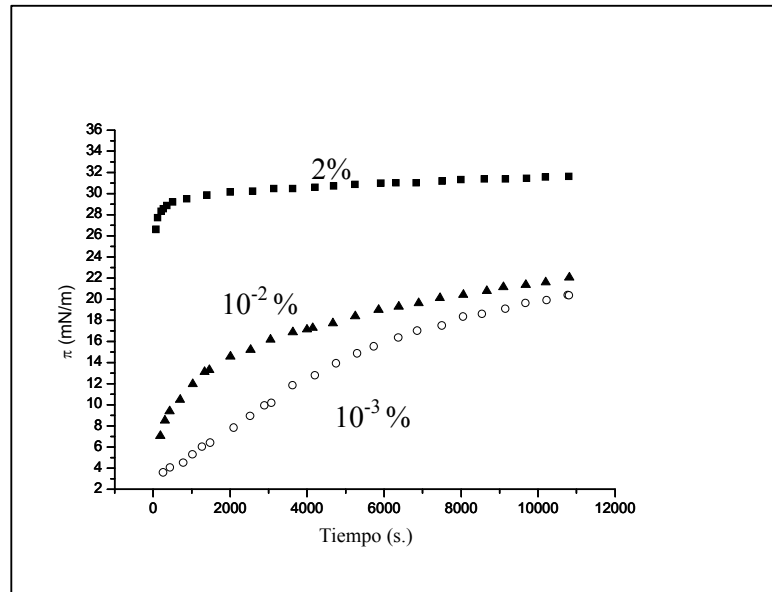
### *1.3.2 Cinética de adsorción en la interfase aire-agua y reología de la película superficial.*

#### *1.3.2.1 Cinética de adsorción*

El proceso de adsorción interfacial juega un rol fundamental y determinante del comportamiento de los coloides alimentarios. La adsorción es el fenómeno mediante el cual las moléculas se acumulan en la interfase en una concentración mayor que la que se podría esperar de la simple distribución al azar de las mismas. La cinética de adsorción de las proteínas en la interfase aire-agua fue estudiada con un tensiómetro de gota o Trácker siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos del apartado 4.2.2. En este proceso se distinguen tres etapas: difusión de la proteína a la interfase, penetración y reordenamiento (Mac Ritchie, 1978; Tornberg, 1978; Graham y col., 1979b).

En la Figura 14 se muestra a manera de ejemplo la evolución de la presión superficial del hidrolizado H2 en función del tiempo de adsorción para distintas concentraciones en la subfase,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  y 2% p/p. Estas concentraciones se seleccionaron en base a las isotermas

$\pi$ -C (Figura 13) ya que corresponden a diferentes estructuras de la proteína en la monocapa: una estructura expandida ( $10^{-3}\%$ ), una estructura más condensada ( $10^{-2}\%$ ) y una colapsada ( $2\%$ )



**Figura 14:** Cinética de adsorción en la interfase aire-agua de H<sub>2</sub> a tres concentraciones diferentes de subfase:  $10^{-3}\%$ ,  $10^{-2}\%$ ;  $2\%$ ; durante 3 horas, pH= 7; I=0,05M, T= 20°C.

El crecimiento de  $\pi$  refleja la adsorción de la proteína a la interfase (Mac Ritchie, 1978) y en su estadio más avanzado, procesos de reordenamiento en la interfase.

La presión superficial con el tiempo de adsorción resultó mayor a mayores valores de concentración en la subfase, lo cual tiene relación con datos previos de la literatura para adsorción de proteínas de soja en la interfase aire-agua (Damodaran y col., 1997; Rodríguez Patino y col., 2004), proteínas de suero lácteo (Halling y col., 1981; Damodaran y col., 1990; Dickinson y col., 1992; Damodaran y col., 1997; Dickinson y col., 1998; Benjamins, 2000; Horne y col., 2003; Carrera y col., 2005).

El paso más importante en la formación de una espuma o una emulsión es la adsorción inicial de la proteína en la interfase. A bajas concentraciones superficiales la presión es baja y las moléculas se adsorben irreversiblemente por difusión. En el caso de la adsorción controlada por la difusión, en ausencia de convección, la difusión es gobernada por el gradiente de concentración (MacRitchie, 1978). Así, este primer paso del proceso de

adsorción puede ser obtenido a partir de la integración de la segunda ley de Fick (Ward y Todai, 1946).

La siguiente expresión modificada de la ecuación de Ward y Todai permite correlacionar los cambios de presión superficial con el tiempo:

$$\pi = 2C_0KT\left(\frac{Dt}{3,14}\right)^{1/2} \quad (1)$$

donde  $C_0$  es la concentración en la subfase,  $K$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta y  $D$  es el coeficiente de difusión. Si la difusión a la interfase controla el proceso de adsorción, entonces una representación de  $\pi$  versus  $t^{1/2}$  será lineal (Mc Ritchie, 1978; de Feijter y col., 1987; Xu y col., 1994) y la pendiente de la recta resultante corresponderá a la velocidad de difusión  $k_d$ .

Se ha reportado un buen ajuste experimental a la ecuación de Ward and Todai (1946) obteniéndose la velocidad de difusión de las proteínas a la interfase a partir de la pendiente del gráfico  $\pi$  vs  $t^{1/2}$ .

Se muestra en la Figura 15 como ejemplo, el gráfico correspondiente a la proteína de soja al 2% de concentración en la subfase, donde se indica la velocidad de difusión ( $K_d$ ) representada por la pendiente inicial.

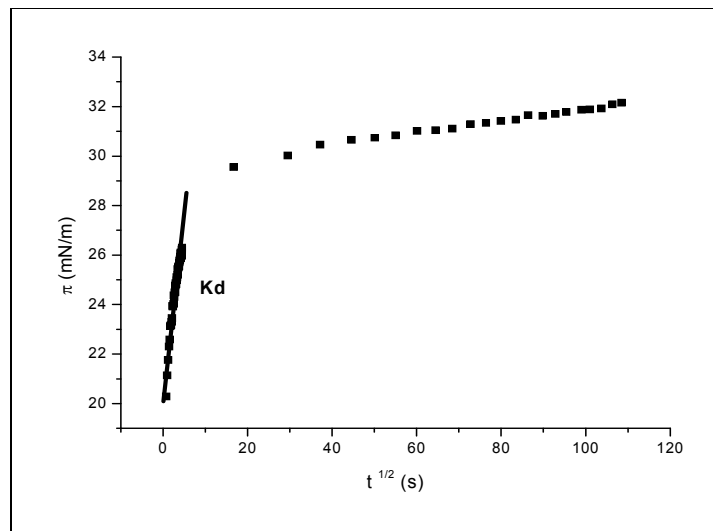
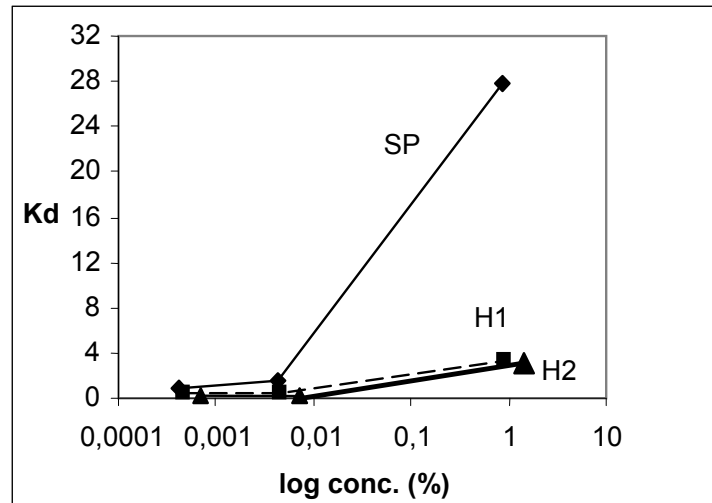


Figura 15: Presión superficial ( $\pi$ ) en función de  $t^{1/2}$  para SP al 2% p/p (concentración de subfase).



La Figura 16 muestra las constantes de difusión ( $K_d$ ) de las muestras SP, H1 y H2 en función de la concentración de proteína soluble en la subfase.



**Figura 16:** Constante de difusión ( $K_d$ ) de las muestras proteicas a la interfase en función de la concentración, pH= 7; I=0,05M, T=20°C.

Se observa que la constante de difusión aumentó con la concentración en las tres muestras, lo cual concuerda con datos previos de la literatura anteriormente citados. Así puede concluirse que la difusión de SP e hidrolizados correlaciona con el gradiente de concentración (Benjamins y col.,2000; Rodríguez Niño y col.,2004).

La  $K_d$  depende además del tamaño, forma molecular, de la naturaleza química superficial de los péptidos como la hidrofobicidad, entre otros factores.

$K_d$  es inversamente proporcional a la raíz cuadrada del peso molecular de acuerdo con la teoría de la penetración (Ward y Todai, 1946), por lo tanto, la reducción del peso molecular de los hidrolizados de SP promovería una mayor velocidad de difusión de los péptidos a la interfase tanto en interfases aire-agua como agua-aceite (Rodríguez Niño y col.,1997 a, 1997b; Rodríguez Niño y col., 2002; Horne y col., 2003; Rodríguez Niño y col., 2003).

Sin embargo, en el presente trabajo,  $K_d$  decreció al aumentar el grado de hidrólisis. Esto indica que el tamaño molecular no es en este caso el factor principal. La menor  $K_d$  observada en los hidrolizados debería atribuirse a una disminución de la hidrofobicidad superficial tal como se mostró en las Figuras 2-4 y posiblemente a una modificación negativa del balance hidrofílico/hidrofóbico de los péptidos generados en la hidrólisis.

Elizalde y col., (1987) demostraron que diferentes proteínas de soja presentan diferentes balances hidrofílicos / hidrofóbicos y que para obtener una capacidad de emulsificación elevada, deben presentar un balance óptimo que implica evitar un excesivo carácter hidrofílico de la proteína. La hidrólisis al generar grupos amino y carboxilo produce un gran aumento en el carácter hidrofílico lo cual en conjunto con la menor hidrofobicidad observada en H1 y H2, determinaría un balance hidrofílico / hidrofóbico más desfavorable para la afinidad por la interfase. Existe evidencia de la disminución de la velocidad de difusión de hidrolizados de proteínas lácteas debido a fracciones de bajo peso molecular (Panyam y col, 1996) que presentan una reducida constante de difusión en los mayores grados de hidrólisis (Carrera y col., 2005). Futuros estudios en donde se determinen la secuencia de los péptidos y estructura, resultará de gran interés en el estudio de la relación estructura-función de hidrolizados de proteína (Kilara y col, 2003).

En un sistema acuoso no agitado, inicialmente, la molécula de proteína hidratada difunde rápidamente a la interfase y el proceso de adsorción está controlado por difusión, dependiendo la velocidad de difusión del tamaño y la forma molecular, y de la posibilidad de que la misma se adsorba al colisionar con la interfase (dependiente de la hidrofobicidad y del impedimento electrostático) (Tornberg, 1978). La superficie de la película se encuentra en continua formación, y para cubrir el máximo área, las moléculas que arriban a la interfase se despliegan y se desnaturalizan parcialmente, dependiendo la capacidad de adsorción de la flexibilidad de la molécula. La fase siguiente a la adsorción involucra la penetración de ulteriores moléculas proteicas en la interfase que esta acompañada por un incremento en la presión superficial (esto es, una disminución en la tensión superficial). Cuando la concentración de la proteína adsorbida ( $\Gamma$ ) se incrementa, se genera una barrera electrostática sobre el lado acuoso de la superficie debido a la orientación preferencial de los grupos proteicos cargados hacia la fase acuosa polar. Las moléculas proteicas requieren entonces una energía cinética adecuada para superar la barrera electrostática (que involucra fuerzas repulsivas, impedimentos estéricos y osmóticos) y comprimir las moléculas ya adsorbidas en la interfase, para permitir la adsorción de proteína adicional. La habilidad de dichas moléculas para adsorberse, penetrar y crear espacio en la película preexistente y reordenarse en la interfase, es ahora la determinante de la velocidad. Una vez adsorbidas en la interfase, las moléculas proteicas interactúan en la misma, para lograr un estado de menor energía libre a través del rearrreglo (Phillips y col., 1994b). Con el incremento de la cantidad de proteína adsorbida el reordenamiento de las moléculas en forma extendida

disminuye y la película cambia de expandida a comprimida (Kinsella y col., 1989). Es sabido que la concentración interfacial de polímero es mucho más alta que en la subfase, por ende el deplegamiento y reordenamiento molecular es un factor magnificado en la interfase, sobre todo en estas moléculas de grandes dimensiones. Otro factor a tener en cuenta serían las interacciones hidrofóbicas en la interfase que estabilizarían más rápidamente la película formada. En conclusión, la dependencia de la presión superficial con el tiempo a bajas concentraciones es el resultado de un proceso controlado por difusión, mientras que a altas concentraciones es un proceso controlado por los reordenamientos en la interfase (Phillips y col., 1975).

El proceso de rearreglo puede comenzar segundos u horas luego de la adsorción, dependiendo de la flexibilidad y de la estructura de la proteína, y puede continuar en un grado más bajo durante días, reteniéndose la estructura terciaria de la proteína en algunas películas (Wilde y col, 1996).

En resumen, luego de la difusión a la interfase, la proteína penetra y se reacomoda en forma termodinámicamente más favorable. La penetración y reacomodamiento se analizan a través de una ecuación de primer orden (2) (Tornberg, 1978; Graham y col, 1979a; Suttiprasit y col, 1992). Usualmente promedia 2 o más regiones lineales. La primera región, corresponde a la velocidad de penetración ( $K_p$ ), mientras que la segunda, a la velocidad de rearreglo ( $K_r$ ) (Rodríguez Patino, 1999). Dicha ecuación se describe como:

$$f(\pi) = \ln \frac{\pi_f - \pi_t}{\pi_f - \pi_0} = -k_i \cdot t \quad (2)$$

donde  $\pi_f$ ,  $\pi_0$  y  $\pi_t$  son las presiones superficiales al final del tiempo de cada etapa, a un tiempo inicial  $t_0$  y a cualquier tiempo  $t$ , respectivamente y  $k_i$  es una constante de velocidad de primer orden. El ajuste de los datos experimentales del proceso se realizó en el intervalo de tiempo donde el coeficiente de regresión lineal fue máximo ( $>0,92$ ).

La Figura 17 muestra dichos procesos para la proteína de soja al 2%.

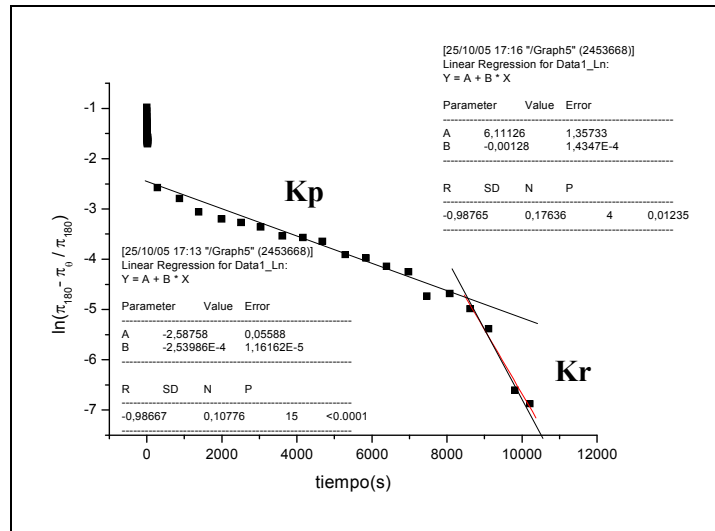
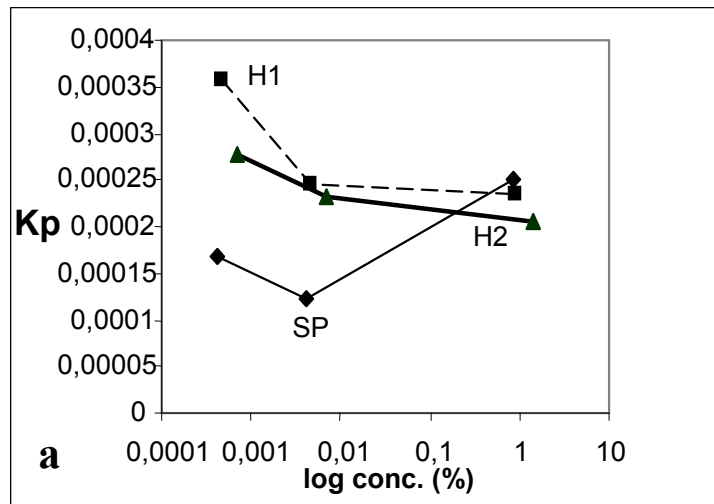
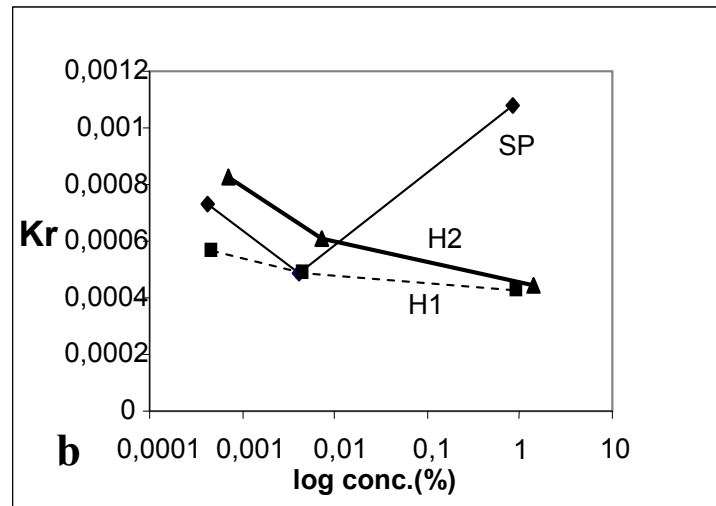


Figura 17: Velocidad de penetración (Kp) y rearreglo (Kr) de SP al 2% (concentración de subfase).

La Figura 18 a-b muestra la evolución de las constantes de penetración y rearreglo en función de la concentración de proteína soluble en la subfase para SP, H1 y H2.





**Figura 18:** (a) Constante de penetración ( $K_p$ ) y (b) constante de rearreglo ( $K_r$ ) de las muestras proteicas en la interfase, en función a la concentración,  $pH=7$ ;  $I=0,05M$ ,  $T=20^\circ C$ .

La velocidad de penetración y de rearreglo de las muestras proteicas en la interfase depende de la concentración de subfase y del grado de hidrólisis en una forma complicada. Estos procesos son en general facilitados a bajas concentraciones (a excepción de SP a la mayor concentración estudiada). Una explicación probable es que a mayores concentraciones proteicas en la subfase la mayor velocidad de difusión a la interfase no favorezca una rápida penetración y rearreglo de los péptidos en la interfase aire-agua debido a interacciones estéricas que impiden un acomodamiento rápido (Rodríguez Patino y col., 1995). El aumento de  $K_p$  y  $K_r$  para SP al 2% en la subfase podría estar asociado al colapso de la monocapa de SP a esta concentración (Figura 13).

Por otro lado se aprecia que las mayores velocidades de penetración no corresponden a las muestras que presentaron las mayores velocidades de rearreglo, indicando que nuevamente, al igual que en el caso de  $K_d$ , dichas características del proceso de adsorción no dependen exclusivamente del tamaño molecular, sino que también estarían gobernados por otras propiedades (Kilara y col, 2003).

Por otro lado se analizó la velocidad global de adsorción ( $K_{ads}$ ) de las muestras proteicas a la interfase al 2% de concentración de subfase. Dicha velocidad global describe el proceso en su totalidad, incluyendo las etapas de difusión, penetración y rearreglo (Kitabatake y col., 1988). Se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\pi(t) = \pi_m t^n / C + t^n \quad (3)$$

Donde:  $\pi(t)$  es la presión superficial en función del tiempo;  $\pi_m$  es la máxima presión superficial;  $n$  es una constante relacionada al comportamiento sigmoideo de la curva cinética del cambio de la presión superficial y  $C$  es un parámetro relacionado con el tiempo necesario para la presión aumente la mitad del máximo ( $\pi_m/2$ )

Los parámetros  $\pi_m$ ,  $C$  y  $n$  se estimaron mediante análisis de regresión no lineal. La ecuación propuesta ajustó muy bien a los valores experimentales ( $R^2$  0,998, 0,995, 0,987). y la constante específica de adsorción  $K_{ads}$  se obtuvo según:

$$K_{ads} = n / \pi_m \cdot C^{1/n} \quad [K_{ads}] = (\text{mN/m} \cdot \text{min})^{-1}$$

Las  $K_{ads}$  obtenidas fueron respectivamente:  $5,31 \cdot 10^{-2}$ ;  $7,14 \cdot 10^{-2}$  y  $4,61 \cdot 10^{-2}$  ( $\text{mN/m} \cdot \text{min})^{-1}$  para SP, H1 y H2. En este caso, a diferencia de las anteriores constantes estudiadas ( $K_d$ ,  $K_p$  y  $K_r$ ) el valor mayor no correspondió a SP, sino a H1, siendo muy parecidos y menores los valores obtenidos para SP y H2. La velocidad global de adsorción presentó una correlación positiva con la capacidad de espumado por el método de burbujeo, medido como  $\delta$ , en las mismas condiciones (Tabla 1 del presente Capítulo).

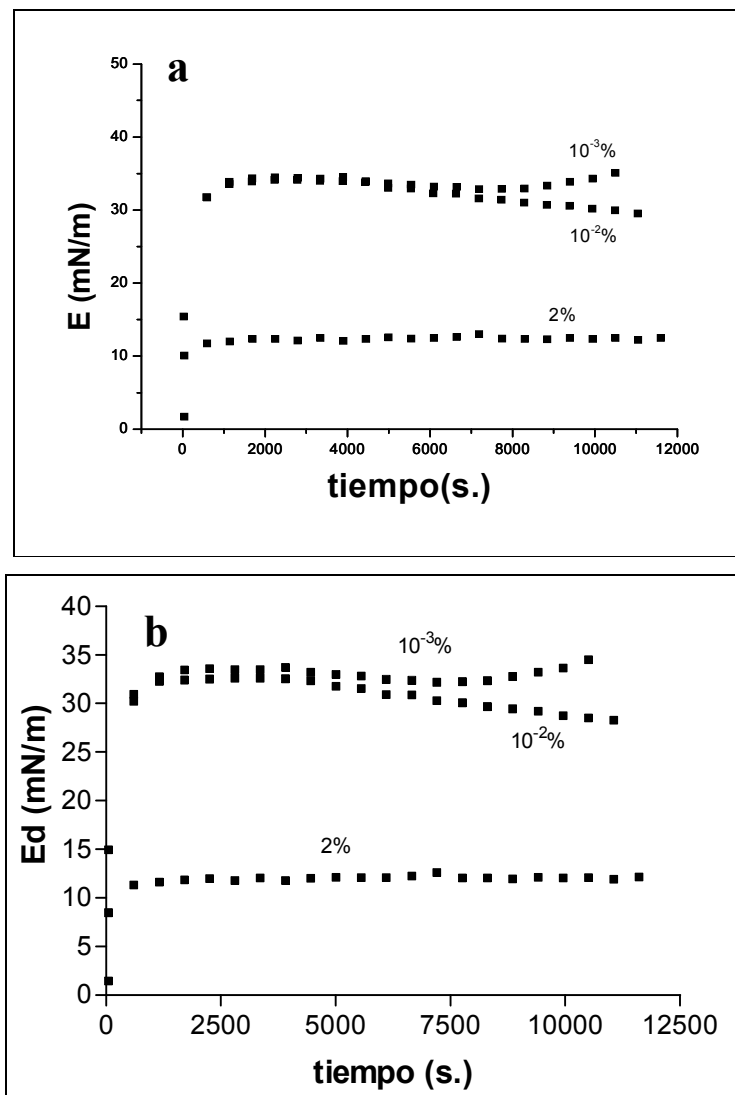
### *1.3.2.2 Reología dilatacional de las películas*

La adsorción de las proteínas en la interfase y otras propiedades de superficie dinámicas como el módulo dilatacional y la viscoelasticidad relativa juegan un rol muy importante en la formación y estabilidad de espumas y emulsiones (Halling, 1981; Dickinson, 1992). La adsorción de las moléculas en interfases fluidas, previene la ruptura de las burbujas o gotas previamente formadas. Por otro lado, el espumado y emulsificación involucran deformación interfacial y la respuesta de la monocapa adsorbida a estas deformaciones (medidas como propiedades dilatacionales de superficie) es crucial para conocer el rol de las proteínas en sistemas dispersos (Benjamins, 2000).

La evolución de las propiedades dilatacionales de superficie fue medida simultáneamente a la cinética de adsorción con el tensiómetro de gota.

Los parámetros viscoelásticos (módulo dilatacional  $E$ , componente elástica  $E_d$  y viscosa  $E_v$ ) fueron medidos en función del tiempo a 15% de amplitud de deformación ( $\Delta A/A$ ) y frecuencia angular de 100 mHz ( $\omega$ ). Se define el ángulo  $\theta$  (grados) como el desfase entre esfuerzo aplicado y deformación adquirida, en donde si el desfase es cero ( $\theta=0$ ) el material es perfectamente elástico y si es noventa ( $\theta=90^\circ$ ) es totalmente viscoso. Por lo tanto la viscoelasticidad relativa será muy alta cuanto  $\theta$  se aproxime a cero.

Las Figuras 19a-b, 20 a-b y 21 a-b muestran la evolución del módulo dilatacional de superficie ( $E$ ) y su componente elástica ( $E_d$ ) en función del tiempo de adsorción para SP, H1 y H2 a diferentes concentraciones en la subfase.



**Figura 19:** (a) Evolución del módulo dilatacional de superficie ( $E$ ) y (b) módulo dilatacional elástico ( $E_d$ ) en función del tiempo de adsorción para SP a tres concentraciones en la subfase:  $10^{-3}\%$ ,  $10^{-2}\%$  y 2%.

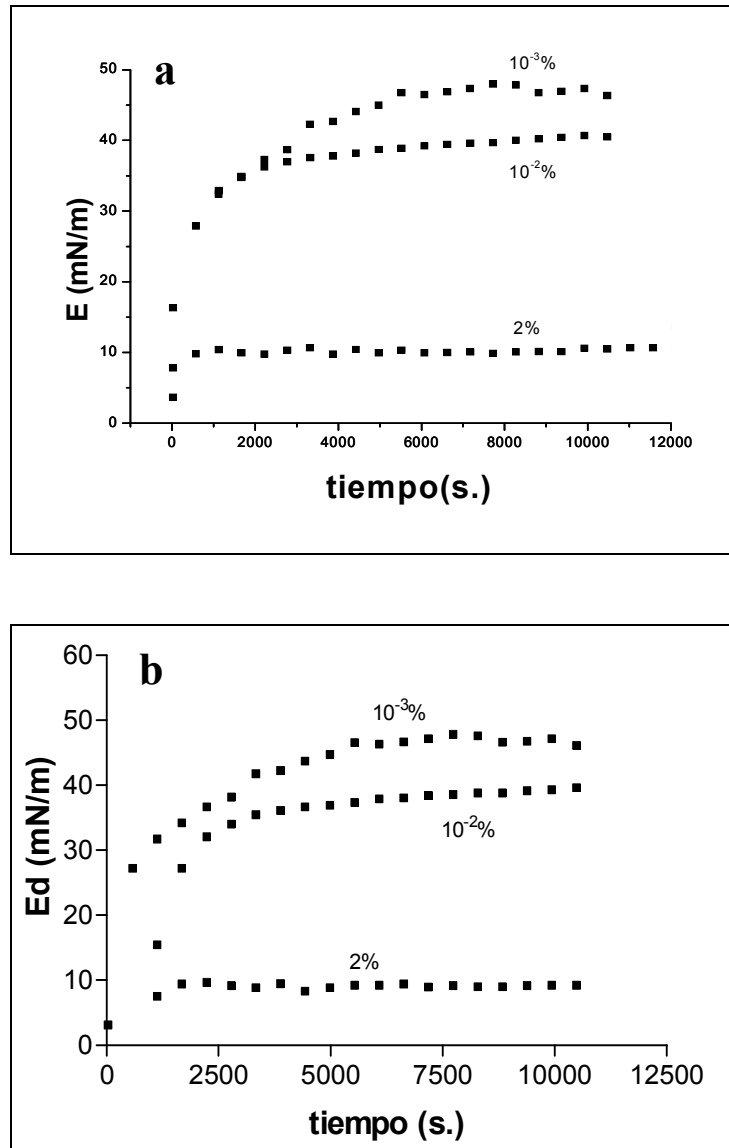
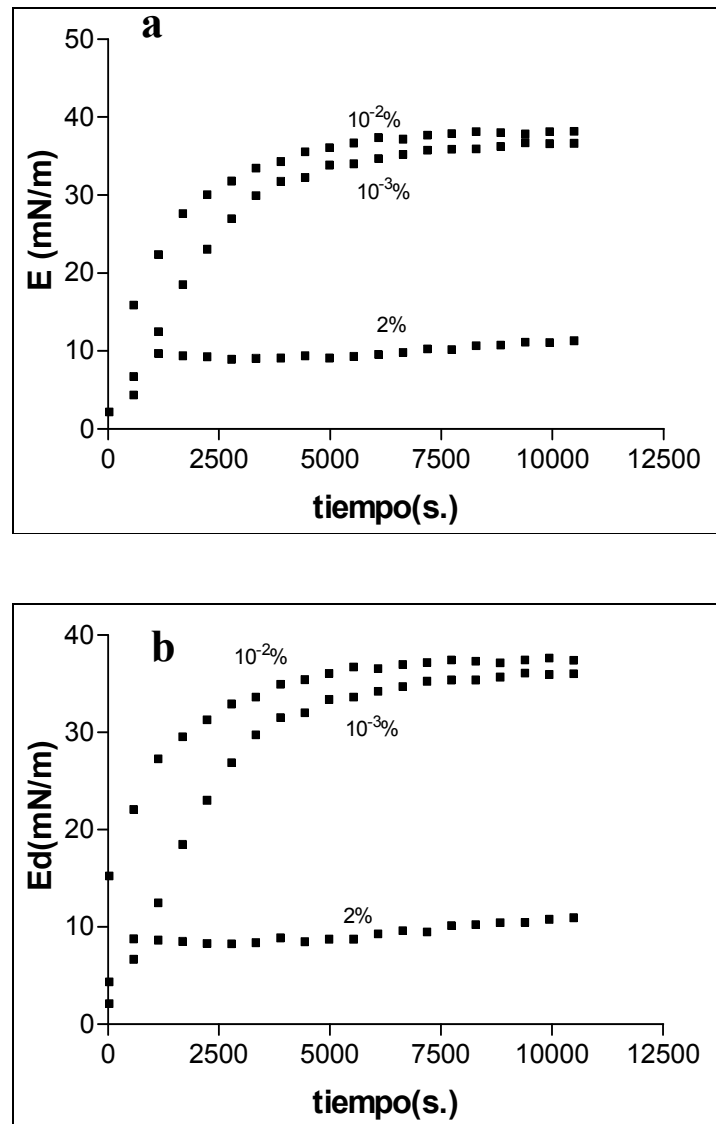


Figura 20: (a) Evolución del módulo dilatacional de superficie (E) y (b) módulo dilatacional elástico (Ed) en función del tiempo de adsorción para H1 a tres concentraciones de subfase: 10<sup>-3</sup>%, 10<sup>-2</sup>% y 2%.





**Figura 21:** (a) Evolución del módulo dilatacional de superficie (E) y (b) módulo elástico dilatacional (Ed) en función del tiempo de adsorción para H<sub>2</sub> a tres concentraciones de subfase:  $10^{-3}\%$ ,  $10^{-2}\%$  y 2%.

El crecimiento del módulo E con el tiempo de adsorción refleja la adsorción de las globulinas de soja en la interfase (Graham y col., 1979a). Este comportamiento fue similar al observado durante la adsorción de proteínas lácteas en interfases agua-aceite (Dickinson, 1998; Benjamins, 2000) en interfases aire-agua (Benjamins, 2000) y durante la adsorción de globulinas de soja en la interfase aire-agua a diferentes pHs (Rodríguez Patino y col., 2005). Los valores de dichos módulos oscilaron entre 40-50 mN/m a largos tiempos de adsorción, los cuales coincidieron con los valores máximos obtenidos en el estudio de

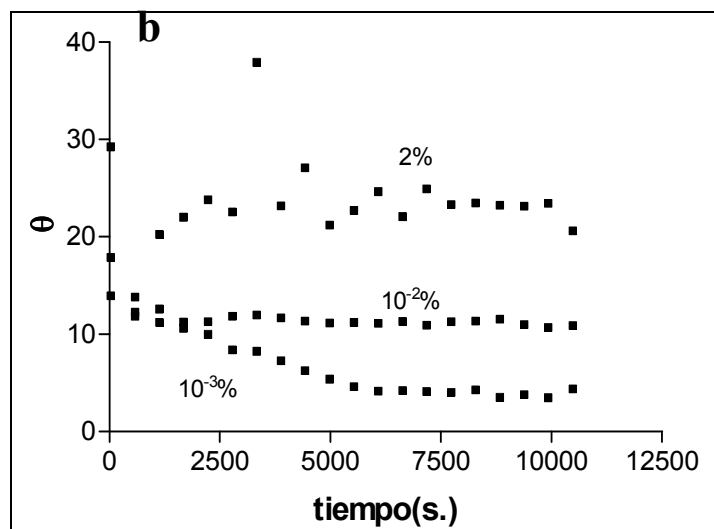
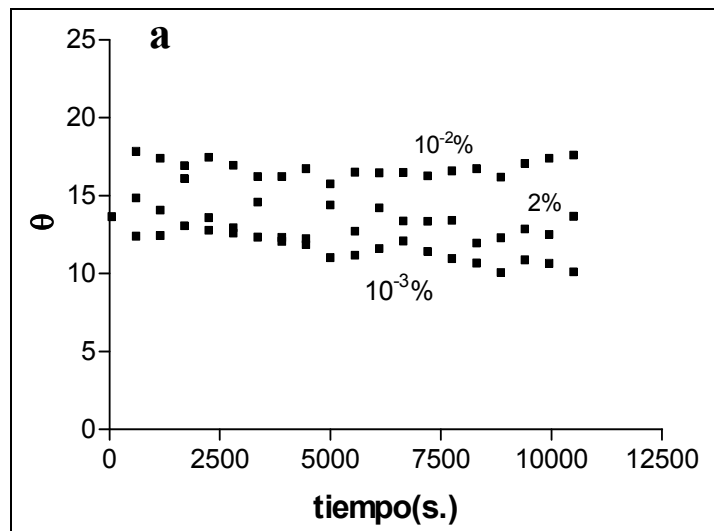
adsorción de las fracciones de la proteína de soja 7S, 11S y 11S reducida con 10 mM DTT a pH= 5 (Rodríguez Patino y col., 2005).

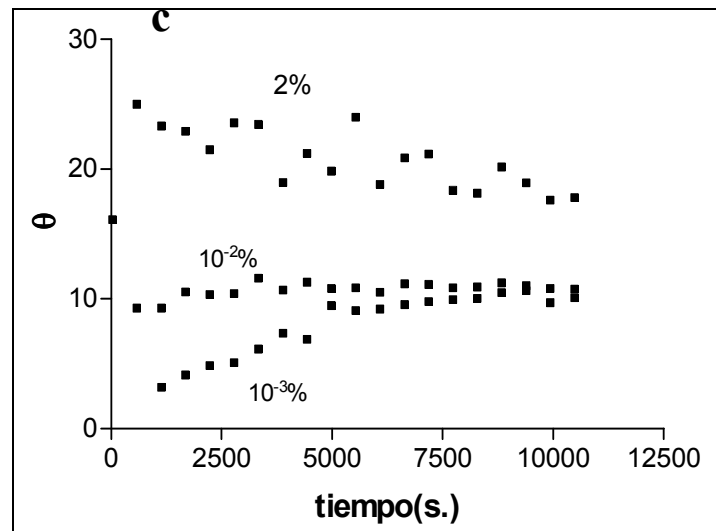
Se observa que los valores del módulo dilatacional (E) fueron muy similares a las componentes elásticas (Ed) respectivas. Esto indica que las películas interfaciales presentan un comportamiento eminentemente elástico generado por la adsorción de las proteínas que por su alta concentración interfacial generan una estructura interfacial gelificada. Aún a concentraciones muy bajas en la subfase, la concentración interfacial de polímero es mucho más alta que en la subfase, por ende posibilitaría la gelificación proteica (Tung y col., 1982).

El módulo dilatacional para SP, H1 y H2 presentó un comportamiento definido en relación con la concentración proteica de subfase. Los mayores valores de E y Ed correspondieron a las menores concentraciones de subfase (a excepción de H2 el cual presentó una inversión en las menores concentraciones). El carácter sólido de las películas interfaciales está determinado por el grado de empaquetamiento de las proteínas en la interfase y por el grado de interacción molecular entre las proteínas adsorbidas. También para polisacáridos tensioactivos (HPMC) se encontró un mayor Ed cuando la monocapa se encontraba en estado “expandido” es decir, con bajo grado de compactación entre las moléculas y al aumentar la concentración se observó una disminución del Ed, lo cual coincide con la rigidización de la monocapa y colapso de la misma. Esto implica una pérdida de elasticidad por formación de “multicapas” de proteínas (Wollenweber, 2000; Pérez y col., 2006). Esto ha sido observado en las fracciones 7S y 11S a largos tiempos de adsorción mediante análisis de la topografía y reflectividad de las películas adsorbidas, detectadas a través del grosor de las películas (Rodríguez Patino y col., 2003a). En el presente trabajo la posible formación de multicapas se observa claramente a una concentración de proteína en la subfase del 2% ya que se corresponde con un estado de colapso de las proteínas de soja. Por otro lado, la disminución del módulo dilatacional y su componente elástica a largos tiempos de adsorción para SP a 10<sup>-2</sup>%, se asocia con la disminución de interacciones proteína-proteína (Figura 19 a-b) al pasar ésta de una conformación expandida (estructura I) a una más condensada (estructura II) a esta concentración de subfase (Figura 13).

En la Figura 22 a-c se muestra la evolución de la viscoelasticidad relativa representada por el ángulo de desfase ( $\theta$ ) en función del tiempo de adsorción para SP, H1 y H2 en las mismas concentraciones estudiadas (10<sup>-3</sup>, 10<sup>-2</sup> y 2%). La concentración de proteína en la

subfase tiene un efecto en la viscoelasticidad relativa similar al observado en el módulo E o Ed; es decir, las películas más viscoelásticas se obtuvieron a la menor concentración de proteína en la subfase ( $10^{-3}\%$ ).





**Figura 22:** Evolución del ángulo de desfase ( $\theta$ ) para (a) SP, (b) H1 y (c) H2, en función del tiempo de adsorción a tres concentraciones de subfase:  $10^{-3}\%$ ,  $10^{-2}\%$  y  $2\%$ .

La evolución en el tiempo de las propiedades dilatacionales es consistente con la existencia de interacciones proteína-proteína, que llevan a la formación de un gel interfacial. El empaquetamiento de las proteínas de soja aumenta con el tiempo de adsorción (Rodríguez Patino y col., 2003; Rodríguez Patino y col., 2004) y es consecuencia de rearrreglos de moléculas previamente adsorbidas como se refleja en el aumento del módulo dilatacional,  $E$  (Figuras 19 a, 20 a y 21 a) lo cual se relaciona con la formación de una película gelificada y se refleja en la disminución del ángulo de desfase a largos tiempos de adsorción es decir, en el aumento de la viscoelasticidad relativa de las películas formadas (Figura 22 a-c).

La Figura 23 a-c muestra las componentes elástica ( $E_d$ ), viscosa ( $E_v$ ) del módulo dilatacional ( $E$ ) y el ángulo de desfase ( $\theta$ ) a largos tiempos de adsorción (10.000 seg.) correspondientes a las tres muestras estudiadas en función de la concentración de proteína soluble en la subfase.

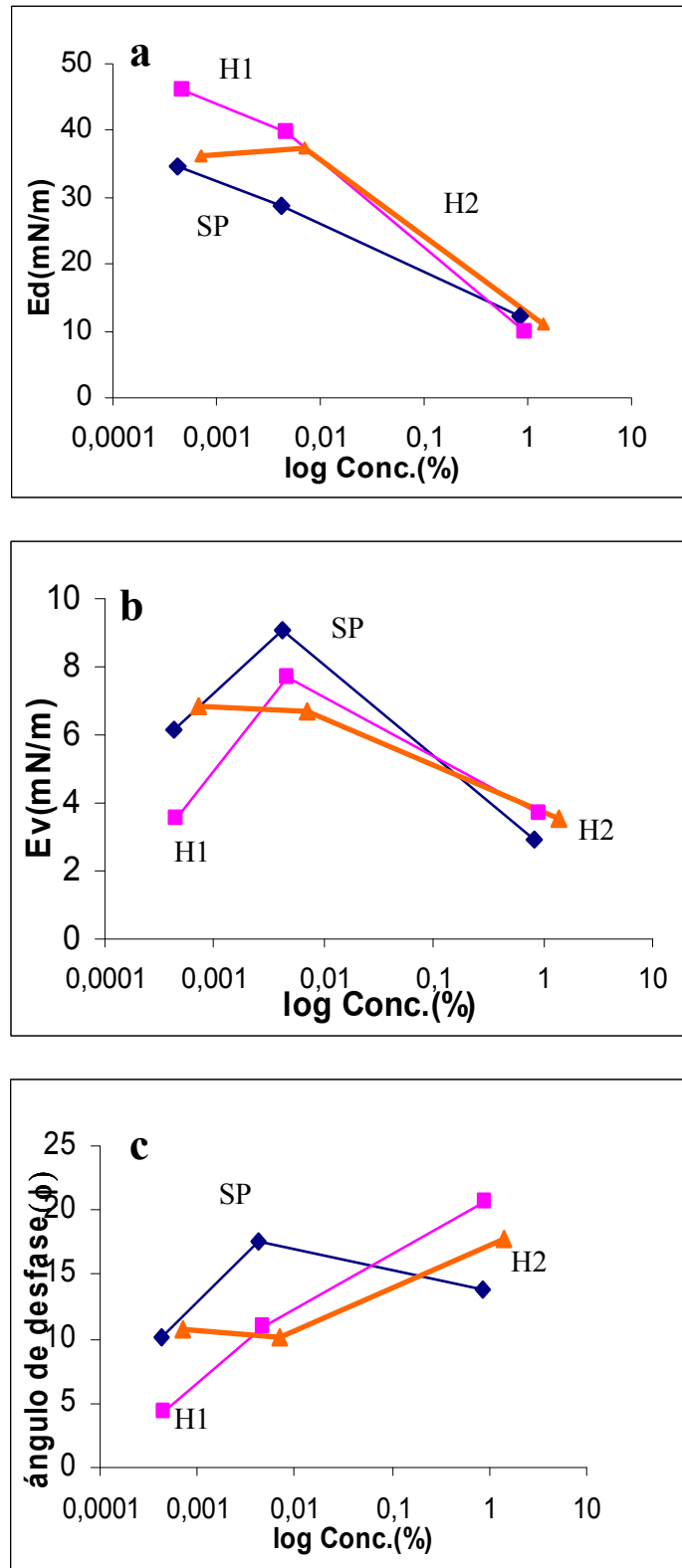


Figura 23: Parámetros reológicos dilatacionales a los 10.000 s. de adsorción para SP, H1 y H2 en función de la concentración. (a) Componente elástica ( $E_d$ ); (b) componente viscosa ( $E_v$ ) y (c) ángulo de desfase ( $\theta$ ).

La Figura 23 a muestra que a menores concentraciones que la concentración de colapso de la monocapa (alrededor del 2% de concentración de subfase para SP), la hidrólisis de la proteína de soja mejoró notablemente la elasticidad dilatacional de las películas. La elasticidad y viscosidad dilatacional (Figura 23 b) a la mayor concentración no mostró grandes diferencias con respecto a la estructura proteica. De igual forma, la hidrólisis aumentó la viscoelasticidad relativa de las películas (Figura 23 c) a concentraciones menores al 2%, reflejado en la disminución del ángulo de desfase a medida que aumenta el grado de hidrólisis. Sin embargo a concentraciones de 2%, se aprecia un ligero aumento de la viscoelasticidad relativa para SP con respecto a los hidrolizados debido posiblemente al colapso de la monocapa de SP a esta concentración de subfase. Queda en evidencia de esta forma que las diferencias estructurales hacen a un comportamiento distinto respecto a la formación de películas interfaciales producidas por muestras proteicas dependiendo de la concentración estudiada.

En resumen, los beneficios de la hidrólisis enzimática (elevada elasticidad superficial y viscoelasticidad relativa en las películas formadas) se aprecian a bajas concentraciones ( $10^{-2}$  y  $10^{-3}\%$ ) y preferentemente sobre el menor nivel de hidrólisis estudiado en este trabajo.

#### ***1.4 Relación entre propiedades de espumado e interfaciales de la proteína de soja e hidrolizados***

La mayoría de los estudios en espumas estabilizadas por proteínas se han focalizado o en las propiedades de espumado o en la reología superficial y sólo muy pocas publicaciones han tratado de relacionar la reología interfacial con la estabilidad de las espumas. Murray (2002) revisó un pequeño número de trabajos teóricos y experimentales que han intentado relacionar la reología interfacial con varios aspectos de la estabilidad de las espumas.

En la Tabla 3 se relacionaron las propiedades de espumado, mediante el método de batido (CE; estabilidad al drenado y colapso de las espumas) de SP e hidrolizados H1 y H2 al 2% de concentración con la viscosidad aparente de las espumas y las propiedades dinámicas y reológicas de las películas.

	CE (%)	$K_{dren}$ (ml.min) <sup>-1</sup>	t.col 10ml (min)	Viscosidad de la espuma (Cp)	Viscoelasticidad relativa ( $\theta$ )	$K_{ads}$ (mN/m.min) <sup>-1</sup>
SP	111	0,0250	150	2916	13,91	$5,3 \cdot 10^{-2}$
H1	193	0,012385	30	63736	20,66	$7,1 \cdot 10^{-2}$
H2	170	0,007750	37	55769	17,84	$4,6 \cdot 10^{-2}$

Tabla 3: Propiedades de espumado (método de batido), viscosidad aparente inicial de las espumas, ángulo de desfase de las películas interfaciales (10.000 seg. de adsorción) y velocidad global de adsorción de las muestras proteicas a una concentración del 2%.

La hidrólisis de la proteína de soja produjo espumas de mayor CE, promovió la disminución de drenado de líquido ( $K_{dren}$ ), pero disminuyó el tiempo de colapso de las espumas (t.col10ml). El aumento de la CE puede relacionarse con el aumento del carácter tensioactivo ( $\pi$  equilibrio) con la hidrólisis observado en la isoterma  $\pi$ -C (Figura 13) a concentraciones de subfase mayores a 10<sup>-2</sup>%. En esas concentraciones en la subfase se observó que el carácter tensioactivo estaba en el orden H1 > H2 > SP. Otros autores han encontrado que una mayor presión superficial no implica una mayor CE (Kitabatake y col.,1988; Martin y col., 2002) siendo el factor de importancia la velocidad a la cual es aumentada  $\pi$ , es decir, la velocidad de adsorción global. Los valores de dicha velocidad ( $K_{ads}$ ) que se muestran en la Tabla 3, indican que el aumento de la  $K_{ads}$  entre SP y H1 puede explicar el aumento de la CE, sin embargo de acuerdo al valor de  $K_{ads}$  para H2 se debería esperar una CE para H2 menor o igual que la correspondiente a SP. Posiblemente, en los estudios mencionados, debido a que se estudiaban proteínas de diferente origen, las diferencias entre las velocidades de adsorción son mucho mayores que en este estudio y por lo tanto muestran una mejor correlación con la CE.

Se observa en la Tabla 3 que existe también una correlación positiva entre la CE y la viscosidad aparente ( $R^2 = 0,975$ ). La viscosidad aparente de las espumas ha sido relacionada en forma inversa con la fracción de volumen de líquido (Nutt y col., 1989; Britten y col, 1992). Al aumentar la película de líquido entre las burbujas aumenta la fluidez de la espuma lo cual se traduce en una disminución de la viscosidad de la espuma.

En el método de batido, el volumen de líquido inicial fue totalmente incorporado a las espumas; por lo tanto cuanto mayor fue la incorporación de aire (mayor volumen de espuma o CE) menor será la fracción de volumen líquido en la espuma y mayor será la viscosidad aparente de la misma.

Se observa que el  $K_{\text{dren}}$  presentó una correlación positiva ( $R^2=0,860$ ) con la viscosidad aparente de las espumas. La correlación muestra que el aumento de la viscosidad aparente de las espumas implica una disminución de la velocidad de drenado de líquido, concordando con el hecho de que las espumas con una mayor viscosidad, poseen una menor fracción de líquido (Nutt y col., 1989; Britten y col, 1992) y por tal motivo la velocidad de drenado es menor.

Por otra parte, la disminución del tiempo de colapso de las espumas tuvo correlación con la disminución de la viscoelasticidad relativa de las películas proteicas ( $R^2=0,862$ ). El colapso de la espuma implica la ruptura de la película interfacial, por lo tanto es razonable que las propiedades mecánicas de la película tengan influencia en la velocidad de colapso. Baeza y col., (2005b) encontraron que la elasticidad dilatacional de las películas de  $\beta$ -lactoglobulina y sus mezclas con diferentes polisacáridos presentaba una alta correlación con el tiempo de colapso de las espumas. Kloek y col., (2001) han señalado que la relación entre el módulo viscoso y el módulo elástico (viscoelasticidad relativa,  $\theta$ ) es adecuado como criterio de estabilidad.

Ipsen y col., (2001) también encontraron que una hidrólisis limitada de  $\beta$ -lactoglobulina permite generar espumas con mayor volumen pero no mejora las propiedades viscoelásticas de la película interfacial.

Por ello, el GH que se debe lograr en la proteína de soja debe ser muy pequeño a fin de mejorar su CE sin perder la propiedad de gelificación interfacial necesarias para formar películas muy viscoelásticas.

### *Conclusiones*

*La hidrólisis de la proteína de soja produjo un aumento del carácter tensioactivo ( $\pi$  equilibrio, observado en la isoterma  $\pi$ -C) a concentraciones de subfase mayores a  $10^{-2}\%$ , es decir a concentraciones de subfase donde SP adopta una conformación más condensada en la monocapa (estructura II). En esas concentraciones en la subfase se*



observó que el carácter tensioactivo estaba en el orden  $H1 > H2 > SP$ . Este comportamiento puede ser atribuido a la flexibilidad molecular que adquieren las proteínas al ser hidrolizadas y al menor tamaño de las mismas que permite un mayor empaquetamiento en la interfase sin que ocurran cambios estructurales (transición de estructura I a II).

A concentraciones bajas en la subfase en las cuales SP adopta una estructura expandida en la monocapa (estructura I), un bajo grado de hidrólisis (H1) también produjo un aumento del carácter tensioactivo. Sin embargo un mayor GH (H2) redujo la actividad superficial con respecto a H1 y SP a concentraciones menores a  $10^{-2}\%$ . Además H2 presentó una menor actividad superficial que H1 a toda concentración de subfase.

La hidrólisis de la proteína de soja también mejoró notablemente la elasticidad dilatacional y la viscoelasticidad relativa de las películas a concentraciones menores al 2%, es decir a menores concentraciones que la concentración de colapso de la monocapa para SP.

Estos resultados indican que un bajo grado de hidrólisis (2%) sería suficiente a fin de mejorar la actividad superficial de la proteína de soja y generar películas interfaciales con alta viscoelasticidad.

La correlación entre las propiedades superficiales y las propiedades de las espumas, analizado a una concentración del 2 %, corroboró que efectivamente el GH que se debe lograr en la proteína de soja debe ser muy pequeño a fin de mejorar su CE sin perder las propiedades de gelificación interfacial necesarias para formar películas muy viscoelásticas que presenten una alta estabilidad al drenado de líquido y al colapso.

En efecto, la hidrólisis de la proteína de soja produjo espumas de mayor CE y promovió la disminución del drenado de líquido. Sin embargo la hidrólisis promovió el colapso de las espumas, debido a la disminución de la viscoelasticidad relativa de las películas interfaciales.

En conclusión, para obtener una espuma con óptimas propiedades, es importante que la proteína produzca un gran aumento de la presión superficial y que se adsorba rápidamente. Para mantener la espuma estable en el tiempo se requiere la presencia de una interfase muy viscoelástica y de una alta viscosidad en el seno de la espuma.

Las características moleculares requeridas para lograr una alta CE y películas muy viscoelásticas son en general opuestas ya que la primera requiere de una proteína pequeña y flexible, mientras que la formación de una película interfacial muy viscoelástica

*requiere de una proteína de mayor tamaño molecular, capaz de estructurarse en la interfase mediante enlaces covalentes o hidrofóbicos.*

*El hecho de que el grado de hidrólisis óptimo para la mejora de las propiedades de espumado sea muy pequeño refleja justamente este balance de las propiedades moleculares de la proteína.*

## ***Capítulo II***

*Efecto de la hidrólisis enzimática de la proteína de soja en la interacción con polisacáridos en espumas e interfases.*

### II.1 Interacción entre la proteína de soja y polisacáridos en espumas

Se estudiaron las propiedades de espumado mediante el método de batido (apartado 3.2, de Materiales y Métodos) de las mezclas de proteína-polisacárido, a una concentración de 2%/0,25% p/v respectivamente. Los polisacáridos (PS) utilizados fueron: goma xántica (X), lambda y kappa carragenanos ( $\lambda$ C y  $\kappa$ C), goma guar (G), goma garrofín (GG), y los polisacáridos con tensioactividad (HPMC): E4M; F4M y E50lv. Estos tres tipos de HPMC difieren en el porcentaje de grupos metilo, hidroxipropilo, la relación entre metilo/hidroxipropilo, como también en viscosidad. El porcentaje de metilos es 25, 29,2 y 25% para E4M, F4M y E50lv respectivamente, el de hidroxipropilo de 10, 6 y 10%; la relación metilos/hidroxipropilo es de 2,8, 4,9 y 2,8 y la viscosidad al 1% p/p y 25°C es de  $126 \pm 1$ ,  $2 \pm 0,1$  y  $6 \pm 0,1$  Cp en el mismo orden (Pérez y col.,2006).

La fracción insoluble (correspondiente a los agregados proteicos) de las muestras fue también incorporada a la espuma tras el proceso de batido.

La Tabla 1 muestra el efecto del agregado de los polisacáridos en la CE de la proteína de soja.

Muestra	CE(%)
SP	110
SP/X	107
SP/ $\lambda$ C	62
SP/ $\kappa$ C	167
SP/G	73
SP/GG	133
SP/E4M	153
SP/F4M	160
SP/E50lv	147

Tabla 1: Capacidad de espumado (CE%) de mezclas de SP y polisacáridos (concentración SP/PS 2%/0,25%).

Los polisacáridos no tensioactivos no presentaron capacidad de producir espumas por sí solos, mientras que las HPMCs presentaron una CE de 130% aproximadamente.

Los polisacáridos  $\kappa$ C, GG y los tres HPMCs aumentaron significativamente la CE de la proteína de soja. El efecto positivo de las HPMC estaría vinculado a su carácter tensioactivo, por lo cual podrían contribuir junto con SP a la formación de la espuma. Reportes anteriores indican que la adición de  $\kappa$ C al 0,5% de concentración sobre la proteína de soja nativa, desnaturalizada por calor y sobre la  $\beta$ -lactoglobulina al 2% de

concentración redujo la CE, debido al aumento de la viscosidad provocada por el polisacárido (Carp y col.,2004). Esto indica la importancia de la concentración del polisacárido y/o la relación proteína / polisacárido.

El agregado de X no modificó la CE, mientras que en presencia de G y  $\lambda$ C disminuyó apreciablemente.

Ha sido reportado previamente que el efecto del agregado de X depende de la relación SP/X (Xie y col., 1998). Estos autores encontraron que el agregado de X a la proteína de soja no modificó la CE cuando las relaciones SP/X fueron 10/1; 5/1 y 3/1, sin embargo la CE comenzó a aumentar a partir de las relaciones 1/1; 1/2 y 1/3 con un máximo en 1/2 siendo más alta que la CE de la clara de huevo. Al aumentar aún más la concentración de X tal como la relación 1/5 la CE comenzó a decrecer.

Muchos estudios indican que la solubilidad de la proteína es un pre-requisito para obtener alta CE (Halling,1981; Cheftel, y col., 1985). Correlaciones hechas entre la solubilidad y la CE indicaron que la adición de X produce un incremento de la solubilidad de la proteína, contribuyendo al aumento de la CE (Xie y col.,1998).

Otros estudios mediante el método de burbujeo mostraron que la adición de X en concentraciones crecientes (desde 0,025 hasta 0,05%) a la proteína de soja (0,5 y 2%) producía aumento de la CE, independientemente del estado de la proteína (nativa o desnaturalizada por calor) mientras que mayores cantidades del polisacárido (0,1%) promovía un descenso de la CE producto del aumento de la viscosidad de la fase continua, la cual impediría la incorporación de aire (Carp y col.,2001). Sin embargo, las mismas mezclas producidas por el método de batido presentaron una disminución de la CE con menores cantidades de X (0,025%) en el caso de proteínas a 2% de concentración, siendo siempre mayor la CE en las demás concentraciones proteicas estudiadas. La diferencia en los resultados en este caso, estarían relacionadas al método de producción de espumas.

Igualmente importante es considerar el tipo de proteína y polisacáridos utilizados. Por ejemplo, Tsaliki y col., (2002) encontraron que la CE de un aislado de proteína de semilla de algodón producida por batido a pH 7 aumentaba un 30% al agregar X en relación 10/1. Los mismos autores encontraron que agregando X o GG sobre un aislado de proteína extraída de una subespecie de poroto (*Phaseolus vulgaris L.*) en relación 10/1 y con la misma técnica y condiciones que en el caso de la proteína de semilla de algodón, la CE aumentó un 30% con ambos polisacáridos, mientras que si la relación era de 20/1 el

aumento de la CE era mucho mayor con el agregado de X comparado a GG. Pero si la relación era de 4/1 el agregado de GG producía un apreciable aumento de la CE, mientras que X no promovía cambios. Con otra proteína de otra subespecie de poroto (*Phaseolus coccineus L.*), el agregado de los mismos polisacáridos en las mismas relaciones produjo espumas con diferentes resultados respecto a la CE, comparado con la proteína de *Ph. Vulgaris L.* El agregado de GG en relación 10/1 no produjo cambios; mientras que la X aumentó la CE de las espumas en un 10%. Si la relación era de 20/1, GG aumentaba la CE en un 10%, mientras que la X lo hacía en un 20%.

Martínez y col., (2005) estudiaron la CE de proteína de girasol al 3% de concentración, por el método de batido en presencia de polisacáridos (X,  $\lambda$ C,  $\kappa$ C, G, y GG) al 0,25 % de concentración. Si bien la relación proteína/polisacárido fue alta, (12/1) comparada con los anteriores estudios, se observó que en casi todos los casos (a excepción del agregado de GG, que mantiene igual la CE), el agregado de los polisacáridos produjo una clara disminución de la CE.

Todos los resultados discutidos indican que el efecto del agregado de PS en espumas proteicas es fuertemente dependiente del método para la producción de la espuma, tipo de proteínas y polisacáridos utilizados, y de la relación proteína/ polisacárido.

La Tabla 2 muestra la velocidad de drenado de líquido de las espumas de SP en presencia de los diferentes polisacáridos.

Muestra	$K_{dren}(\text{ml.min})^{-1}$
SP	$1,8.10^{-2}$
SP/X	$1,8.10^{-2}$
SP/ $\lambda$ C	$2,3.10^{-3}$
SP/ $\kappa$ C	$2,5.10^{-3}$
SP/G	$6,0.10^{-2}$
SP/GG	$4,2.10^{-3}$
SP/E4M	$5,0.10^{-3}$
SP/F4M	$3,0.10^{-3}$
SP/E50lv	$4,3.10^{-3}$

**Tabla 2:** Velocidad de drenado de líquido ( $K_{dren}$ ), de espumas de SP y polisacáridos (concentración SP/PS 2%/0,25% p/v).

El agregado de X no modificó la velocidad de drenado de líquido, mientras que el agregado de G la aumentó. El agregado de los demás polisacáridos, mejoró notablemente la estabilidad al drenado de líquido de las espumas, como se evidencia en la disminución

del  $K_{dren}$  en un orden de magnitud. El efecto del agregado de X a SP sobre la estabilidad de la espuma fue estudiado por Xie y col (1998) a diferentes relaciones SP/ X. Se encontró que las relaciones 10/1; 5/1; 3/1 y 1/1 presentaron el mismo patrón de estabilidad que la proteína sola, lo cual concuerda con lo observado en este trabajo donde la relación fue 8/1. Sin embargo, las relaciones 1/2 y 1/3 presentaron una estabilidad 9 veces mayor que SP, mientras que con relaciones mayores a 1/5 la estabilidad vuelve a reducirse. Se ha relacionado la estabilidad con la viscosidad de la fase continua. Se encontró que el abrupto incremento en la estabilidad entre la relación 1/1 y 1/2 se correspondió con un aumento de la viscosidad desde 50 a 250 Cp.

El tipo de proteína también es un factor determinante en la estabilidad de espumas mixtas. Tsaliki y col., (2002) observaron que la adición de X a un aislado de proteína de semilla de algodón en relación 10/1 a pH 7, promovió un marcado aumento de la estabilidad (50%) en espumas generadas por el método de batido a temperatura ambiente. Los mismos autores observaron que el agregado de GG y X sobre proteínas aisladas de 2 subespecies de un poroto (*Phaseolus vulgaris L.* y *Phaseolus coccineus L.*) en todas las relaciones estudiadas, produjo un aumento apreciable de la estabilidad de las espumas.

Resultados similares se han obtenido con el agregado de polisacáridos (X,  $\lambda$ C,  $\kappa$ C, G, y GG) sobre proteína de girasol (Martínez y col.,2005). Se observó que en la mayoría de los casos (a excepción de la adición de GG, la cual incrementa el  $K_{dren}$ ) el agregado de los mismos estabiliza las espumas provocando una reducción (muy significativa con la X) del  $K_{dren}$ .

Se analizaron como índices del colapso de las espumas el tiempo que tarda la columna de la espuma en comenzar a descender ( $t_{lag}$ ) y el tiempo requerido para que la altura inicial de la espuma descienda 10 ml ( $t_{col.10ml}$ ).

La Tabla 3 muestra dichos parámetros que describen la estabilidad al colapso para las mezclas de SP y los diferentes polisacáridos.

<b>Muestra</b>	<b>t.lag(min)</b>	<b>t.col<sub>10ml</sub>(min)</b>
<b>SP</b>	89	150
<b>SP/X</b>	1000	1140
<b>SP/<math>\lambda</math>C</b>	>5hs	>5hs
<b>SP/<math>\kappa</math>C</b>	49	131
<b>SP/G</b>	10,75	298
<b>SP/GG</b>	100	151
<b>SP/E4M</b>	60	76
<b>SP/F4M</b>	26	36,13
<b>SP/E50lv</b>	21	40

Tabla 3: Parámetros que describen el colapso de espumas de SP y polisacáridos (concentración SP/PS 2%/0,25%).

En presencia de  $\lambda$ C no se observó colapso de la espuma en el tiempo estudiado (5 hs), por lo tanto esta situación se indica en la Tabla 3 como mayor a 5 hs.

También la X produjo espumas de gran estabilidad, ya que los índices de colapso aumentaron entre 1 y 2 órdenes de magnitud con respecto a los de la espuma de SP. Resultados similares se han obtenido adicionando X a SP y SP desnaturalizada térmicamente (Carp y col., 2001). Se observó que agregando X desde 0,025 hasta 0,1% de concentración a dichas proteínas (2%), el tiempo transcurrido para el comienzo de colapso de las espumas aumentó desde 38 minutos en SP sola (nativa o desnaturalizada) hasta 110 minutos con la mayor concentración de X.

$\kappa$ C produjo una disminución apreciable en el t.lag para colapso pero con un t.col<sub>10 ml</sub> similar a la espuma de SP sola. G curiosamente produjo espumas con un rápido comienzo del colapso, pero a su vez con gran estabilidad al colapso posteriormente. Las HPMCs produjeron una gran disminución del tiempo lag y t.colapso, lo cual indica una reducción en la estabilidad de la espuma. GG no produjo modificación en el colapso de las espumas. Se han obtenido resultados ligeramente diferentes agregando estos polisacáridos (X,  $\lambda$ C,  $\kappa$ C, G, y GG) sobre la proteína de girasol (Martínez y col., 2005). En este caso, todos los polisacáridos provocaron una evidente disminución de la velocidad de colapso de las espumas, es decir las estabilizaron frente al colapso, destacándose X por hacerlo en mayor grado.



Desde el punto de vista práctico sería ideal adicionar un polisacárido que aumentara simultáneamente la CE y la estabilidad de la espuma al drenado de líquido y colapso. En las concentraciones estudiadas ningún polisacárido cumplió con todas las condiciones.

Los polisacáridos que mejoraron la CE ( $\kappa$ C, GG, E4M, E4M, E50lv) también mejoraron la estabilidad de las espumas al drenado de líquido, sin embargo estas espumas colapsaron más rápidamente (caso de HPMCs), o no se produjeron cambios en el colapso ( $\kappa$ C, GG).

El agregado de  $\lambda$ C provocó una gran disminución del volumen de la espuma (CE). Sin embargo esta espuma fue más estable al drenado de líquido y no colapsó durante el estudio (5 hs).

El agregado de X si bien no mejoró la CE ni el drenado, produjo un retardo muy importante en el colapso de la espuma.

El agregado de G resultó perjudicial tanto para la CE como para el drenado de líquido, pero disminuyó el colapso de la espuma.

## ***II.2 Efecto de la hidrólisis enzimática de la proteína de soja en la interacción con polisacáridos en espumas***

Se seleccionaron tres hidrolizados para formular espumas en presencia de polisacáridos. Estos tuvieron los siguientes grados de hidrólisis: 0,4; 5 y 5,75%.

La Tabla 4 muestra los resultados correspondientes a la CE (%) para las mezclas estudiadas de cada hidrolizado con cada PS.

<b>PS/GH(%)</b>	<b>0,4</b>	<b>5</b>	<b>5,75</b>
<b>Hidrolizado</b>	231	206	190
<b>X</b>	100	100	113
<b><math>\lambda</math>C</b>	133	120	133
<b><math>\kappa</math>C</b>	133	220	180
<b>G</b>	100	120	231
<b>GG</b>	133	167	180
<b>E4M</b>	187	193	233
<b>F4M</b>	200	260	200
<b>E50lv</b>	247	233	207

**Tabla 4:** Capacidad de espumado (CE%) de mezclas de hidrolizados y polisacáridos (concentración hidrolizado/PS: 2%/0,25%).

Se aprecia una tendencia general independientemente del hidrolizado: el agregado de HPMCs genera espumas con igual CE o mayor al de los hidrolizados solos. Mientras que la mezcla de los hidrolizados con los demás polisacáridos produjo una disminución de la CE. La X es el polisacárido que produjo un mayor descenso de la CE al agregarse a los hidrolizados. El efecto positivo de las HPMCs estaría vinculado a su carácter tensioactivo, por lo cual podrían contribuir junto a la proteína a la formación de la espuma.

Sin embargo, el efecto del agregado de los PS dependió en muchos casos del hidrolizado en particular al cual se adicionó. El agregado de  $\kappa$ C al hidrolizado de GH= 0,4% produjo una gran disminución en CE, sin embargo el agregado de  $\kappa$ C a los hidrolizados de GH= 5 y 5,75% resultó en un aumento o mantenimiento de la CE. G y GG disminuyeron la CE cuando se agregaron a los hidrolizados de GH= 0,4 y 5%, mientras que en presencia del hidrolizado de GH= 5,75%, la CE se mantuvo constante o aumentó.

Efectos similares y complejos se han observado en la interacción de PS e hidrolizados de proteína de girasol (Martínez y col.,2005). La CE aumentó por efecto de la hidrólisis (GH= 1,5 y 9,8%). En este caso, el agregado de GG produjo una mayor CE sobre el hidrolizado de GH=1,5%, mientras que la adición de X,  $\lambda$ C,  $\kappa$ C y G mantuvo en valores semejantes la CE de las espumas preparadas con el hidrolizado de GH 15% y redujo marcadamente a las preparadas con el hidrolizado de GH=9,8%. Por lo tanto, a diferencia de los resultados observados en este trabajo, la CE fue siempre mayor (independientemente del PS adicionado) en el menor GH (1,5%).

La Tabla 5 muestra la velocidad de drenado de líquido ( $K_{dren}$ ) de las espumas preparadas a partir de los hidrolizados y la mezcla con los PS.

PS/GH(%)	0,4	5	5,75
<b>Hidrolizado</b>	$6,65 \cdot 10^{-3}$	$6,93 \cdot 10^{-3}$	$1,20 \cdot 10^{-2}$
<b>X</b>	$1,25 \cdot 10^{-4}$	$5,20 \cdot 10^{-5}$	$9,90 \cdot 10^{-5}$
<b><math>\lambda</math>C</b>	$2,93 \cdot 10^{-3}$	$2,90 \cdot 10^{-3}$	$3,30 \cdot 10^{-3}$
<b><math>\kappa</math>C</b>	$1,93 \cdot 10^{-3}$	$1,66 \cdot 10^{-3}$	$4,90 \cdot 10^{-3}$
<b>G</b>	$1,80 \cdot 10^{-3}$	$3,50 \cdot 10^{-3}$	$2,00 \cdot 10^{-3}$
<b>GG</b>	$2,20 \cdot 10^{-2}$	$2,37 \cdot 10^{-3}$	$4,00 \cdot 10^{-3}$
<b>E4M</b>	$6,13 \cdot 10^{-3}$	$8,40 \cdot 10^{-3}$	$8,30 \cdot 10^{-3}$
<b>F4M</b>	$3,00 \cdot 10^{-3}$	$2,32 \cdot 10^{-3}$	$8,40 \cdot 10^{-3}$
<b>E50lv</b>	$3,50 \cdot 10^{-3}$	$4,00 \cdot 10^{-3}$	$3,84 \cdot 10^{-3}$

Tabla 5: Velocidad de drenado de líquido ( $K_{dren}$ ) de espumas de hidrolizados y polisacáridos (concentración hidrolizado/PS: 2%/0,25%).

Independientemente del hidrolizado estudiado se aprecia que en general el agregado de polisacáridos produjo una disminución del drenado de líquido. X es quien produjo el mayor efecto estabilizante, mientras que las HPMCs son los que modificaron en menor grado esta propiedad. El único polisacárido que aumentó significativamente la velocidad de drenado de líquido fue GG, sólo cuando se agregó al hidrolizado de GH= 0,4%.

El grado de hidrólisis de la proteína presentó un impacto significativo en la velocidad de drenado de las espumas en presencia de PS. En general el efecto estabilizador fue mayor cuando los polisacáridos se adicionaron al hidrolizado con mayor GH (5,75%), el cual por si solo presentó un  $K_{dren}$  mucho mayor que los hidrolizados con GH= 0,4 y 5%.

En el caso de X, que fue el PS que más estabilizó las espumas al drenado de líquido, se observó que su efecto estabilizante fue mayor a medida que aumentó el GH de la proteína, mientras que no había modificado el drenado de la espuma con SP (Tabla 2).

Los PS  $\lambda$ C,  $\kappa$ C, GG y HPMCs presentaron un mayor poder estabilizador en presencia de SP que con los hidrolizados.

Sin embargo, se encontró un efecto contrario sobre proteína de girasol hidrolizada en presencia de los polisacáridos X,  $\lambda$ C,  $\kappa$ C, G, GG ya que los PS incrementaron la velocidad de drenado de los hidrolizados lo cual implicó un efecto desestabilizador, mientras que disminuyeron el drenado cuando se adicionaron a la proteína de girasol sin hidrolizar (Martínez y col.,2005).

La Tabla 6 muestra el tiempo que tarda en comenzar a descender la altura de la espuma (colapso) ( $t_{lag}$ ) y el tiempo que transcurre para que el volumen de la espuma descienda en 10 ml ( $t_{col.10ml}$ ) para las mezclas de los hidrolizados y polisacáridos estudiados.

PS/GH(%)	0,4		5		5,75	
	t.lag (min)	t.col.10ml (min)	t.lag (min)	t.col.10ml (min)	t.lag (min)	t.col.10ml (min)
<b>Hidrolizados</b>	19	45,6	11,5	34	12,5	37,5
<b>X</b>	375	980	>5 hs	>5 hs	>5 hs	>5 hs
<b>λC</b>	77	107	50	177	52,5	63
<b>κC</b>	35,6	46,4	75	88	52,5	64
<b>G</b>	70	80	100	100	67,5	73
<b>GG</b>	13	29,4	100	150	50	60
<b>E4M</b>	21	25	15	20	22,5	33,5
<b>F4M</b>	10	15,5	5	10	7,5	11,8
<b>E50lv</b>	25	28	15	19,4	12	18,5

Tabla 6: Parámetros que describen el colapso de espumas de hidrolizados y polisacáridos (concentración hidrolizado/PS: 2%/0,25%).

Salvo los HPMCs y GG (sobre el hidrolizado con GH= 0,4%), los demás polisacáridos aumentaron muy significativamente la estabilidad al colapso de las espumas. X es quien se destacó por su gran poder estabilizante ya que no produjo cambios en la altura de la espuma en el tiempo estudiado (5 hs) sobre los hidrolizados con GH= 5 y 5,35%.

El agregado de HPMC produjo un aumento en el colapso de las espumas que dependió del hidrolizado utilizado y del tipo de HPMC en la mezcla. La HPMC denominada F4M fue la que mostró un efecto más perjudicial.

El grado de hidrólisis influyó sobre el  $t_{col.10ml}$  de las espumas en presencia de los PS estabilizantes. Se observó un máximo efecto estabilizador al colapso para un GH de 5%.

Comparando el efecto estabilizador de los PS sobre el colapso de las espumas de SP (Tabla 3) e hidrolizados (Tabla 6) se observa que, mientras X fue el PS que estabilizó totalmente el colapso de las espumas de los hidrolizados, el λC fue quien produjo esta estabilización en la espuma de SP. Sin embargo GG y HPMC presentaron un efecto desestabilizador en el colapso de espumas de proteína hidrolizada y no hidrolizada (SP).

Se ha observado sobre hidrolizados de proteína de girasol un efecto opuesto (Martínez y col., 2005). El efecto de la hidrólisis de dicha proteína (GH= 1,5 y 9,8%) determinó una disminución del tiempo lag al colapso de las espumas cuando los PS agregados a los hidrolizados fueron λC, κC, G y GG. Sin embargo X mostró mantener constante el t. lag

de colapso en el caso de las espumas preparadas con del hidrolizado de GH=1,5 % y aumentarlo en el caso de las preparadas con el hidrolizado de GH= 9,8%.

Ningún polisacárido al ser agregado al hidrolizado de GH= 0,4% produjo espumas con mayor CE y mejor estabilidad al drenado de líquido y colapso. El agregado de X,  $\lambda$ C,  $\kappa$ C y G reducen la CE de la espumas aunque mejoran la estabilidad al drenado de líquido y al colapso. Los HPMCs no produjeron cambios en la CE (a excepción de E50lv que la incrementa) pero promovieron un aumento del colapso y mejoraron o mantuvieron una constante estabilidad al drenado de líquido. El agregado de GG resultó perjudicial tanto en la CE como en la estabilidad al drenado de líquido y colapso de las espumas.

En el caso del hidrolizado con GH= 5% tampoco se encontró un polisacárido que mejorara las tres características de la espuma estudiadas. El agregado de X,  $\lambda$ C, G y GG redujo la CE pero incrementó notablemente la estabilidad al drenado de líquido y al colapso de las espumas, destacándose la X, por no producir colapso durante las 5 hs de estudio. Las HPMCs produjeron un leve incremento en la CE (más con el agregado de F4M), en la estabilidad al drenado de líquido (a excepción de E4M que no influyó en dicha característica) pero al mismo tiempo produjo un aumento del colapso de la espuma, siendo muy significativo cuando el polisacárido adicionado fue F4M.

Sobre el hidrolizado de GH= 5,75%, el agregado de X,  $\lambda$ C,  $\kappa$ C, G y GG produjo una disminución (caso de X y  $\lambda$ C), aumento (caso de G) o no mostró cambios sobre la CE de las espumas. Pero todos aumentaron notablemente la estabilidad al drenado de líquido y colapso de las espumas. Se destacó al igual que en el caso del hidrolizado de GH= 5% que el agregado de X no produjo colapso de las espumas en el tiempo estudiado.

El agregado de HPMCs no modificó la CE (a excepción de E4M que la incrementó) y aumentó o mantuvo constante el colapso de las espumas (a excepción de E4M sobre el t.lag de colapso cuando se agregó al hidrolizado de GH= 5,75%), sin embargo, incrementó la estabilidad al drenado de líquido.

Se puede concluir que el efecto de los PS en las propiedades de espumado depende del grado de hidrólisis de la proteína y del tipo de PS y proteína de una manera compleja. Los polisacáridos que aportan significativa viscosidad en la fase continua, se caracterizan por estabilizar las espumas pero reducir la CE en forma similar en todo tipo de proteína y especialmente en los menores grados de hidrólisis estudiados. Sin embargo, si la viscosidad aportada por el PS es menor, las propiedades relacionadas a las características

de las películas interfaciales, comenzarían a prevalecer en una forma compleja que depende del tipo de proteína, GH de la proteína, PS agregado y concentración de ambos biopolímeros.

### ***II. 3 Interacción entre proteína de soja y polisacáridos en interfases***

El estudio de la interacción proteína-polisacárido a nivel interfacial es de fundamental importancia dado la implicancia directa en las propiedades de espumado. Se estudió dicha interacción a un pH , por encima del punto isoeléctrico de la proteína de soja, en donde la igualdad de cargas entre la proteína y los diferentes polisacáridos generan interacciones electrostáticas repulsivas que conllevan a una limitada incompatibilidad termodinámica en las concentraciones estudiadas (Tostoguzov,1997). Por otra parte, estas interacciones serán afectadas por la naturaleza química del polisacárido y la hidrólisis de la proteína de soja.

Para realizar este estudio, se seleccionaron como polisacáridos no tensioactivos el lambda carragenano ( $\lambda$ C) y la goma garrofin (GG) y como polisacárido tensioactivo HPMC (el producto comercial denominado E4M). Los polisacáridos se mezclaron en una concentración fija de 0,25% p/p con la proteína de soja (SP) en concentración de 2% p/p.

#### ***II 3.1 Cinética de adsorción***

En la Figura 1 se muestra la evolución de la presión superficial en función del tiempo de adsorción para la proteína de soja y el efecto del agregado de E4M,  $\lambda$ C y GG.

La concentración usada en el trabajo (2%) permite la saturación de la monocapa (Molina y col., 2003).

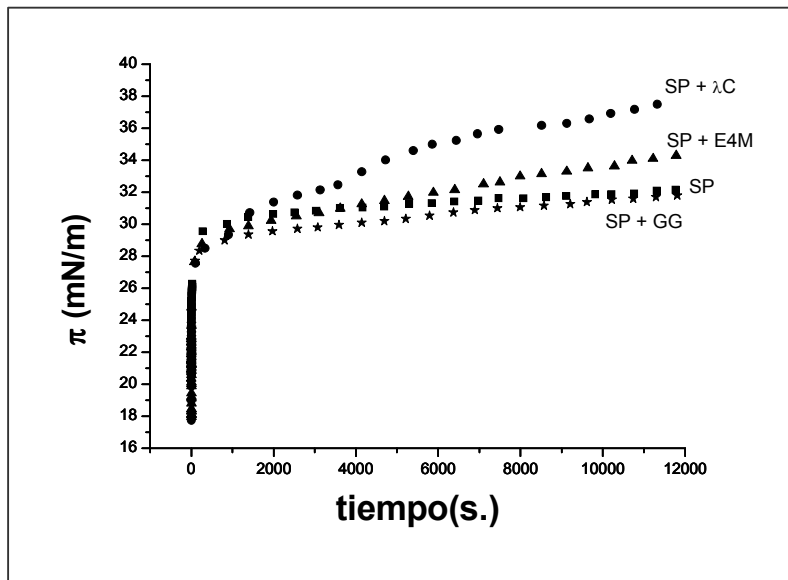
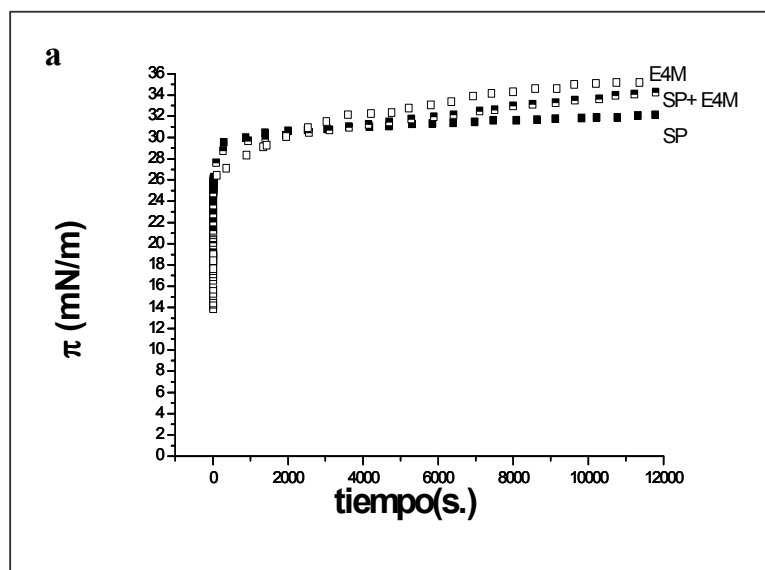
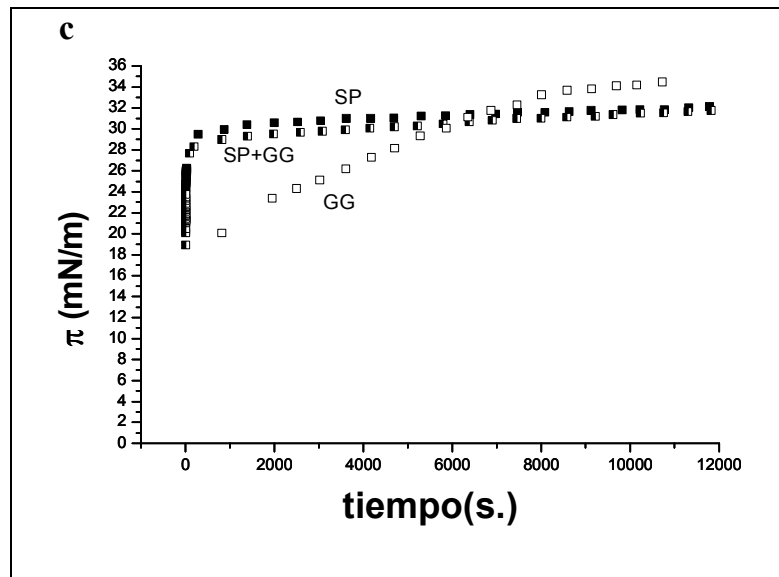
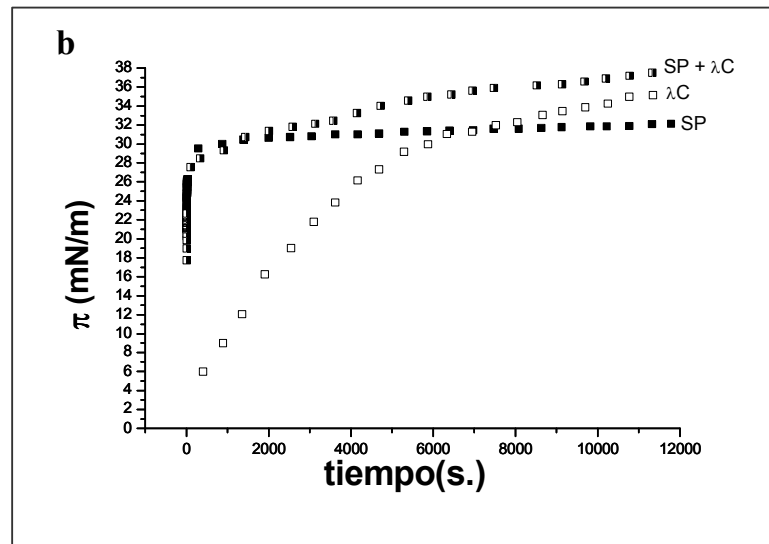


Figura 1: Presión superficial ( $\pi$ ) en función del tiempo de adsorción para SP y mezclas de SP + PS.

Se observa que a excepción de GG, la presencia de los otros polisacáridos, conduce a un incremento de la presión superficial. Este resultado puede ser consecuencia de la existencia de efectos competitivos o cooperativos entre la proteína de soja y los polisacáridos. A fin de establecer cuál de estas interacciones predomina, se analizaron las curvas de presión superficial en función del tiempo de adsorción para los componentes solos y las mezclas (Figura 2a-c).





**Figura 2** : Presión superficial en función del tiempo de adsorción para SP, PS solos y sus mezclas (a)E4M (b)  $\lambda$ C (c) GG.

La Figura 2a muestra que E4M es más tensioactivo que la proteína de soja. Recientemente se ha reportado que esta HPMC, muestra características particulares que la hacen singular. Este biopolímero mostró la mayor actividad superficial, a bajas concentraciones ( $< 10^{-4}$  % p/p) entre diferentes HPMCs (Pérez y col, 2006). Las diferencias observadas en la



actividad superficial han sido atribuidas al alto grado de sustitución y su alto peso molecular que involucra un mayor número de segmentos que potencialmente podrían ser adsorbidos por mol de polímero. Arboleya y col., (2005) también reportaron que la HPMC Methocel 450 fue más tensioactiva que las proteínas  $\beta$ - lactoglobulina y  $\beta$ -caseína.

En presencia de E4M se observa que a largos tiempos de adsorción la curva correspondiente a la mezcla con la proteína de soja se encuentra entre las curvas de los componentes solos, indicando un comportamiento competitivo. A bajos tiempos de adsorción (< 2000 s.) la presión superficial fue dominada principalmente por la proteína, pero a altos tiempos de adsorción, el crecimiento de la presión superficial debe atribuirse a la adsorción del polisacárido.

La adsorción competitiva ha sido reportada entre proteínas y agentes tensioactivos de bajo peso molecular como monoglicéridos (Dickinson y col., 1992; Rodríguez Patino y col., 2003b), lecitinas (Courthaudon, 1991), surfactantes (Mackie, 1999 ;2000) y biopolímeros tensioactivos como alginatos de propilen glicol (Baeza y col, 2005b).

La adsorción competitiva entre biopolímeros puede afectar en forma directa a la presión superficial por desplazamiento de la proteína por un polisacárido con tensioactividad y en forma indirecta por incompatibilidad termodinámica entre las macromoléculas adsorbidas en la interfase que podrían hacer crecer la concentración aparente superficial. Existe evidencia de separación de fases de macromoléculas en las películas mixtas en la interfase aire-agua (Sengupta y col., 2000).

Un comportamiento sinérgico puede ser deducido comparando el crecimiento de la presión superficial para la proteína SP y el  $\lambda$ C solos con el de su mezcla (Figura 2b). La adsorción del  $\lambda$  carragenano es improbable debido a la escasa proporción de grupos hidrofóbicos en su estructura, pero puede contener contaminantes tensioactivos que no fueron removidos completamente de la solución. Esta posibilidad es reportada en la literatura (Dickinson, 2003). El análisis del contenido de proteína del  $\lambda$ C mostró que este contiene 1,25% p/p de proteína. De todas maneras  $\lambda$ C no tiene capacidad para formar espumas a 0,5% p/p de concentración.

A pesar de que el contaminante podría reemplazar parte de la proteína en la interfase por un efecto competitivo como ocurre en la presencia de surfactantes de bajo peso molecular (Mackie, 1999; Rodríguez Patino, 2003b),  $\lambda$ C mostró un claro efecto sinérgico con la proteína, el cual puede atribuirse a la existencia de una limitada compatibilidad

termodinámica entre la proteína y el polisacárido. Aún cuando el polisacárido no participe en la interfase, en la vecindad de la interfase aire-agua podría conducir por un mecanismo de “depletion” al aumento de la concentración efectiva de la proteína en la interfase. Un comportamiento similar fue observado en películas mixtas de  $\beta$ -lactoglobulina +  $\lambda$ C o goma xántica (Baeza y col, 2005b).

En forma similar GG mostró una aparente actividad superficial (Figura 2c) causada por la presencia de un contaminante en la preparación comercial que produce un incremento de la presión superficial. Este aumento de la presión superficial debido a la presencia de contaminantes ha sido reportado por Garti (1999), aunque una solución purificada no exhibió actividad superficial (Gaonkar,1991). GG influyó muy poco la presión superficial de la proteína de soja (Figura 2c), produciendo un pequeño decrecimiento en la presión superficial a cortos tiempos de adsorción.

### II.3.1 Reología dilatacional

En la Figura 3 se muestran el módulo dilatacional ( $E$ ) la componente elástica ( $E_d$ ) y viscosa ( $E_v$ ) y el ángulo de desfase ( $\theta$ ) para la película de proteína de soja en la interfase aire-agua en función del tiempo de adsorción.

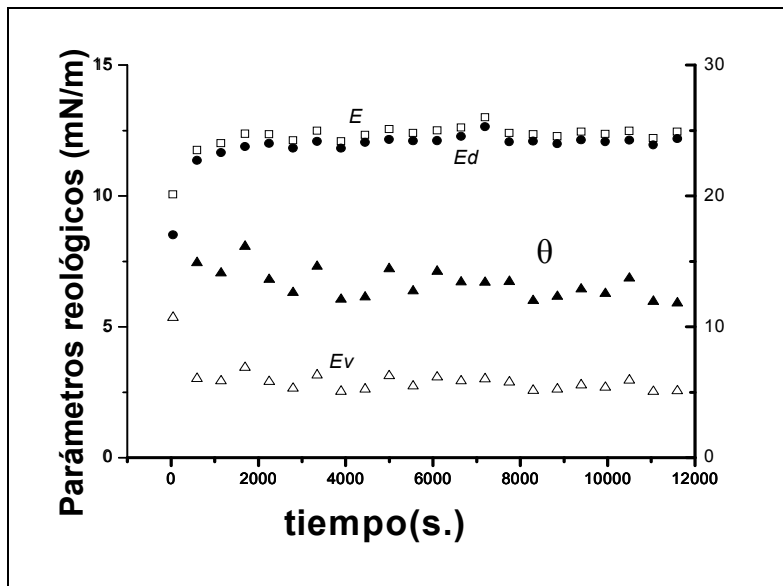
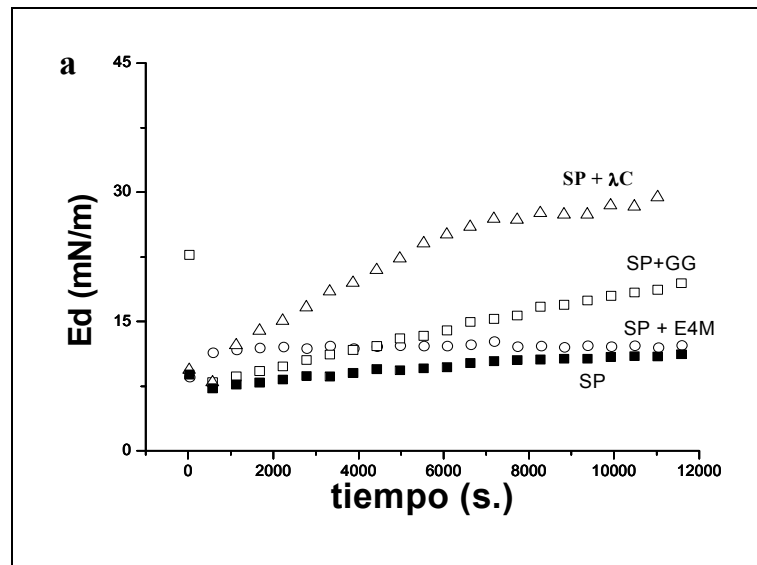
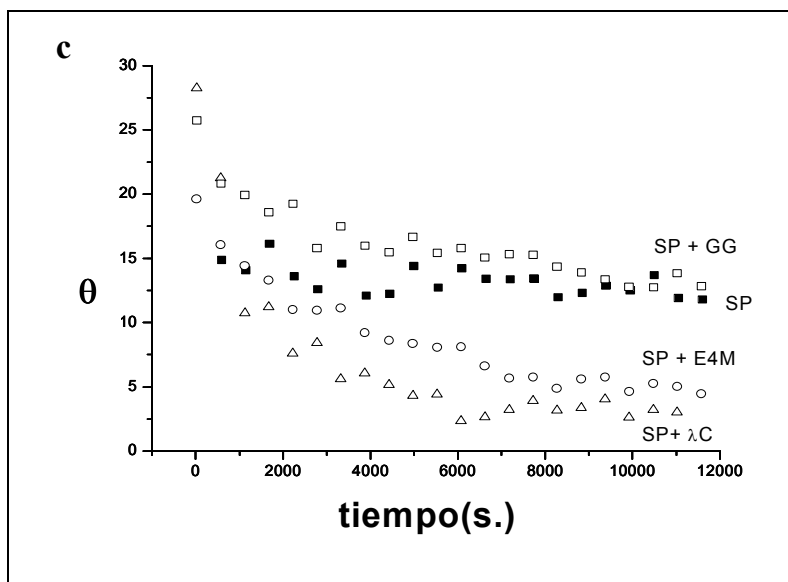
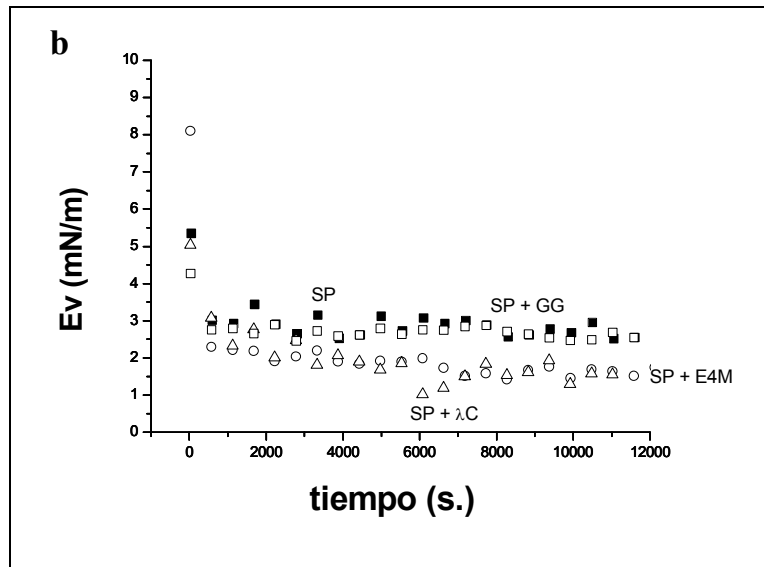


Figura 3: Parámetros reológicos de la película de SP en la interfase aire-agua (concentración de la subfase de 2% p/p).

El crecimiento de  $E$  o  $E_d$  o disminución de  $\theta$  es atribuido a la adsorción de las globulinas de la proteína de soja a la interfase (Molina y col., 2003; Rodríguez Patino y col., 2003a). En el tiempo de adsorción estudiado, se observó que  $E_d$  fue similar a  $E$ , indicando que la película de la proteína de soja presentó un carácter predominantemente elástico, con un ángulo de desfase mayor que cero. El módulo dilatacional  $E$  y su componente elástica  $E_d$  resultaron menores que los reportados para las globulinas nativas de soja 7S y 11S (Molina y col., 2003; Rodríguez Patino y col., 2003a) pero el ángulo de desfase exhibió valores similares indicando que este parámetro reológico es menos afectado por la desnaturalización que induce el procesamiento industrial.

La Figura 4a-c muestra cómo la adición de los polisacáridos afecta los parámetros reológicos de las películas interfaciales de proteína de soja.



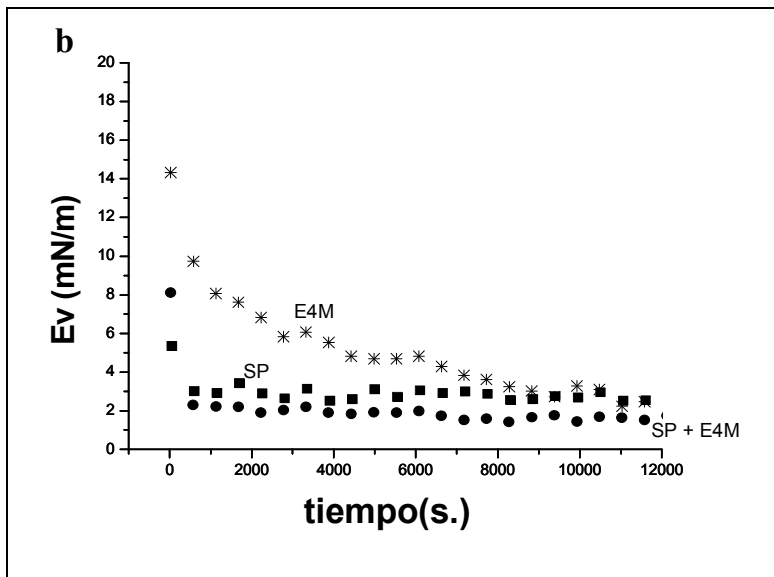
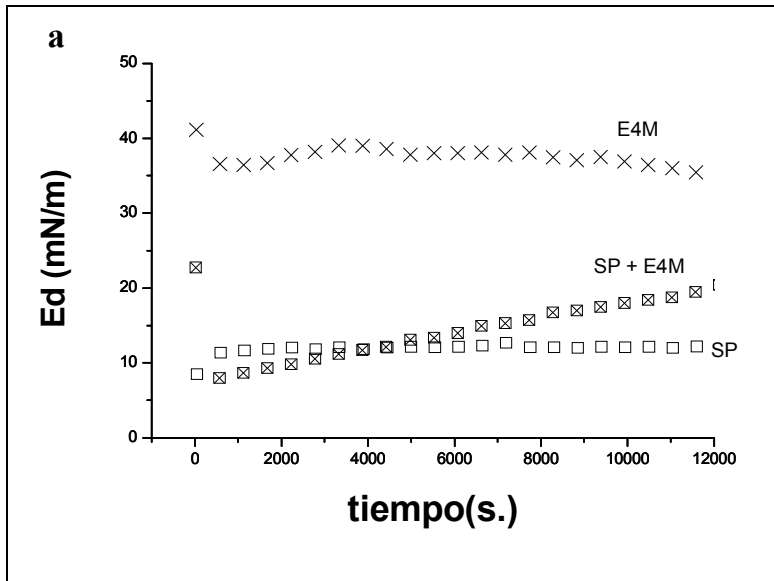


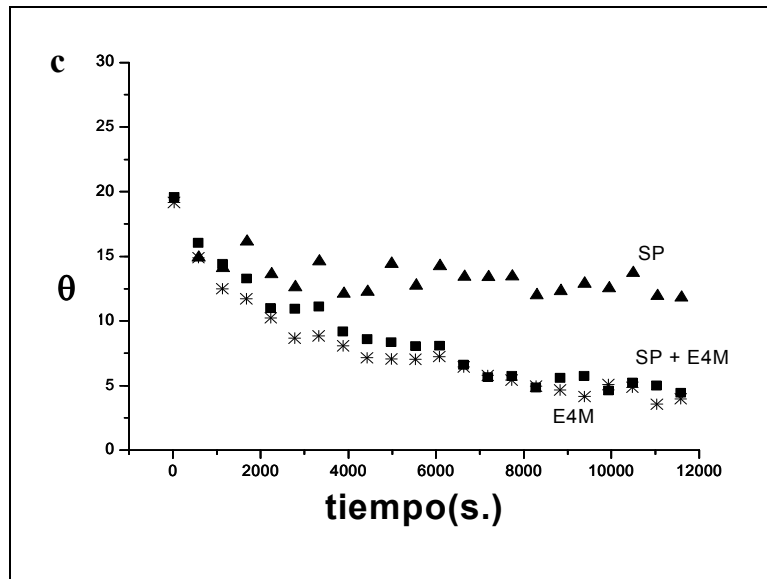
**Figura 4:** Propiedades reológicas de las películas mixtas de SP en función del tiempo de adsorción (a)  $E_d$  (componente elástica); (b)  $E_v$  (componente viscosa); (c)  $\theta$  (ángulo de desfase).

La adición de polisacáridos incrementó la componente elástica ( $E_d$ ) (Figura 4a) y redujo la componente viscosa ( $E_v$ ) (Figura 4b) del módulo dilatacional. En presencia de  $\lambda C$ , y E4M, las películas presentaron una mayor viscoelasticidad relativa (menor  $\theta$ ) que la película de

la proteína sola como muestra el menor valor del ángulo de desfase (Figura 4c). La adición de GG afectó poco este parámetro reológico.

El tipo de interacciones entre la proteína de soja y los polisacáridos sobre las propiedades reológicas de las películas se dedujeron a partir de las curvas de los parámetros reológicos en función del tiempo de adsorción para los componentes solos y las mezclas.

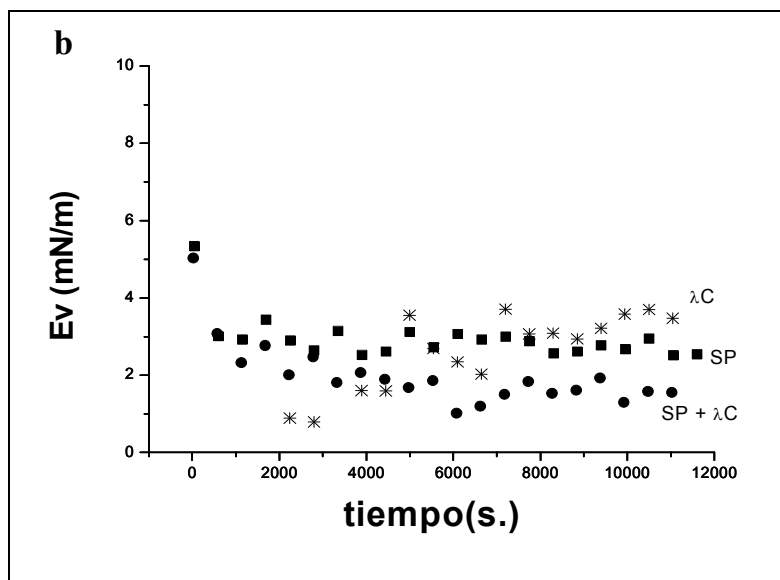
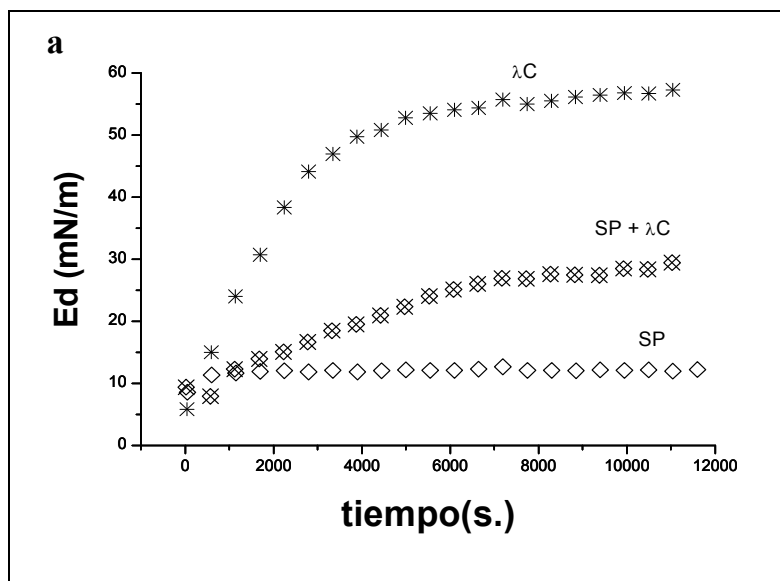


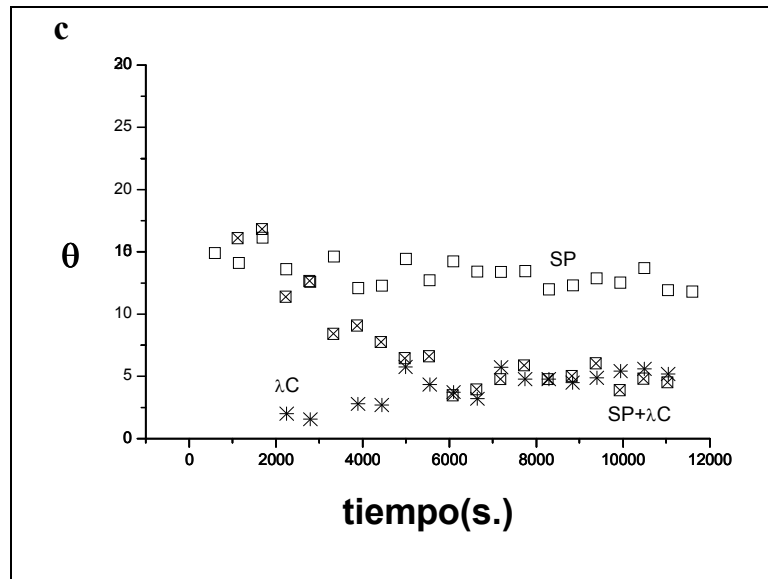


**Figura 5:** Propiedades reológicas de las películas de SP, E4M y su mezcla en función del tiempo de adsorción (a)  $E_d$  (componente elástica); (b)  $E_v$  (componente viscosa) y (c)  $\theta$  (ángulo de desfase).

La Figura 5a muestra que la elasticidad dilatacional superficial de la película de E4M fue mucho mayor que la de la película de SP. En los sistemas mezcla, a cortos tiempos de adsorción, la proteína de soja domina la elasticidad dilatacional superficial, pero luego, debido a la adsorción competitiva de E4M, este parámetro crece tendiendo a los valores del polisacárido solo. Los componentes viscosos del módulo dilatacional para películas de E4M y de proteína de soja fueron similares a largos tiempos de adsorción (Figura 5b), pero la película mixta exhibió un valor ligeramente menor. La Figura 5c muestra que la viscoelasticidad relativa de las películas mixtas, fue dominada por E4M, a causa de su mayor actividad superficial (Figura 2a) y elasticidad superficial (Figura 5a). E4M, penetra fácilmente en la interfase y compite con la proteína lo cual genera películas con un fuerte carácter sólido (Pérez y col.,2006).

En la Figura 6a-c se muestran los resultados comparativos de SP,  $\lambda C$  y sus mezclas.





**Figura 6:** Propiedades reológicas de las películas de SP,  $\lambda$ C y su mezcla función del tiempo de adsorción (a)  $E_d$  (componente elástica); (b)  $E_v$  (componente viscosa); y (c)  $\theta$  (ángulo de desfase).

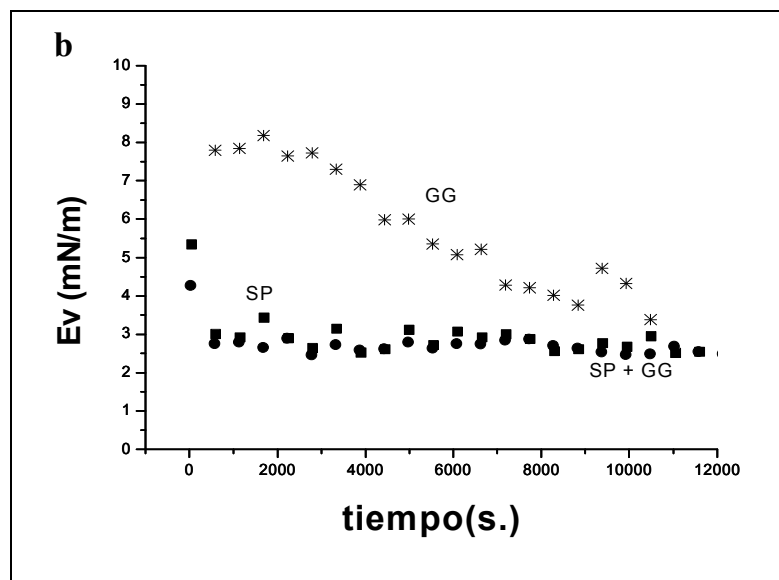
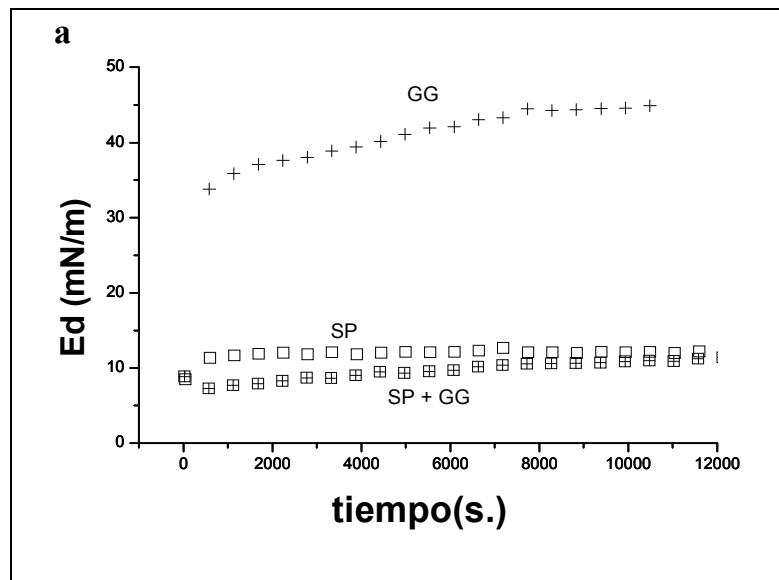
La Figura 6a muestra que las películas de  $\lambda$ C, tuvieron una mayor elasticidad dilatacional superficial que la proteína sola aún cuando este no es un polisacárido activo superficialmente. Esto puede deberse a la habilidad del polisacárido de estructurar la interfase aire-agua. Dicha estructuración puede ser consecuencia de la inmovilización de agua interfacial a causa de la alta hidrofiliidad del polisacárido (Baeza y col., 2005a). La evolución de la elasticidad superficial de los sistemas mixtas entre las curvas de los componentes solos, indica una interacción cooperativa entre el componente activo superficialmente del polisacárido, la proteína y el polisacárido no activo superficialmente. La contribución del contaminante en la elasticidad superficial de la película es pequeña, como puede verse comparando las curvas de presión superficial y elasticidad en función del tiempo de adsorción para  $\lambda$ C solo. Se observa que la elasticidad crece más rápidamente que la presión superficial.

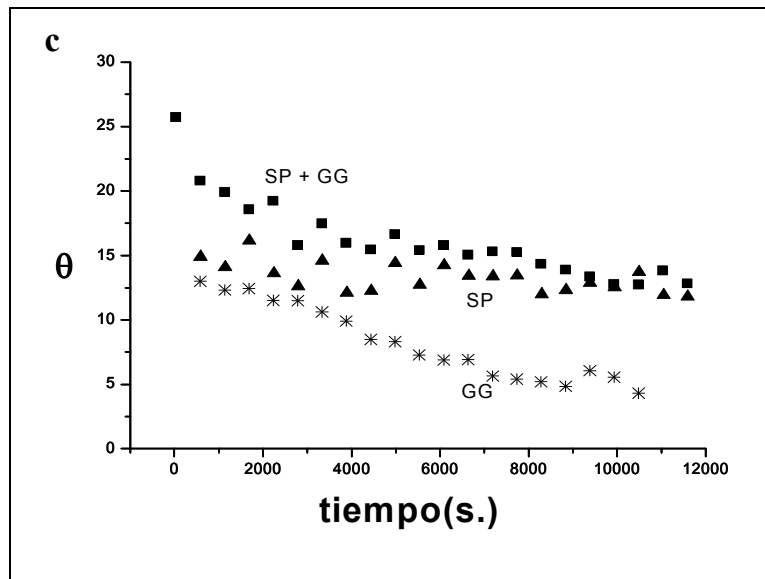
La componente viscosa del módulo dilatacional para la mezcla, fue menor que para los componentes solos (Figura 6b) como en presencia de E4M. La Figura 6c muestra que la viscoelasticidad relativa de las películas de la proteína de soja en presencia de  $\lambda$ C, fue dominada por el polisacárido. Tiene que considerarse que además de la capacidad de



estructurar el agua interfacial del  $\lambda C$ , si los contaminantes están fuertemente unidos al polisacárido éste puede estar anclado en la interfase aún no teniendo actividad superficial por sí solo. Dickinson (2003) ha reportado la existencia de pequeñas fracciones asociadas química o físicamente a la estructura del polisacárido.

En la Figura 7a-c se muestran los gráficos comparativos en presencia de GG.





**Figura 7:** Propiedades reológicas de las películas de SP, GG y su mezcla en función del tiempo de adsorción (a) Ed (componente elástica); (b) Ev (componente viscosa); y (c)  $\theta$  (ángulo de desfase).

Contrariamente al caso anterior, en presencia de GG la componente elástica (Figura 7a) y la componente viscosa (Figura 7b) del módulo dilatacional fueron dominados por la proteína en todo tiempo de adsorción. Además, la proteína de soja también dominó la viscoelasticidad relativa de la interfase en los sistemas mixtos, como indica el ángulo de desfase,  $\theta$ , el cual fue similar al correspondiente a la película de la proteína sola (Figura 7c).

La concentración de proteína de soja usada en el trabajo (2%) permite la saturación de la monocapa (Molina y col., 2003). En esa condición, la presencia de E4M y  $\lambda$ C incrementan la presión superficial, la elasticidad superficial y la viscoelasticidad relativa, sobre la base de diferentes mecanismos. E4M compite por la interfase con la proteína de soja, pero a causa de su alta actividad superficial, domina la presión superficial y determina la viscoelasticidad de las películas.

Estudios previos sobre  $\beta$ -lactoglobulina + alginatos de propilenglicol (PGA) como polisacáridos con actividad superficial, mostraron que en ese caso la actividad superficial de la proteína era mayor que la del polisacárido y debido a la competencia por la interfase,

se observó en las mezclas una reducción de la presión superficial en comparación a la proteína sola, debido al reemplazo de la proteína muy activa superficialmente por el polisacárido menos activo. Además, la presencia de PGA en la interfase disminuyó la elasticidad dilatacional debido a que el que PGA formó películas menos viscoelásticas que la proteína sola (Baeza y col., 2004).

Por otro lado, debido a que  $\lambda C$  no es un polisacárido con tensioactividad, la modificación de la presión superficial y las propiedades reológicas de las películas de proteínas de soja adsorbidas, necesariamente sugiere la participación de  $\lambda C$  + contaminantes en la interfase a través de un mecanismo de complejamiento o en forma indirecta por un mecanismo de “depletion” en la vecindad de la interfase (Baeza y col., 2005b). El complejamiento puede resultar de interacciones atractivas locales entre proteínas y polisacáridos en la interfase aún a  $pH > pI$  de PS a causa de la alteración de la conformación de la proteína en la interfase.

La presencia de GG + contaminantes afecta poco la presión superficial y las propiedades reológicas de las películas de la proteína de soja. La diferente interacción entre  $\lambda C$  y GG con la proteína de soja puede ser atribuida principalmente a diferentes grados de incompatibilidad con la proteína. De hecho, GG posee menor peso molecular y viscosidad que  $\lambda C$  y no posee cargas como  $\lambda C$ . Además  $\lambda C$  tiene la posibilidad de interactuar con zonas cargadas positivamente pertenecientes a las proteínas a través de los grupos sulfatos, formando complejos (Dickinson y col., 2003).

Los resultados indican que más allá del rol de los polisacáridos como agentes espesantes, tanto los PS tensioactivos como los no tensioactivos, tienen una influencia directa en la interfase aire-agua, promoviendo una mejora de las propiedades de las películas cuando se usan en combinación con proteína de soja.

## II.4 Efecto de la hidrólisis de la proteína de soja en la interacción con polisacáridos en la interfase.

### II.4.1 Cinética de adsorción

En la Figura 8 se muestra la presión superficial en función del tiempo de adsorción para el hidrolizado H1 y las mezclas con los polisacáridos.

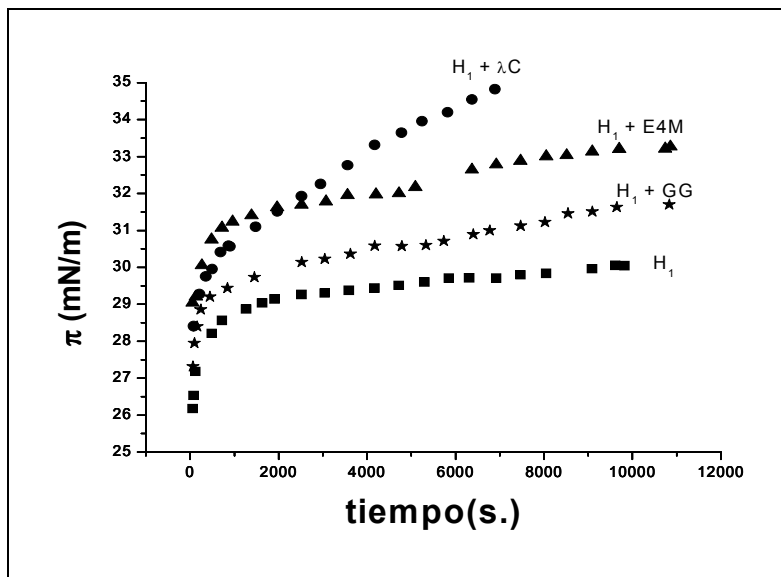
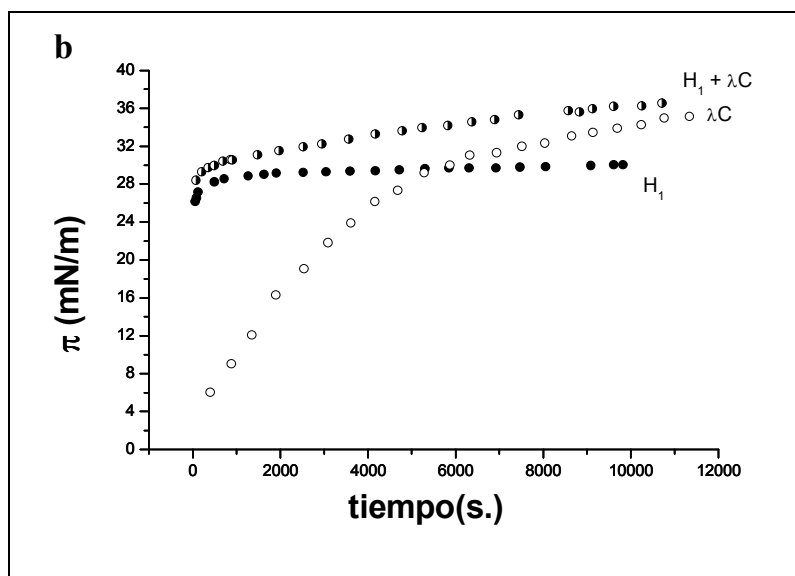
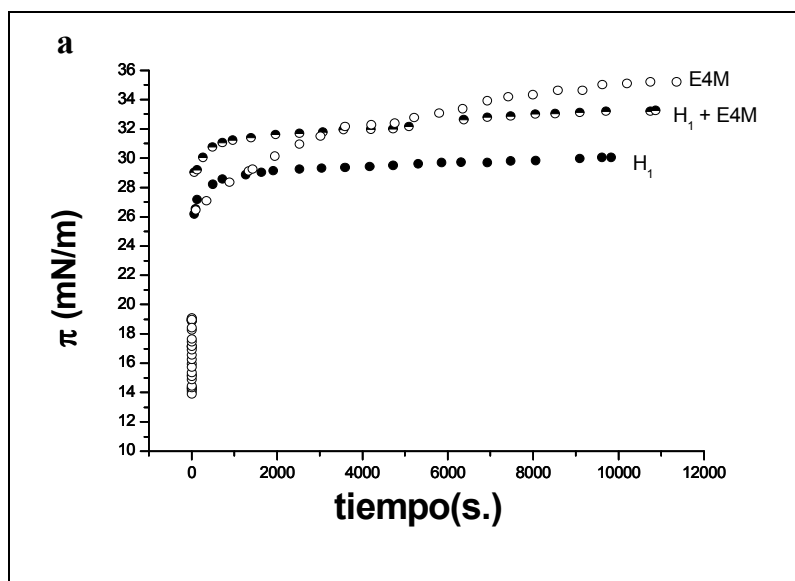


Figura 8: Presión superficial ( $\pi$ ) en función del tiempo de adsorción para H1 y las mezclas de H1 + PS.

La presencia de los polisacáridos conduce a un aumento de la presión superficial en comparación con el hidrolizado solo. El origen de este comportamiento puede analizarse comparando la presión superficial de los componentes solos y de las mezclas.



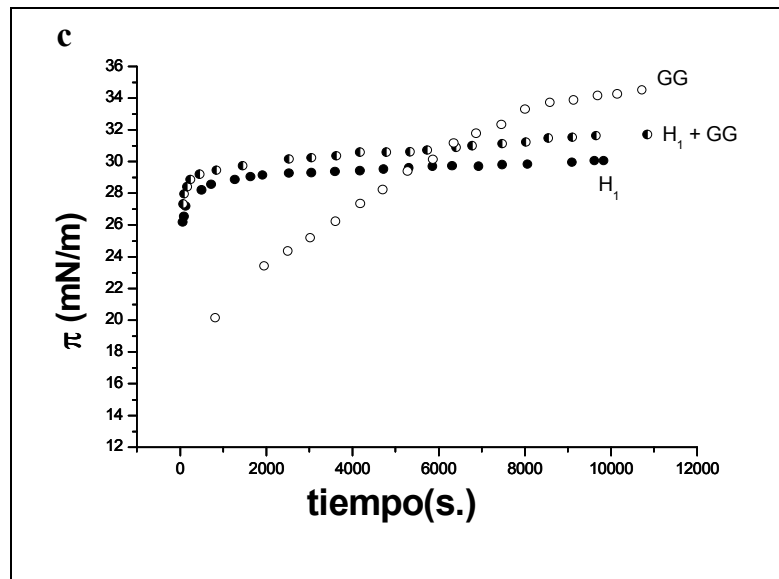


Figura 9: Presión superficial en función del tiempo de adsorción para H1 y PS solos y sus mezclas (a) E4M (b)  $\lambda$ C (c) GG.

En la Figura 9a-c se muestra que la presión superficial en presencia de E4M crece debido a efectos competitivos entre los componentes. Se observa que la curva de presión superficial en función del tiempo para la mezcla a largos tiempos de adsorción se ubicó entre las curvas correspondientes a los componentes solos, indicando un comportamiento competitivo. Como E4M es más tensioactivo que H1, la adsorción competitiva resultó en un crecimiento de la presión superficial en los sistemas mixtos. A bajos tiempos de adsorción (aprox. 2000 s.) se observó un efecto sinérgico entre ambos componentes probablemente debido a la existencia de espacio disponible en la interfase en esta etapa de la adsorción, por lo que resulta una adsorción en forma cooperativa.

Como se ha destacado anteriormente esta HPMC es una de las más tensioactivas entre diferentes tipos estudiados debido a un alto grado de sustitución y al alto peso molecular el cual posibilita mayor número de segmentos potencialmente adsorbibles a la interfase (Pérez y col., 2006).

La mezcla de H1 con  $\lambda$ C mostró un comportamiento sinérgico en las películas mixtas (Figura 9 b). La adsorción del polisacárido no es posible debido a que en su estructura no posee grupos hidrofóbicos significativos, pero la presencia de contaminantes produce un lento crecimiento de la presión superficial. Se ha reportado que la existencia de

tensioactividad en polisacáridos hidrofílicos, es explicable por la presencia de pequeñas fracciones de contaminantes (Dickinson, 2003).

A pesar de la posibilidad de desplazamiento de las proteínas por estos contaminantes, como ocurre en presencia de surfactantes de bajo peso molecular (Mackie y col., 1999; Rodríguez Patino y col., 2003b)  $\lambda c$  mostró un claro sinergismo con la proteína. El sinergismo puede atribuirse a un efecto de incompatibilidad termodinámica entre los biopolímeros. Aún cuando el polisacárido no participa en la interfase, la proteína y el polisacárido en la vecindad de la interfase aire-agua, podrían incrementar la concentración por un mecanismo de “depletion” (Baeza y col., 2005b). Un comportamiento similar se observó para mezclas de  $\beta$ -lactoglobulina +  $\lambda c$  o  $\beta$ -lactoglobulina + X y proteína de soja +  $\lambda c$  (Martínez y col., 2006a).

En forma similar al  $\lambda C$ , GG mostró una aparente presión superficial (Figura 9c) debido a la presencia de contaminantes en la muestra comercial. También el crecimiento de presión superficial por encima de los valores correspondientes a los componentes solos se atribuye a efectos de incompatibilidad termodinámica entre la proteína hidrolizada y GG.

Se concluye que la proteína hidrolizada de soja al 2% (H1) se comportó en las mezclas con polisacáridos en forma similar a la proteína de soja sin hidrolizar (SP).

En cambio, el hidrolizado de GH=5,35% (H2) se comportó en forma muy diferente como se muestra en la Figura 10.

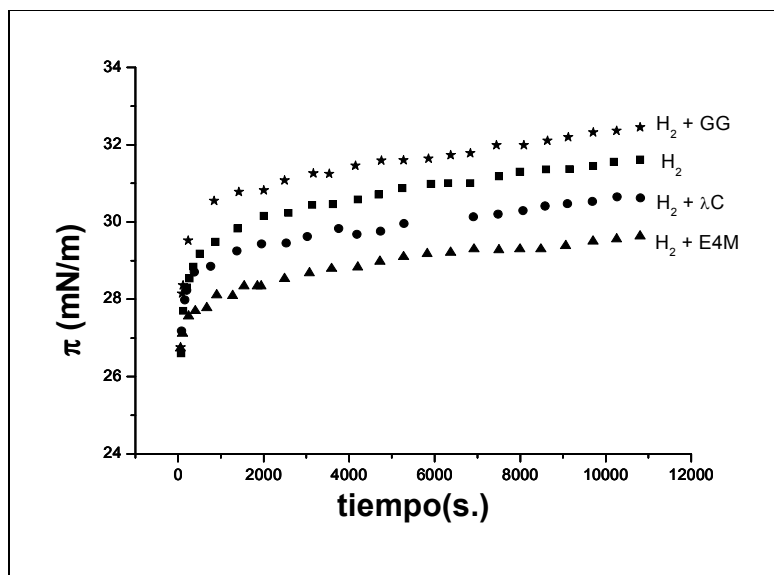
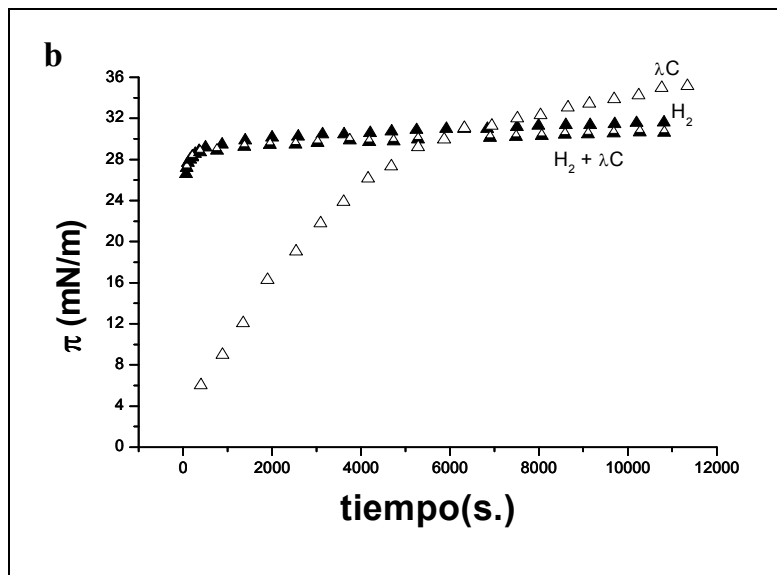
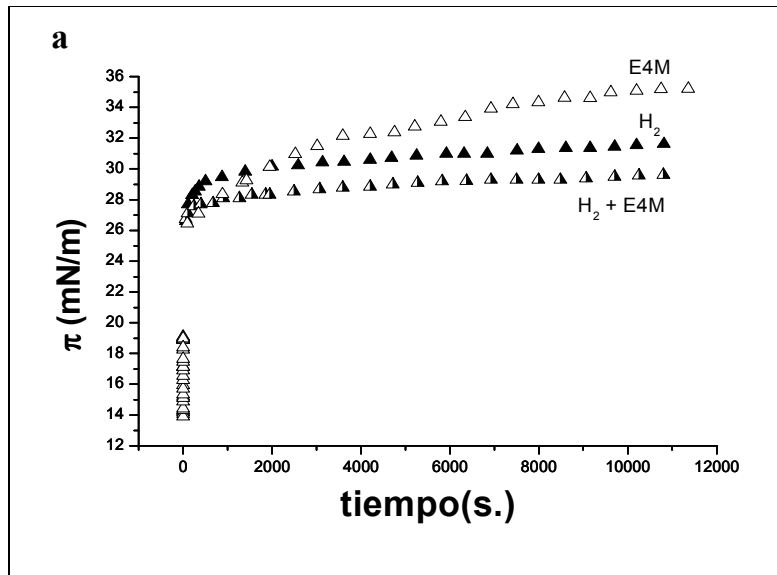
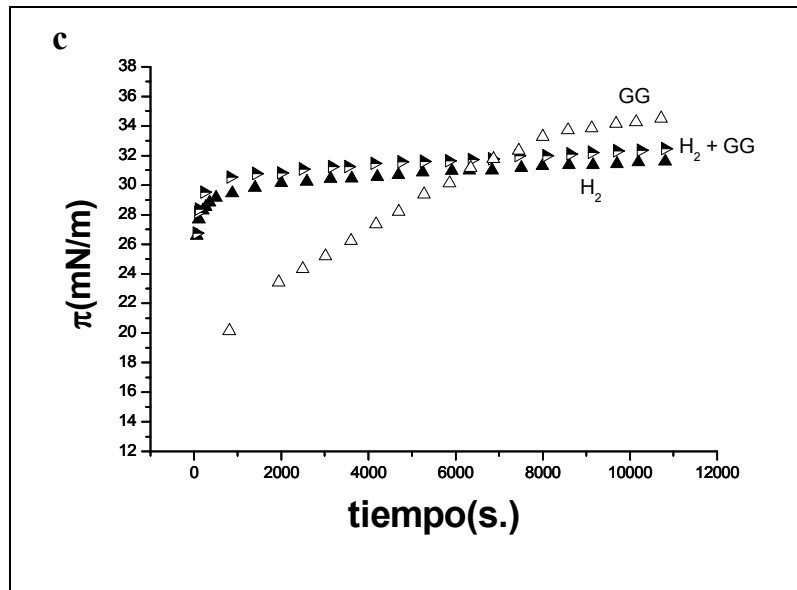


Figura 10: Presión superficial en función del tiempo de adsorción para H2 y las mezclas de H1 + PS.

En presencia de E4M y  $\lambda$ C, la presión superficial de las películas mixtas decreció con respecto al hidrolizado H2. Por el contrario, la adición de GG produjo un leve aumento de la presión superficial como sucedió para H1 (Figura 9c). La razón de este comportamiento puede ser encontrada en las curvas comparativas de los componentes solos y sus mezclas como se muestra en la Figura 11a-c.





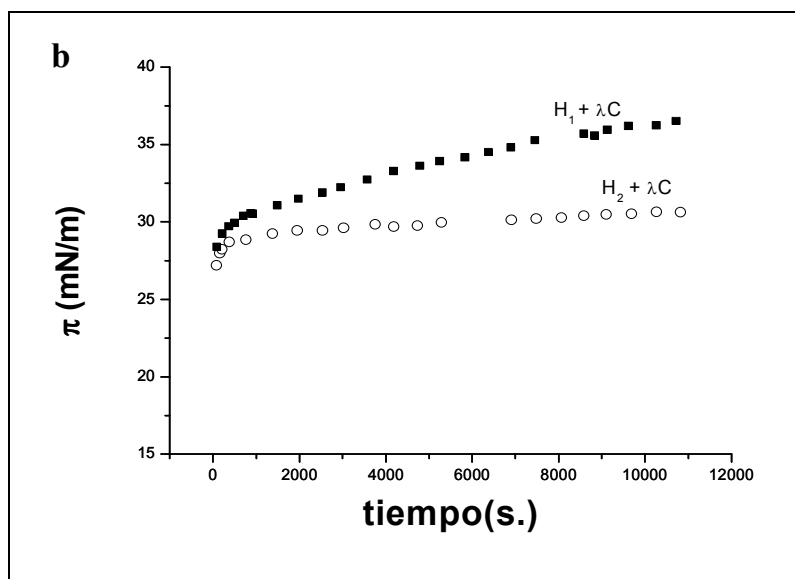
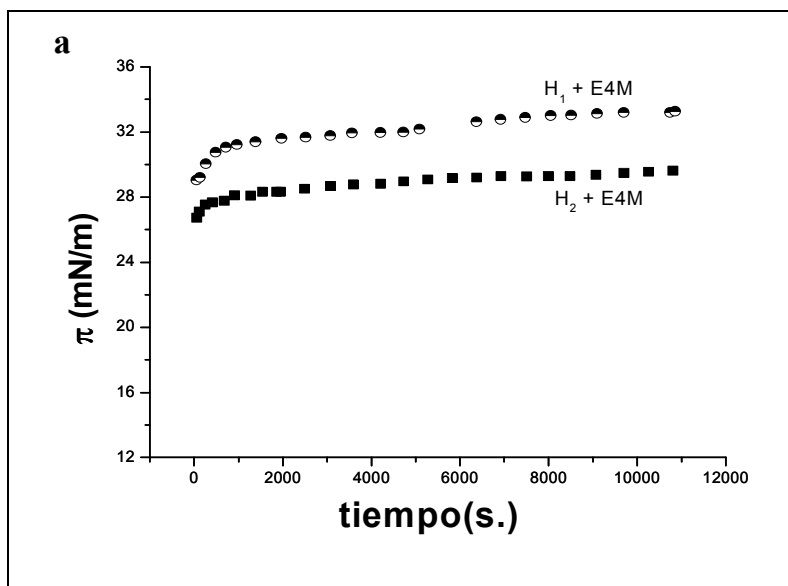


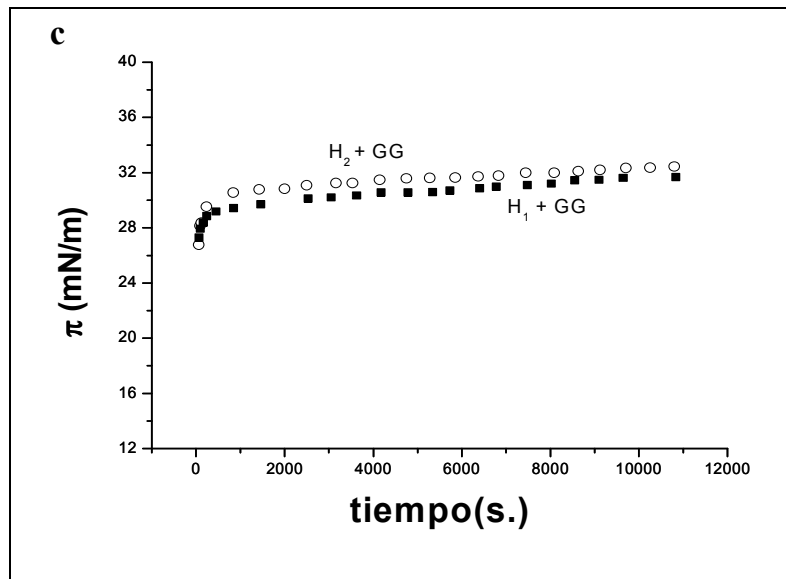
**Figura 11:** Presión superficial en función del tiempo de adsorción para H<sub>2</sub> y PS solos y sus mezclas; (a) E4M (b) λC (c) GG.

Las Figuras 11 a y b muestran en presencia de E4M o λC un comportamiento antagonista ya que la presión superficial de las mezclas fue menor que la de los componentes solos. Cuando crece la carga de la proteína por el aumento del grado de hidrólisis, son posibles interacciones locales electrostáticas entre los polisacáridos y las proteínas, llevando a la formación de complejos solubles. Es probable que dicha formación afecte la tasa de adsorción de la proteína al final de la etapa de adsorción. Recientemente Ganzevles y col., (2006) propusieron diferentes factores que contribuyen a la reducción de la presión superficial en mezclas de proteína y polisacáridos: (1) el complejamiento disminuye la cantidad de proteína disponible para alcanzar la interfase; (2) el complejo difunde más lentamente; (3) la unión de la proteína a la interfase se dificulta por la presencia del polisacárido presente.

En presencia de GG (Figura 11c) posiblemente la complejación no ocurra, ya que la presión superficial resultó ligeramente mayor que la correspondiente al hidrolizado H<sub>2</sub> solo, como pudo verse también con la mezcla H1+ GG (Figura 9c) y predominaría un efecto de volumen de exclusión.

El efecto del grado de hidrólisis (GH) en la interacción con los polisacáridos se muestra en la Figura 12a-c.





**Figura 12:** Presión superficial en función del tiempo de adsorción de sistemas mixtos de SP hidrolizada + PS; (a) E4M (b)  $\lambda$ C (c) GG.

La disminución de la presión superficial a medida que aumenta el grado de hidrólisis en presencia de E4M y  $\lambda$ C, podría ser consecuencia del efecto antagónico observado entre los polisacáridos y H2 (Figura 12a-b).

En la presencia de GG, no se observaron diferencias importantes en la presión superficial entre los dos hidrolizados aunque la mezcla con H2 exhibió un pequeño aumento en la presión superficial (Figura 12c).

#### II.4.2 Reología dilatacional

En el tiempo estudiado de adsorción se observó que la componente elástica dilatacional fue similar al módulo dilatacional y las películas presentaron un alto carácter viscoelástico con un ángulo de desfase  $\theta$  mayor que cero. La disminución del ángulo de desfase con el tiempo de adsorción para las películas de los hidrolizados H1 y H2 se muestra en las Figuras 13a-b y es atribuida a la adsorción de los polipéptidos en la interfase aire-agua (Rodríguez Patino y col., 2003b).

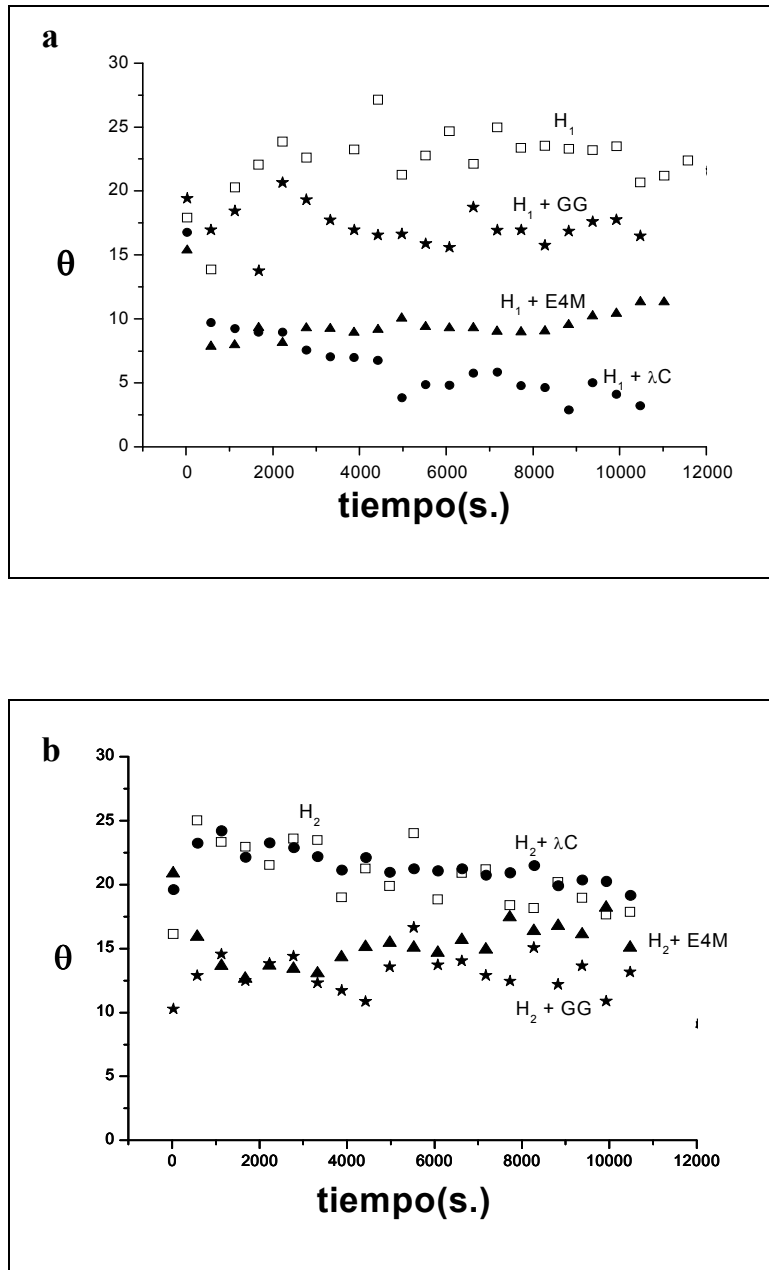


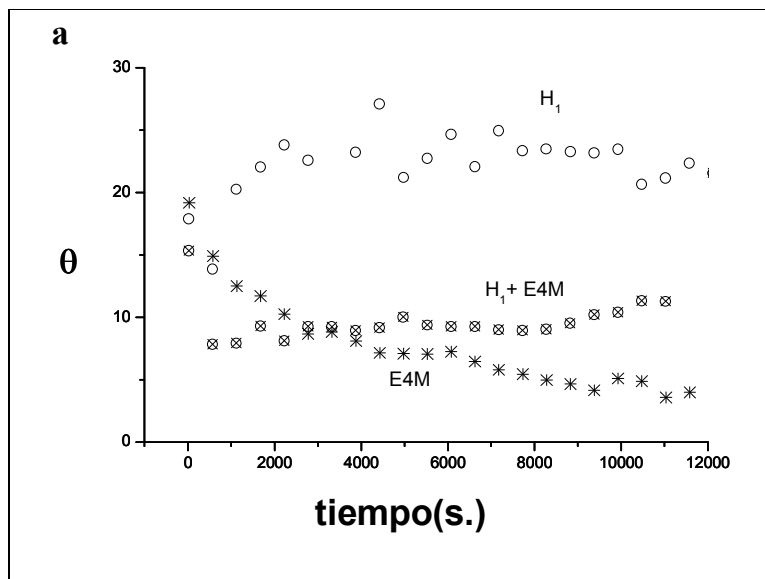
Figura 13: Angulo de desfase de las películas de H1, H2 y sus mezclas con PS (a) sobre H1 (b) sobre H2.

La película de la proteína más hidrolizada (H2) fue más viscoelástica que la película formada por H1 ya que presentó un menor ángulo de desfase.

La agregación de péptidos en la interfase conforme aumenta el GH, reflejado en el aumento de la viscoelasticidad de la película, podría deberse al aumento de la hidrofobicidad superficial de H2 con respecto a H1 (Figura 3 y 4 del Capítulo I) lo que permitiría un mayor grado de asociación entre los polipéptidos en la película.

La adición de polisacáridos, produjo un aumento de la viscoelasticidad relativa dado los menores valores del ángulo de desfase, aunque el efecto sobre H2 fue menor.

El tipo de interacción entre las proteínas hidrolizadas y los polisacáridos sobre la viscoelasticidad puede ser deducido a partir de la curvas del ángulo de desfase en función del tiempo de adsorción para los componentes solos y para las mezclas.



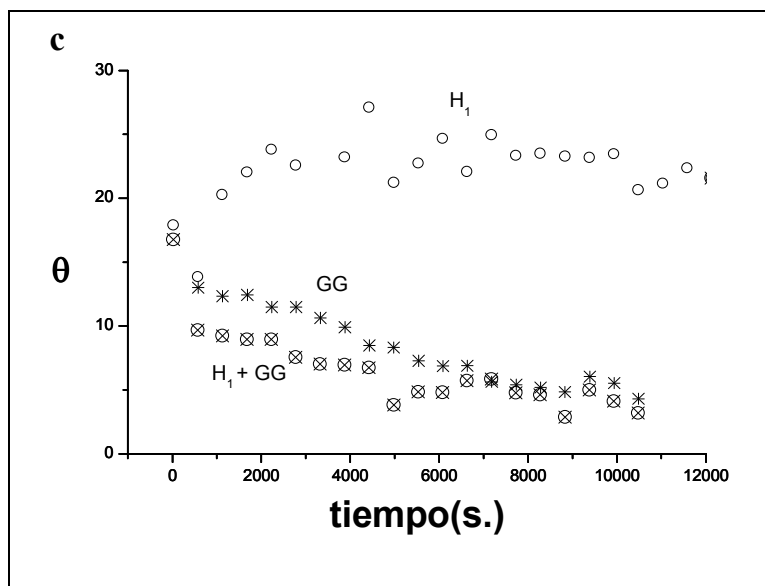
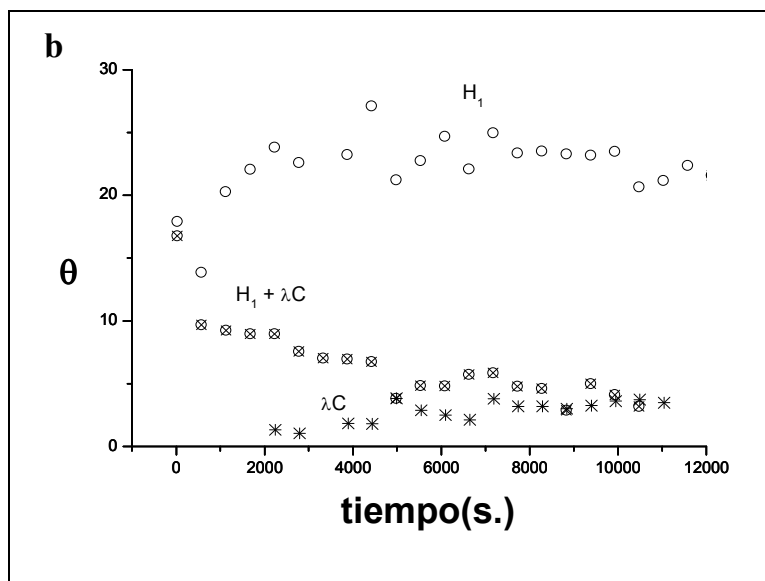


Figura 14: Angulo de desfase en función del tiempo de adsorción para H1, PS, y sus mezclas; (a) E4M (b)  $\lambda C$  (c) GG.

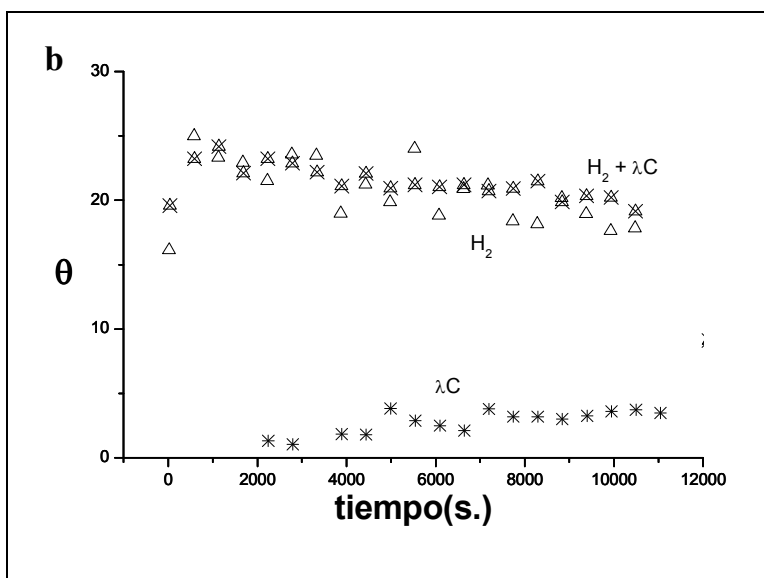
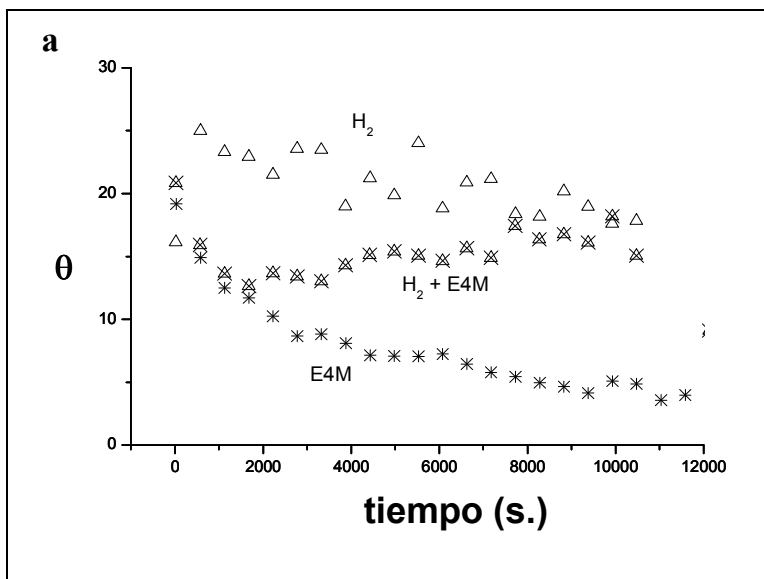
En la Figura 14a se muestra que en presencia de E4M la viscoelasticidad relativa de las películas fue determinada por ambos componentes mostrando un comportamiento competitivo.

La viscoelasticidad de la película de E4M fue mayor que la de H1 por lo tanto, la viscoelasticidad de la película mixta H1-E4M fue mayor que la de H1 debido al aumento de moléculas de E4M adsorbidas en la interfase.

La Figura 14b-c muestra que la viscoelasticidad relativa de las películas de H1 en presencia de  $\lambda$ C o GG fue dominada por los polisacáridos, que exhibieron menores ángulos de desfase que la proteína sola. La alta viscoelasticidad superficial de las películas de los polisacáridos solos se atribuye a la habilidad de los polisacáridos de estructurar el agua en la interfase como consecuencia de la inmovilización de agua interfacial por la alta hidrofiliidad. También debe considerarse que los contaminantes de los polisacáridos si estuvieran fuertemente unidos a los polisacáridos, podrían llevar al PS a la interfase (Dickinson y col., 2003).

La Figura 15a-c muestra el ángulo de desfase en función del tiempo de adsorción para películas de H2 y las mezclas con los polisacáridos y explica por qué el efecto de los polisacáridos fue menor cuando se adicionaron a H2, la proteína más hidrolizada. En presencia de E4M (Figura 15a) a cortos tiempos de adsorción, la viscoelasticidad relativa estuvo dominada por el polisacárido, pero cuando H2 comenzó a adsorberse y predominó en la interfase, determinó el valor del ángulo de desfase a largos tiempos de adsorción. En presencia de  $\lambda$ C (Figura 15b), H2 dominó la viscoelasticidad en todo el tiempo de adsorción.

En presencia de GG un efecto competitivo llevó a una viscoelasticidad intermedia de la película mixta (Figura 15c). Se concluye que H2 dominó en mayor medida la viscoelasticidad de la interfase que H1 en las películas mixtas. Los péptidos de menor tamaño, estarían posibilitados de penetrar en mayor cantidad en la interfase lo cual hace que determinen las características elásticas de la interfase en presencia de los polisacáridos. El aumento del GH de la proteína resultó en la disminución de la viscoelasticidad relativa de las películas. Este resultado puede ser una consecuencia del efecto dominante de H2 sobre los polisacáridos en la interfase sobre la viscoelasticidad de las películas.





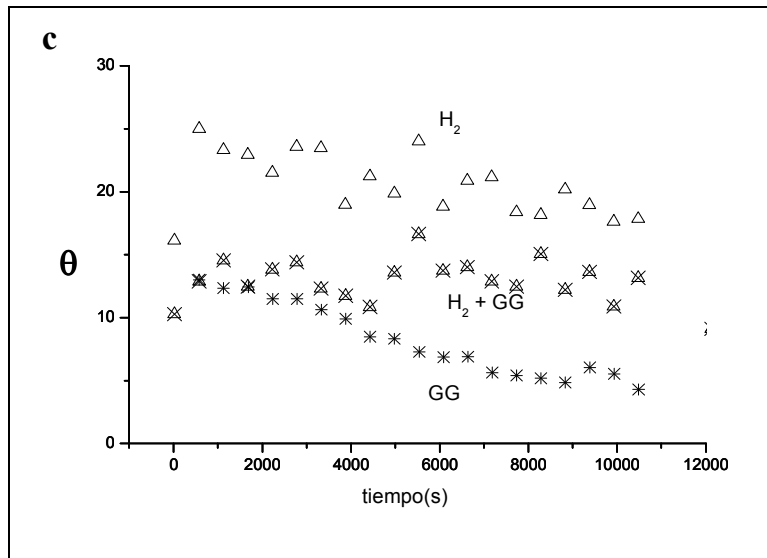
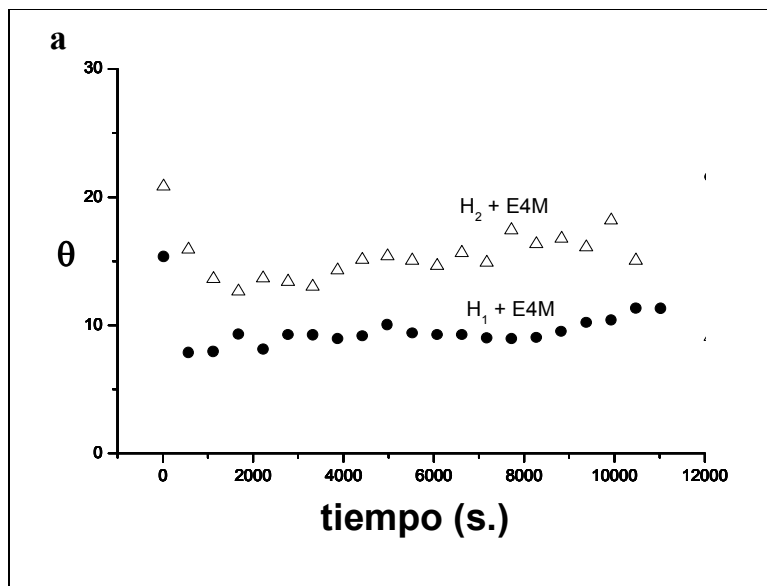


Figura 15: Ángulo de desfase en función del tiempo de adsorción para H<sub>2</sub> con los PS (a) E4M (b)  $\lambda$ C (c) GG.

En la Figura 16a-c se muestra el efecto del GH de la proteína de soja en el ángulo de desfase de las películas mixtas en presencia de cada polisacárido.



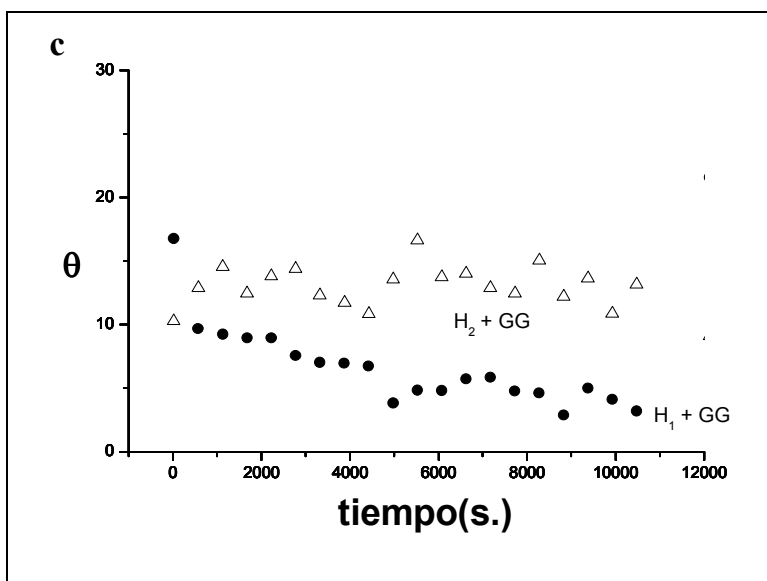
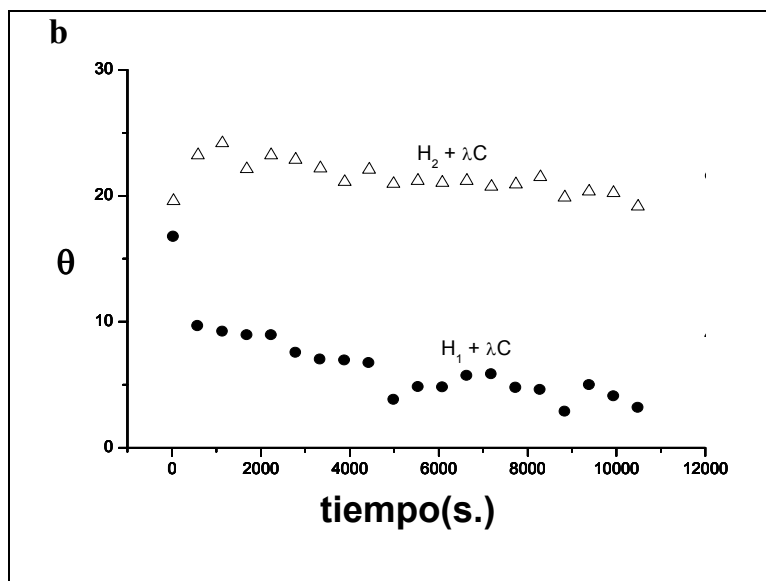


Figura 16: Angulo de desfase en función del tiempo de adsorción para H1 y H2 con los PS; (a) E4M (b)  $\lambda C$  (c) GG.

Los resultados sugieren que la naturaleza de las interacciones proteína-polisacárido es fuertemente afectada por el GH, aún en un pequeño rango como el estudiado (2-5,35%).

La presión superficial y viscoelasticidad de las películas de la proteína menos hidrolizada H1, aumentó en presencia de los polisacáridos. Esto indica que una hidrólisis limitada es suficiente para mejorar las propiedades de la interfase aire-agua cuando la proteína se usa en combinación con polisacáridos.

En concordancia con estudios previos sobre proteínas intactas (Baeza y col., 2004; 2005b, Martínez y col., 2006a), los resultados obtenidos muestran que a pesar del rol de los polisacáridos tensioactivos y no tensioactivos como espesantes, estos tienen además una influencia muy importante en la interfase. La adición de polisacáridos a proteínas hidrolizadas, controla la estabilidad de sistemas dispersos (espumas y emulsiones) no sólo por aumento de la viscosidad del seno de la solución, sino también por mejora de la viscoelasticidad relativa de las películas interfaciales.

### ***II.5 Relación entre propiedades de espumado e interfaciales***

Se ha visto en el Capítulo I que la viscoelasticidad de las películas de proteína de soja se relaciona con la estabilidad al colapso.

Sin embargo, una mejora de las propiedades reológicas de las películas de SP o de los hidrolizados en presencia de los PS no se tradujo en todos los casos en una mejora de la estabilidad al colapso de las espumas (Tablas 3 y 6). Por ejemplo el agregado de  $\lambda$ C a SP que generó películas mixtas de similar viscoelasticidad relativa que el agregado de E4M promovió una extraordinaria estabilización a la espuma frente al colapso, mientras que E4M aceleró el colapso con respecto a la proteína, SP sola (Tabla 3). La gran estabilización, podría atribuirse a la gran elasticidad dilatacional de las películas mixtas de SP +  $\lambda$ C (Figura 4 a), que podría reflejar el complejamiento interfacial del  $\lambda$ C sobre la proteína adsorbida.

Ciertamente, otras características de la estructura de las películas como el espesor y el tipo de uniones involucradas en la gelificación de las películas deben determinar además de las propiedades reológicas de las películas, la estabilidad de las películas a la ruptura.

Las proteínas de soja en la interfase pueden interactuar generando agregados estables (Carp y col., 1999) mediante uniones hidrofóbicas y covalentes (generalmente uniones disulfuro).

El reemplazo de moléculas proteicas en la interfase por moléculas de HPMC, influiría sobre la posibilidad de estructuración en forma continua de la película proteica (Pérez y col., 2007). Por otro lado, la gelificación interfacial de la HPMC no involucra enlaces covalentes, siendo mediado por interacciones hidrofóbicas principalmente entre los grupos metilo (Pérez y col., 2006). Este tipo de uniones serían más lábiles que las de tipo covalente.

En el caso del agregado de PS a la proteína hidrolizada H2 (GH=5,35%) se ha mostrado en la Figura 13 b, que el agregado de GG mejora más la viscoelasticidad de la película que el  $\lambda$ C que no la modifica. Sin embargo, la Tabla 6 muestra que GG no aumentó más que los demás PS el tiempo de colapso para los hidrolizados con GH 5 y 5,75%.

Debe considerarse que la estabilidad de las espumas depende no sólo de las características de la película interfacial, sino también de la viscosidad del seno, la cual tendrá mayor impacto en espumas de baja consistencia.

Se ha señalado en trabajos anteriores que tanto las propiedades reológicas del seno de la fase como de la interfase influye en la desestabilización de espumas (Carp y col.,2001); Kloek y col., 2001). Un aumento de la viscosidad en el seno de la fase retarda el drenado de líquido y la desproporción de las burbujas puede ser retardada por la presencia de una interfase viscosa o una alta viscoelasticidad en el seno de la fase si ésta es mayor que un valor crítico.

En las Tablas 5 y 6 se observa que la goma xántica (X) que es el PS más viscoso entre los estudiados es el que produjo mayor estabilización. Martínez y col.,(2005) en forma semejante, encontraron que la estabilidad de las espumas de proteína de girasol hidrolizada y sin hidrolizar en presencia de X, estaba controlada por la alta viscosidad del seno de la espuma, debido a la existencia de un umbral de fluencia. En el presente trabajo, entre el resto de los PS estudiados en la interfase, el  $\lambda$ C es el siguiente PS más viscoso y se observa que debido a esto, las espumas de proteína de soja hidrolizada presentan la mayor estabilidad al drenado y al colapso.

En el caso de las espumas menos viscosas (por ej. en presencia de GG o E4M), las propiedades reológicas interfaciales comienzan a tener mayor peso y en consecuencia la estabilidad de las espumas estará determinada por ambos, viscosidad del seno de la espuma y de la interfase (Baeza y col.,2004).

### Conclusiones

*Desde el punto de vista práctico sería ideal adicionar a la espuma proteica un polisacárido que aumentara simultáneamente la CE y la estabilidad de la espuma al drenado de líquido y colapso. En las concentraciones estudiadas ningún polisacárido cumplió con todas estas condiciones ni en presencia de SP ni de la proteína de soja hidrolizada.*

*El efecto de los PS en las propiedades de espumado dependió del grado de hidrólisis de la proteína y del tipo de PS de una manera compleja. Los polisacáridos que aportan significativa viscosidad en la fase continua, se caracterizan por estabilizar las espumas pero reducir la CE y especialmente en los menores grados de hidrólisis estudiados. Sin embargo, si la viscosidad aportada por el PS es menor, las propiedades relacionadas a las características de las películas interfaciales comenzarían a prevalecer en una forma compleja que depende del tipo de proteína, GH de la proteína, PS agregado y concentración de ambos biopolímeros.*

*La goma xántica (X) y el  $\lambda$ C que son los polisacáridos más viscosos entre los estudiados, son los que produjeron en general mayor estabilización; en estos casos la estabilidad de las espumas de proteína estaría controlada principalmente por la alta viscosidad del seno de la espuma. En el caso de las espumas menos viscosas, las propiedades reológicas interfaciales comienzan a tener mayor peso y en consecuencia la estabilidad de las espumas estará determinada por ambos, viscosidad del seno de la espuma y propiedades reológicas de la interfase.*

*Se puede concluir que la estabilidad de la espuma será la resultante entre la contribución del PS a la viscosidad del seno de la fase continua y a la viscoelasticidad y/o elasticidad de las películas interfaciales. Por encima de una concentración crítica de PS, la cual dependerá de la estructura/viscosidad del PS, la estabilidad de la espuma será controlada por la viscosidad en el seno de la fase.*

*Esto indica que la estabilidad de las espumas proteicas en presencia de polisacáridos se relaciona en forma compleja a las propiedades de las interfases y viscosidad de la fase continua, no pudiendo establecerse a priori un patrón general de comportamiento.*

*Los estudios realizados referentes al impacto de los polisacáridos en las propiedades de las interfases estabilizadas por la proteína de soja hidrolizada y sin hidrolizar, indican que*

*más allá del rol de los polisacáridos como agentes espesantes, tanto los PS tensioactivos como los no tensioactivos, tienen una influencia directa en la interfase aire-agua, promoviendo una mejora de las propiedades de las películas cuando se usan en combinación con proteína de soja.*

*Sin embargo la naturaleza de las interacciones proteína-polisacárido es fuertemente afectada por el GH de la proteína de soja, aún en un pequeño rango como el estudiado (2-5,35%). La presión superficial y viscoelasticidad de las películas de la proteína menos hidrolizada H1, aumentó en presencia de los polisacáridos, sin embargo la de H2 se redujo o no se modificó. Esto indica que una hidrólisis limitada es suficiente para mejorar las propiedades de la interfase aire-agua cuando la proteína se usa en combinación con polisacáridos.*

### ***Capítulo III***

*Estudio del efecto combinado de proteína de soja hidrolizada y polisacáridos en las propiedades de espumado y de la fase continua de las espumas*

### ***III.1 Estudio del efecto combinado de proteína de soja hidrolizada y polisacáridos en las propiedades de espumado***

La clara de huevo es el agente de batido por excelencia debido a que presenta las siguientes propiedades: muy buena capacidad de espumado, una buena estabilidad al drenado de líquido y colapso de la espuma aún a temperaturas de cocción, capacidad de gelificación por calor, lo cual permite fijar la estructura espumada.

Sería de gran utilidad poder usar sustitutos de la clara de huevo en base a hidrolizados de proteína de soja. Para ello es de fundamental importancia poder simular las propiedades que posee la clara de huevo.

La proteína de soja hidrolizada podría utilizarse con este fin dado su buena capacidad de espumado, como se ha demostrado en el apartado I.1.3 del Capítulo I. Al hidrolizar la proteína de soja, si bien se mejora su capacidad de espumar y la estabilidad al drenado de líquido, se promueve un colapso más rápido de la espuma. Por ello la adición de polisacáridos que aumenten la estabilidad de la espuma, constituye una posible alternativa para desarrollar ingredientes de batido que puedan asemejar a la clara de huevo. Otro inconveniente de la proteína de soja hidrolizada es que no gelifica por calentamiento por lo cual la espuma se desestabilizaría durante un proceso de cocción. Para compensar estas deficiencias de la proteína de soja hidrolizada se decidió utilizar en combinación con ella un tipo de HPMC (E4M) y un carragenano ( $\kappa$ C). La HPMC se seleccionó debido a su capacidad de gelificar durante el calentamiento. Esta propiedad podría brindar una estabilidad a la espuma cuando se la somete a procesos de cocción. Por el contrario, el  $\kappa$ C debido a su propiedad de gelificar en frío, contribuiría a aumentar la estabilidad a temperatura ambiente y bajo refrigeración. El  $\kappa$ C es usado por tal motivo, para la estabilización y formación de estructura en productos espumados refrigeradas como mousses y merengues. El uso de polisacáridos gelificantes como el  $\kappa$ C para la formulación de espumas basadas en proteínas, permite el diseño de productos espumados con temperaturas específicas de fusión y gelificación brindando características sensoriales específicas de los productos y estabilidad.

Se trabajó con un hidrolizado de proteína de soja con GH= 4% (H3). Para simular condiciones de horneado de la espuma (70°C) o enfriado en heladera (10°C) se estudió la estabilidad de las espumas en esas condiciones de temperatura.



A fin de estudiar el comportamiento combinado de H3, E4M y  $\kappa$ C se utilizó un diseño experimental basado en una red de Doehlert (Doehlert, 1970). Se utilizó la metodología de superficies de respuesta, que permite analizar el efecto de la concentración de cada componente y sus interacciones. Esta metodología ha sido empleada para el estudio de sistemas mixtos de  $\kappa$ C en presencia de proteínas del lactosuero (Tziboula y col, 1998a), en caseínas (Lundin y col., 1998), mezclas de  $\beta$ -lactoglobulina y alginatos de propilglicol (Baeza y col, 2002), proteínas de la clara de huevo (Kobylanski y col, 2004).

La concentración de proteína hidrolizada (H3) varió desde 2 a 10% p/p; la concentración de E4M varió desde 0,2 a 1,8% p/p y la de  $\kappa$ C desde 0,2 a 1,8% p/p.

#### *Propiedades de espumado*

La CE de las mezclas se evaluó a 60°C, temperatura a la cual el  $\kappa$ C no se encuentra gelificado (Morris y col., 1980). La estabilidad al drenado de líquido y colapso de las espumas se evaluó a 70°C mediante dos parámetros: el tiempo que tardan las espumas en comenzar a drenar, llamado tiempo lag (t.lag d.) y el tiempo requerido para que las espumas drenen un 20% del líquido total que pueden drenar (t<sub>20%</sub>), calculándose la velocidad de drenado como  $1/t_{20\%}$

PE*	H3	E4M	$\kappa$ C	CE(%)	t. lag d. (min)	Vel. dren (min <sup>-1</sup> )
1	6	1	1	150	14	2,78.10 <sup>-2</sup>
2	6	1,8	1	55	8	2,22.10 <sup>-2</sup>
3	6	0,2	1	55	11,5	4,26.10 <sup>-2</sup>
4	10	1,4	1	90	94	0,37.10 <sup>-2</sup>
5	2	0,6	1	140	9	5,71.10 <sup>-2</sup>
6	2	1,4	1	150	1,25	4,88.10 <sup>-2</sup>
7	10	0,6	1	60	16,71	1,56.10 <sup>-2</sup>
8	7,33	1,4	1,8	70	52	0,91.10 <sup>-2</sup>
9	4,67	0,6	0,2	250	8,5	7,27.10 <sup>-2</sup>
10	4,67	1,4	0,2	260	15,5	2,94.10 <sup>-2</sup>
11	8,67	1	0,2	200	13	3,85.10 <sup>-2</sup>
12	7,33	0,6	1,8	85	20,6	1,67.10 <sup>-2</sup>
13	3,33	1	1,8	150	15	3,28.10 <sup>-2</sup>
14	6	1	1	120	15,5	2,76.10 <sup>-2</sup>
15	6	1	1	110	16	3,00.10 <sup>-2</sup>

**Tabla 1:** Estabilidad al drenado de líquido correspondiente a los 15 puntos experimentales. \* Punto experimental.

En la Tabla 1 se observa que las mayores CE se obtienen en mezclas donde el  $\kappa$ C está en menor concentración y las menores CE en aquellas donde el  $\kappa$ C se encuentra en alta concentración. En algunos de estos casos (PE 10 y 11) E4M y H3 se encuentran en alta proporción, sin embargo, la reducida cantidad de  $\kappa$ C se asocia a un gran volumen de espuma. La adición de  $\kappa$ C decreció la expansión de las espumas por limitar la incorporación de aire a causa de la alta viscosidad de las soluciones. Se ha reportado un comportamiento similar para espumas de proteínas de soja sin hidrolizar, en presencia de goma xántica (Carp y col., 2001).

El colapso de las espumas se calculó como el tiempo requerido para el comienzo del descenso de la espuma (t.lag c.) y el tiempo que transcurre hasta que la altura de la espuma desciende 2 ml (t.col).

La Tabla 2 muestra los parámetros que describen la estabilidad al colapso de las espumas.

PE*	H3	E4M	$\kappa$ C	t.lag c.(min)	t.col. (min)
1	6	1	1	17,5	125
2	6	1,8	1	63,5	220
3	6	0,2	1	27,5	157
4	10	1,4	1	58,5	235
5	2	0,6	1	57,5	110
6	2	1,4	1	41,8	60
7	10	0,6	1	11,5	101
8	7,33	1,4	1,8	10,8	45
9	4,67	0,6	0,2	100	150
10	4,67	1,4	0,2	111	135
11	8,67	1	0,2	146,5	155
12	7,33	0,6	1,8	115,2	162
13	3,33	1	1,8	26,5	107
14	6	1	1	15,5	123
15	6	1	1	17	115

**Tabla 2:** Estabilidad al colapso correspondiente a los 15 puntos experimentales. \* Punto experimental.

Los resultados en este caso no mostraron a simple vista una tendencia definida.

Mediante análisis de regresión lineal múltiple, se obtuvieron los coeficientes de regresión para cada variable dependiente, los cuales se detallan en la Tabla 3.

	CE	t.lag d.	Vel. dren	t.lag c.	t.col.
Constantes	125,278	13,177	0,0305	13,4154	116,956
<i>Lineales</i>					
H3	-51,6581**	27,2121*	(-0,0034)	13,2971*	34,3211*
E4M	(5,9975)	11,4327*	(-0,0035)	-3,6920*	11,5615**
$\kappa C$	-81,6699*	11,8026*	(-0,0001)	-39,4489*	-22,6295*
<i>Cuadráticos</i>					
H3 <sup>2</sup>	(6,2334)	19,0883*	(0,0011)	12,0165*	(-9,4719)
E4M <sup>2</sup>	(-69,783)	(-2,71804)	(0,0017)	33,244*	72,986*
$\kappa C^2$	83,3121*	9,66643*	0,0235*	99,7478*	(1,6632)
<i>Interacciones</i>					
(H3).(E4M)	(3,1091)	53,2197*	0,0356*	56,7601*	94,831*
(H3).( $\kappa C$ )	(9,1924)	14,3565*	0,0247**	-23,9276*	-56,9654*
(E4M).( $\kappa C$ )	(-13,3235)	(0,88448)	0,0593*	-83,1677*	-86,7147*
R <sup>2</sup>	0,9646	0,8529	0,8965	0,8397	0,7279
Lack of fit	NS	*	NS	*	*

Tabla 3: Coeficientes de regresión del modelo para las propiedades de espumado. \* significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* significativo ( $p < 0,06$ ); ( ) no significativo.

En la mayoría de los casos los coeficientes R<sup>2</sup> fueron altos y el “lack of fit” resultó no significativo (en el caso de la CE y de la velocidad de drenado) lo que significa que los modelos fueron capaces de explicar más del 80% de las respuestas observadas. En algunos casos el “lack of fit” resultó significativo, indicando que el orden de la ecuación no resultó secundario para esas variables estudiadas (el modelo no había incluido todas las funciones apropiadas de las variables independientes o el dominio experimental era demasiado grande para usar un modelo cuadrático). De todos modos, aún con un “lack of fit” significativo, el modelo puede ser usado si se tiene suficiente cantidad de datos (Box y Draper, 1987).

Las variables con  $p < 0,05$  y  $p < 0,06$  fueron utilizados para elaborar las ecuaciones de regresión reducidas, que se muestran en la Tabla 4.

<b>Propiedades de espumado</b>	<b>CE</b> = 125,3 -51,7 H3 -81,7 κC + 83,3 κC <sup>2</sup>
	<b>t.lag d.</b> = 13,2 + 27,2 H3 + 11,4 E4M + 11,8 κC + 19,1 H3 <sup>2</sup> + 9,7 κC <sup>2</sup> +53,2 H3.E4M + 14,4 H3. κC
	<b>Vel. dren.</b> = 0,0305 + 0,0235 κC <sup>2</sup> + 0,0356 H3.E4M + 0,0247 H3.κC + 0,0593 E4M.κC
	<b>t.lag c.</b> =13,4 +13,3 H3 - 3,7 E4M - 39,4 κC + 12,0 H3 <sup>2</sup> + 33,2 E4M <sup>2</sup> + 99,7 κC <sup>2</sup> + 56,7 H3.E4M - 23,9 H3.κC - 83,2 E4M.κC
	<b>t.col.</b> = 117,0 + 34,3 H3 + 11,6E4M - 22,6 κC + 73,0 E4M <sup>2</sup> + 94,8 H3.E4M - 57,0 H3.κC - 86,7 E4M.κC

Tabla 4: Modelos reducidos para las propiedades de espumado.

En el caso de la CE se observa la existencia de una variable lineal significativa para el κC. El coeficiente de regresión negativo indica que la adición del κC produce una reducción de la CE y su alto valor indica que ésta es la variable que más influye en la CE. También se observa un término lineal negativo significativo correspondiente a H3 lo cual también indica una disminución de la CE al aumentar la concentración de H3. El valor positivo en el término cuadrático para κC indica que la CE presenta un mínimo con la adición de κC, lo cual coincide con las observaciones cualitativas respecto a la Tabla 1. No se encontraron efectos de interacción entre las variables.

Respecto al t.lag de drenado de líquido, se observa una influencia significativa de todos los componentes. El coeficiente de regresión lineal positivo para H3, E4M y κC indica que a medida que aumenta la concentración de estos componentes el tiempo lag de drenado aumenta. H3 debido al mayor valor de su coeficiente de regresión es la variable que más pesa en el t.lag d. Los términos cuadráticos positivos en el caso de H3 y κC indican la presencia de un mínimo. Por otro lado, se aprecian efectos de interacción sinérgica entre H3-E4M y H3-κC, siendo mayor este efecto en el primer caso.

Para la velocidad de drenado de líquido no se observaron efectos lineales significativos ( $p < 0,05$ ). El efecto cuadrático positivo que resulta de la adición de κC indica la presencia de

un mínimo. Además, resultaron significativas la interacción de H3 con E4M, E4M con  $\kappa$ C y H3 con  $\kappa$ C, provocando efectos antagónicos por aumentar la velocidad de drenado.

En el t.lag de colapso, H3 tuvo un efecto lineal positivo, aumentando el t. lag c. con su adición, mientras que un aumento de la concentración de E4M y  $\kappa$ C provocó un descenso del t.lag de colapso. La variable de más peso resultó el  $\kappa$ C debido a que presenta un coeficiente de regresión mucho mayor. Los efectos cuadráticos positivos de los tres componentes, indican la presencia de un mínimo en el t.lag de colapso con la adición de cada uno de ellos. Se aprecian efectos de interacción sinérgica entre H3-E4M debido a que la mezcla produjo aumento en el t.lag de colapso, reflejado en el coeficiente positivo. Al mismo tiempo, las interacciones entre H3- $\kappa$ C y E4M- $\kappa$ C resultaron antagónicas, dado el valor negativo de los correspondientes coeficientes, siendo mayor en el último caso.

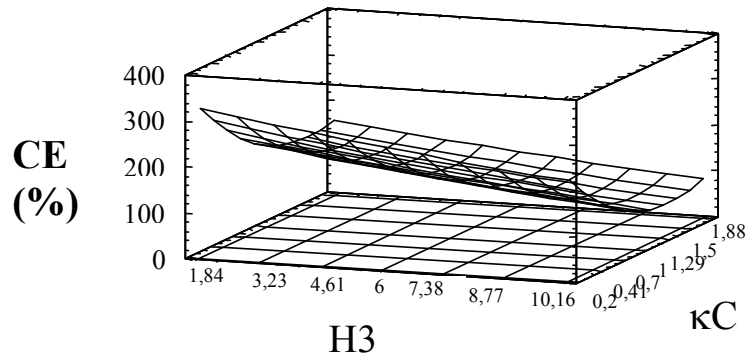
La presencia de H3 y  $\kappa$ C tuvo efectos lineales sobre el tiempo necesario para colapsar 2 ml de espuma. El valor positivo del coeficiente de regresión lineal para H3 indica un aumento del tiempo de colapso con el aumento de la concentración de H3. En cambio,  $\kappa$ C presentó un efecto negativo disminuyendo el t.col con el aumento de su concentración. Además se observa un efecto lineal positivo ( $p < 0,06$ ) debido a la adición de E4M, es decir, el t.col aumenta con el aumento de la concentración de E4M. Por otro lado, E4M presentó un efecto cuadrático positivo, lo que indica la existencia de un mínimo.

Se observaron efectos de interacción entre los tres componentes estudiados. La interacción de H3 y E4M produjo efectos sinérgicos dado al valor positivo del coeficiente obtenido. Por el contrario, las mezclas H3- $\kappa$ C y E4M- $\kappa$ C interaccionaron en forma negativa, disminuyendo el t.col, destacándose E4M- $\kappa$ C por el mayor valor del coeficiente de regresión.

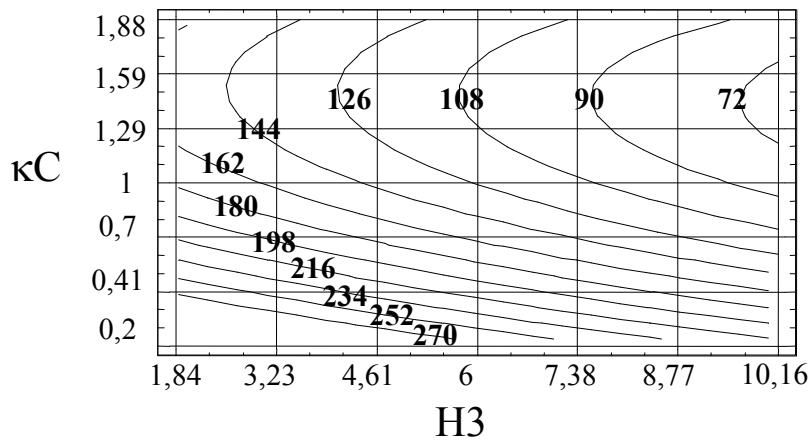
En todas las propiedades estudiadas la presencia de E4M resultó no significativa o bien si fue significativa presentó el menor coeficiente de regresión. Por tal motivo se mantuvo constante en su valor central para generar las superficies de respuesta y los gráficos de contorno para todas las respuestas.

En la Figura 1 a-b se muestran la superficie de respuesta (a) y las líneas de isorespuesta (b) para la CE.

**a**



**b**



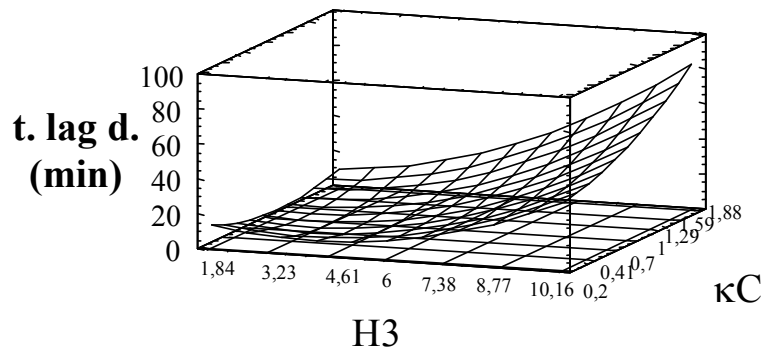
**Figura 1:** Superficie de respuesta (a) y líneas de isorespuesta (b) para la CE, en función de la concentración de H3 y  $\kappa$ C (E4M=1%).

Los resultados muestran que las mayores capacidades de espumado se obtienen cuando H3 y  $\kappa$ C se encuentran en baja concentración. Las líneas de isorespuesta (Figura 1 b) muestran que fijando cualquier valor de H3, al aumentar la concentración de  $\kappa$ C se produce una disminución de la CE mucho más marcada (con la presencia de un mínimo al aumentar la concentración de  $\kappa$ C) que a la inversa, es decir, fijando  $\kappa$ C en un valor y analizando la CE

con el aumento de la concentración de H3. Esto indica que el aumento del  $\kappa C$  es más significativo en la reducción de la CE que el aumento de la concentración de H3. Sin embargo, comparando con el valor de la CE obtenido cuando el hidrolizado se encuentra solo (2% de concentración, CE=200%), puede decirse que las combinaciones de polisacáridos más favorables para no producir una reducción en la CE podrían extenderse hacia altas concentraciones de H3, pero con concentraciones de  $\kappa C$  menores al 1% .

En la Figura 2 a-b se muestran los gráficos para el tiempo lag de drenado (t.lag d.) de las espumas.

a



b

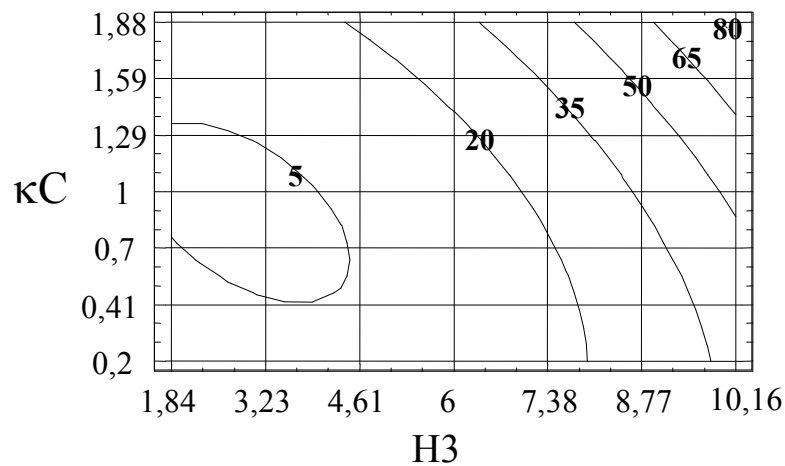
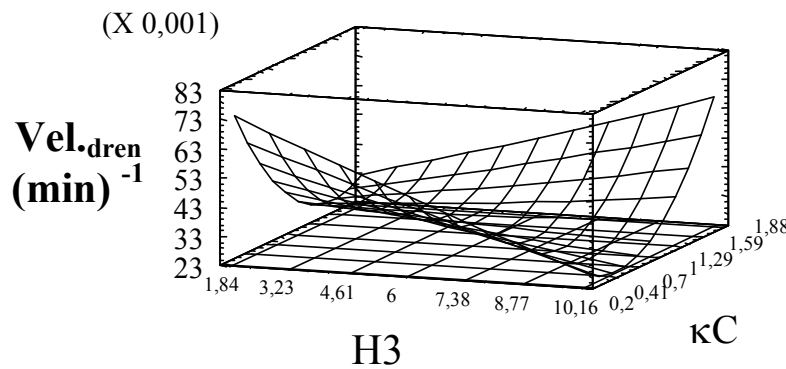


Figura 2: Superficie de respuesta (a) y líneas de isorespuesta (b) para el t.lad d. en función de la concentración de H3 y  $\kappa C$  (E4M=1%).

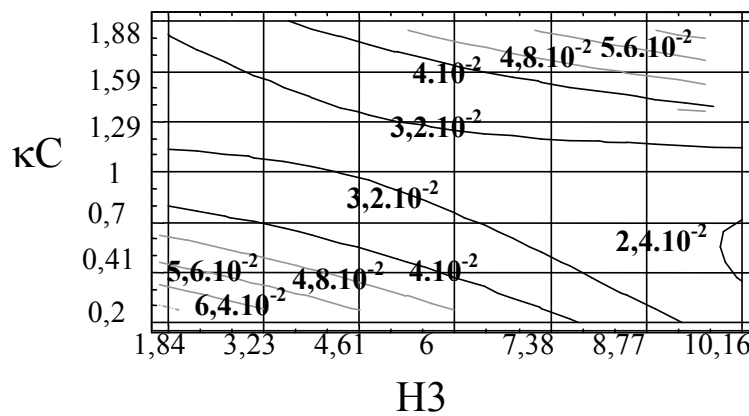
El t.lag de drenado está apreciablemente influenciado por el aumento de H3 y  $\kappa C$  simultáneamente. Fijando un valor de  $\kappa C$ , el t.lag de drenado aumenta con el aumento de H3 en mayor proporción que si se fija un valor de H3 y se analiza el aumento de dicho tiempo con el aumento de la concentración del  $\kappa C$ . Esto indica que H3 tiene un mayor efecto sobre la respuesta estudiada. Además se observa un efecto de interacción muy grande entre ambos componentes, más claramente apreciable en la Figura 2 b .

En la Figura 3 se muestran los gráficos para la velocidad de drenado ( $Vel_{dren}$ ) de las espumas.

a



b



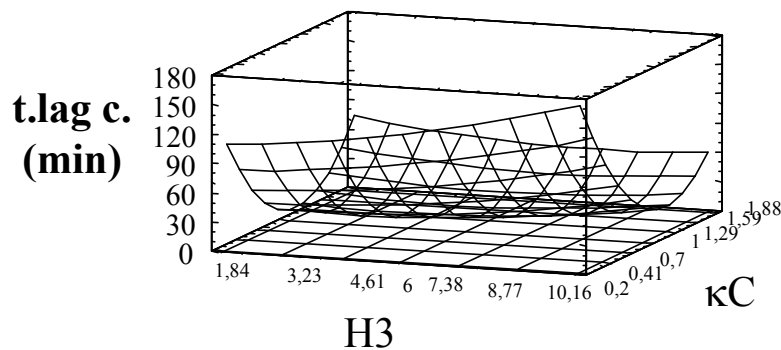
**Figura 3:** Superficie de respuesta (a) y líneas de isorespuesta (b) para la  $Vel_{dren}$  en función de la concentración de H3 y  $\kappa C$  (E4M=1%).

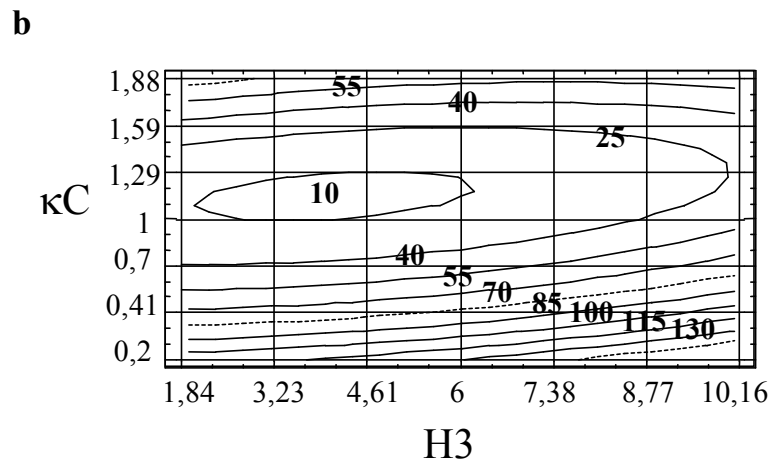


La velocidad de drenado de líquido de las espumas es mínima en un amplio rango de combinaciones de H3 y  $\kappa$ C (Figura 3 a y b). Fijando un valor de concentración de H3 y analizando la respuesta de la variable con el aumento de la concentración de  $\kappa$ C, se aprecia que la velocidad de drenado cambia más rápidamente que haciendo el análisis inverso. Por lo tanto, la presencia del  $\kappa$ C es más significativa que la de H3 sobre esta respuesta. Sin embargo, las diferencias encontradas no son tan significativas comparando con el t.lag d. (Figura 2 a-b). El t.lag d. demostró presentar variaciones más marcadas con el aumento de las componentes, siendo por lo tanto un mejor índice de drenado de las espumas a 70°C, dado que los valores alcanzados de t.lag d. (80 minutos) permitirían eventualmente la cocción de una espuma sin que comience a drenar. Por tal motivo, la velocidad de drenado no sería tan relevante. Esto es de gran importancia teniendo en cuenta que si el valor de velocidad de drenado para el hidrolizado H3 (2% de concentración), fue de  $1.10^{-2}$  (ml.min)<sup>-1</sup> la adición de los polisacáridos en su mayoría hubiera perjudicado notablemente esta magnitud.

En la Figura 4 se muestran los gráficos para el tiempo lag de colapso (t.lag c.) de las espumas.

a





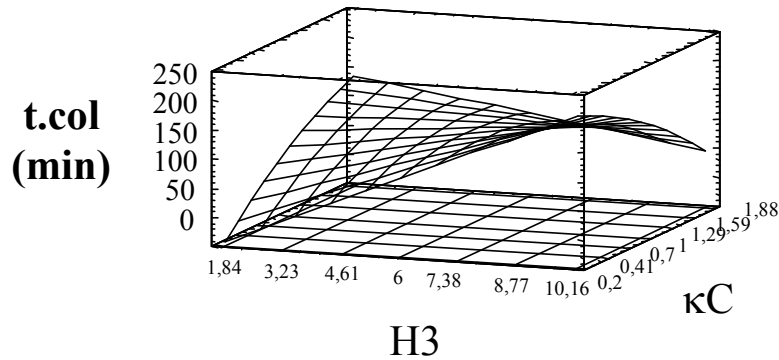
**Figura 4:** Superficie de respuesta (a) y líneas de isorespuesta (b) para el t.lad c., en función de la concentración de H3 y  $\kappa C$  (E4M=1%).

La variable que aumenta en mayor grado el t.lag c. es a la concentración de H3, mientras que  $\kappa C$  disminuye este tiempo pero en menor magnitud. Esto se observa al fijar un valor de  $\kappa C$  y aumentando H3, mientras que fijando la concentración de H3, el aumento de la concentración de  $\kappa C$  produce una muy marcada disminución de la respuesta, que se acentúa aún más a altas concentraciones de H3. Además a estas menores concentraciones se aprecia un mínimo en el t.lag c., el cual se aprecia mejor en la Figura 4 a, la cual muestra una evidente curvatura.

Teniendo en cuenta que el t.lag c. del hidrolizado solo (2% de concentración) fue de 1,30 minutos, se podría inferir que el agregado de los polisacáridos promueve una mayor estabilidad al inicio del colapso, lo cual es sumamente importante en sistemas que son sometidos a cocción.

En la Figura 5 se muestran los gráficos para el tiempo colapso (t. col.) de las espumas.

a



b

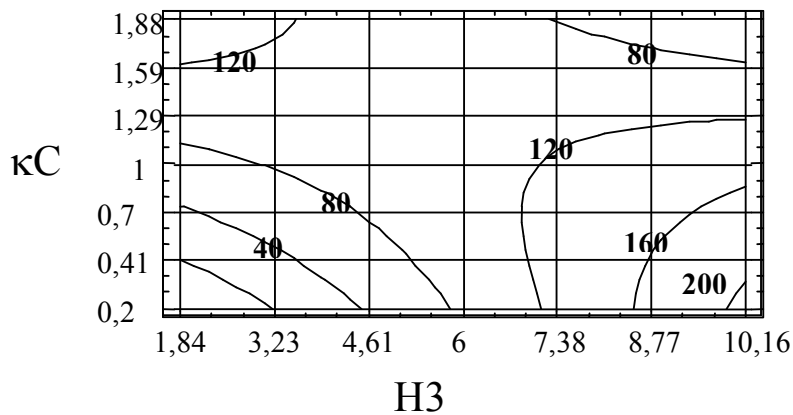


Figura 5: Superficie de respuesta (a) y líneas de isorespuesta (b) para el t.col. en función de la concentración de H3 y  $\kappa C$  (E4M=1%).

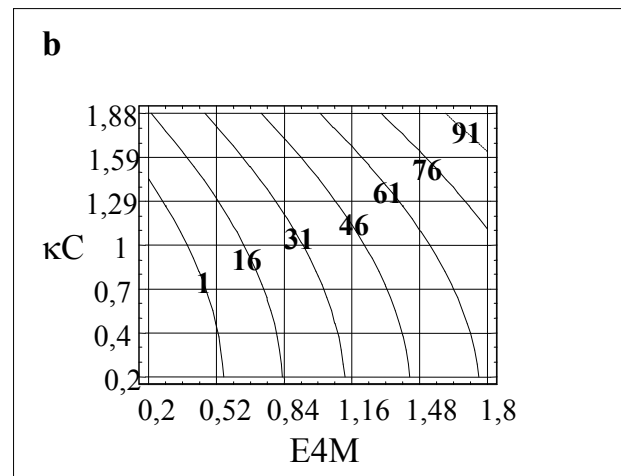
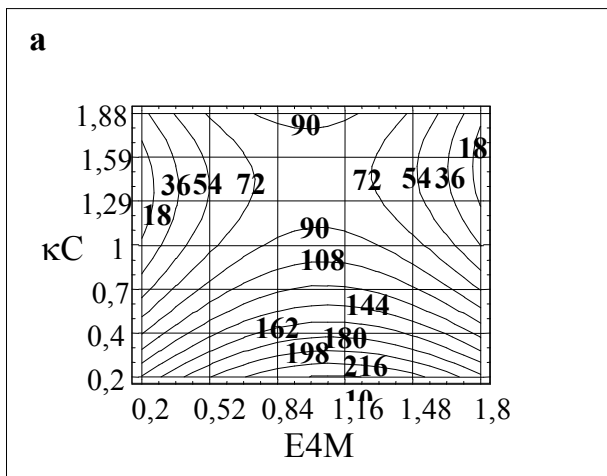
La Figura 5 muestra que el efecto de la adición de cada componente depende de la concentración del otro debido a la gran cantidad de interacciones entre los componentes. Esto significa que a bajas concentraciones de H3, el aumento de  $\kappa C$  produce un incremento del t.col, mientras que fijando un valor alto de la concentración de H3, el aumento del  $\kappa C$  promueve una reducción del t.col. De todas formas, hay que destacar que al igual que en el caso del t.lag d., los valores obtenidos para el t.lag c. son lo suficientemente altos como para alcanzar la cocción sin que la espuma comience a colapsar.

Las concentraciones más favorables para incrementar el t.col son una baja concentración de  $\kappa C$  y alta de H3, lo cual se observa claramente en la Figura 5 b.

De este análisis surgen cuales serían las concentraciones indicadas de los componentes más significativos (H3 y  $\kappa C$ ) para optimizar las propiedades de espumado.

Del análisis comparativo de los gráficos de contorno para la CE (Figura 1 b), t.lag d. (Figura 2 b) y t.lag c. (Figura 3 b) se puede inferir que para obtener una CE no menor al 200% (es decir, no menor a la CE del hidrolizado solo) y que las espumas presenten al mismo tiempo un t.lag para el drenado y colapso considerables, de tal forma que resistan un proceso de cocción (70°C) sin desestabilizarse, la concentración de H3 debe ser alta (>7%) y la de  $\kappa C$  inferior al 0,7 %. En estas mezclas que además contienen 1% de E4M, se pueden lograr espumas que sometidas a un proceso de cocción a 70°C, tarden entre 20 y 50 minutos en comenzar a drenar y entre 100 y 130 minutos en comenzar a colapsar.

Para corroborar el análisis recién expuesto, se obtuvieron las líneas de isorespuesta dejando fija la concentración de H3 en un valor alto (8,67%). La Figura 6 a-c muestra dichos gráficos para la CE, el t.lad d. y el t.lag c.



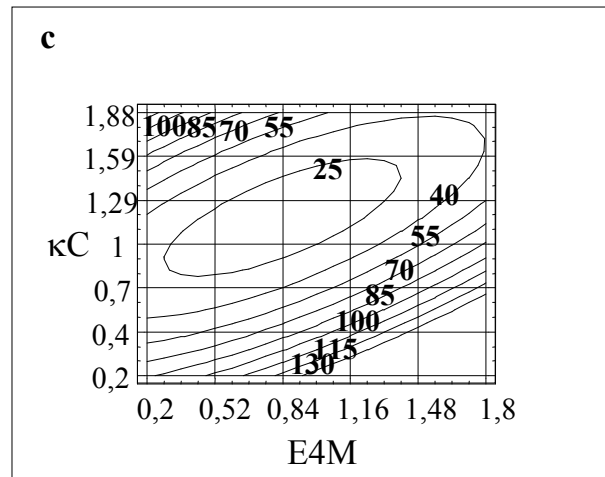
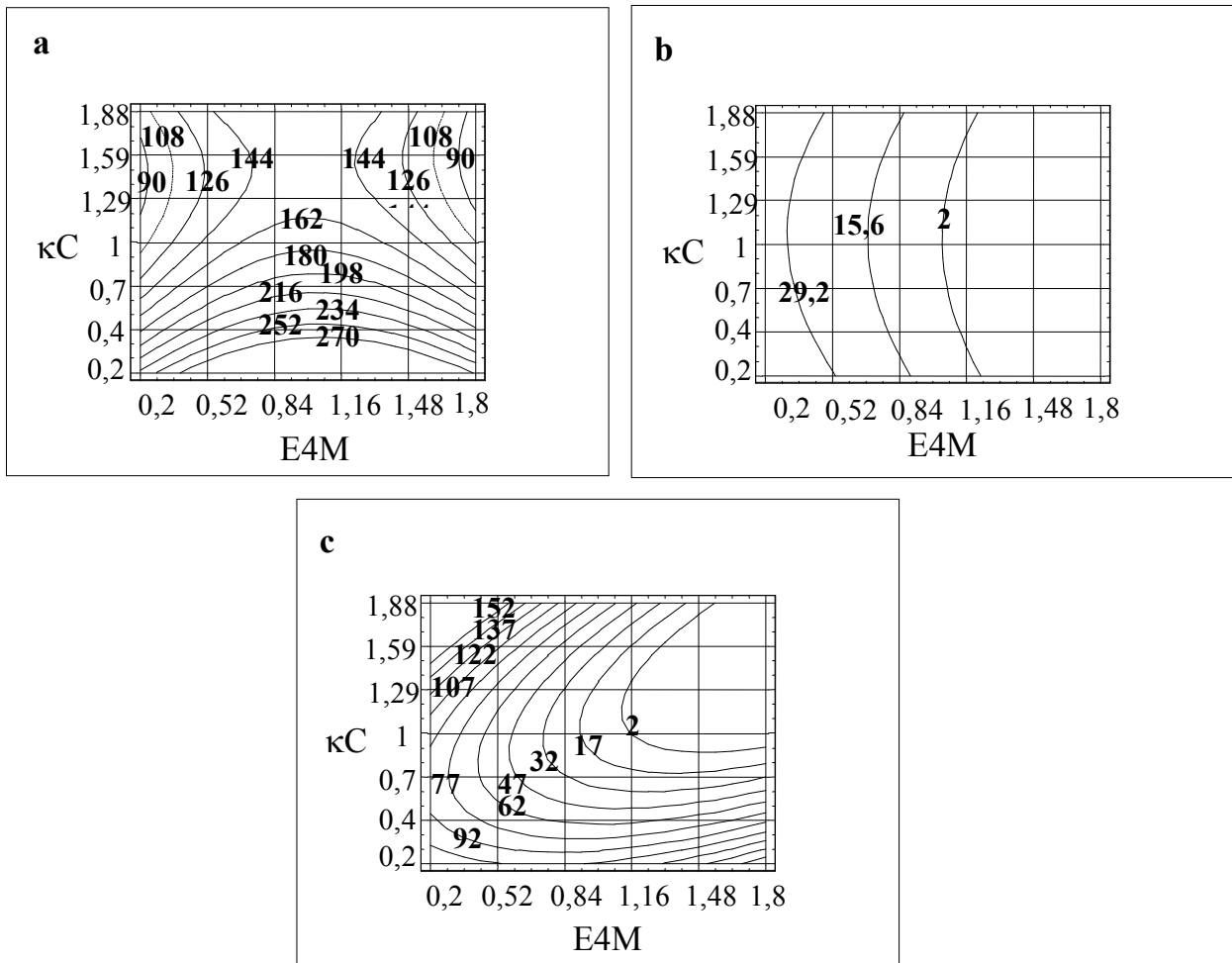


Figura 6: Líneas de isorespuesta en función de la concentración de los polisacáridos a una concentración fija de H3 (8,67%), para la CE (a), el t.lag d.(b) y el t.lag c.(c).

Del análisis de los gráficos se concluye que manteniendo una alta concentración de H3, el  $\kappa C$  a altas concentraciones aumenta el t.lag d. pero reduce el t.lag c. y la CE simultáneamente, por lo tanto este polisacárido debe estar en un rango de concentraciones bajo, entre 0,2 y 0,5%. Al mismo tiempo, E4M en las mismas condiciones de alta concentración de H3, no tiene tanta influencia sobre la CE (Figura 6 a), pero sí la presenta sobre los tiempos lag (Figura 6b y c), observándose una dependencia con la concentración de  $\kappa C$  de tal manera, que las concentraciones óptimas para dicho polisacárido serían altas, en un rango entre 1,5 y 1,8%.

Se efectuó el mismo análisis fijando la menor concentración de H3 utilizada (2%). Se obtuvieron las líneas de isorespuesta, las cuales se muestran en la Figura 7 a-c, para la CE, el t.lad d. y el t.lag c.



**Figura 7:** Líneas de isorespuesta en función de la concentración de los polisacáridos a una concentración fija de H3 (2%), para la CE (a), el t.lag d.(b) y el t.lag c.(c).

En los gráficos se observa que las mayores CE en este caso (Figura 7 a) se obtienen a bajas concentraciones de  $\kappa C$  ( $< 0,5\%$ ) al igual que sucedía en el caso de mantener constante una alta concentración de H3 (Figura 6 a). Sin embargo, en este caso los valores de CE son mayores.

La concentración de E4M tampoco presenta tanta influencia sobre la CE al igual que en el caso de tener una alta concentración de H3.

Respecto a los tiempos lag de drenado y colapso la influencia de los polisacáridos a baja concentración de H3, presenta un comportamiento distinto. Se observa en las Figuras 7 b y

c que los mayores valores de t.lag d. y lag c. se obtienen en un amplio rango de concentraciones de estos polisacáridos. En el caso del t.lag d. (Figura 7 b),  $\kappa$ C no presenta influencia, mientras que E4M se optimiza en el rango de concentraciones entre 0,2 y 0,5%. En el t.lag c. (Figura 7 c) tanto  $\kappa$ C como E4M influyen mucho, maximizándose t.lag c. a bajas concentraciones de E4M (< 0,5%) y altas de  $\kappa$ C (> 0,5%).

Comparando los valores obtenidos de CE, el t.lag d. y t.lag c., de las espumas preparadas a partir del hidrolizado H3 al 2% de concentración (CE=200%; t.lag d.=5 minutos y t.lag c.=1,30 minutos) con el de las espumas con adición de  $\kappa$ C y E4M, se concluye que el agregado combinado de estos dos polisacáridos estudiados es una estrategia adecuada para generar espumas en base a hidrolizados proteicos con una elevada estabilidad al drenado y colapso bajo condiciones de calentamiento, sin reducir la CE. Por otro lado, esta espuma bajo refrigeración presentaría una alta estabilidad debido a la gelificación del  $\kappa$ C. Por ejemplo para mantener una CE no menor al 200% (H3=2%) se podría utilizar  $\kappa$ C al 0,5% y E4M al 0,2-0,3%. En estas condiciones la espuma presentaría un t.lag d. de aproximadamente 30 min y un t.lag c. del orden de 70 min.

El enorme aumento de estabilidad a altas temperaturas es atribuible a un efecto combinado entre la gelificación del E4M a 70°C, y la interacción del mismo con el  $\kappa$ C, el cual aportaría efectos viscosantes a la fase continua.

### ***III.2 Propiedades reológicas y térmicas de la fase continua de las espumas***

La fase continua en una espuma comprende la fase acuosa que contiene los componentes solubles o insolubles; en este estudio esta fase es la solución acuosa de H3, E4M y  $\kappa$ C, cuyas concentraciones fueron variando de acuerdo al diseño experimental realizado. La propiedades reológicas de la fase continua son muy importantes para la estabilidad de la espuma. Una fase continua muy viscosa retardará todos los procesos de desestabilización que requieren de la difusión, como el drenado de líquido y la desproporción de las burbujas (Kinsella, 1981a).

Si la fase continua presenta umbral de fluencia o bien se encuentra gelificada, estos procesos se verán impedidos (Carp y col.,2004).

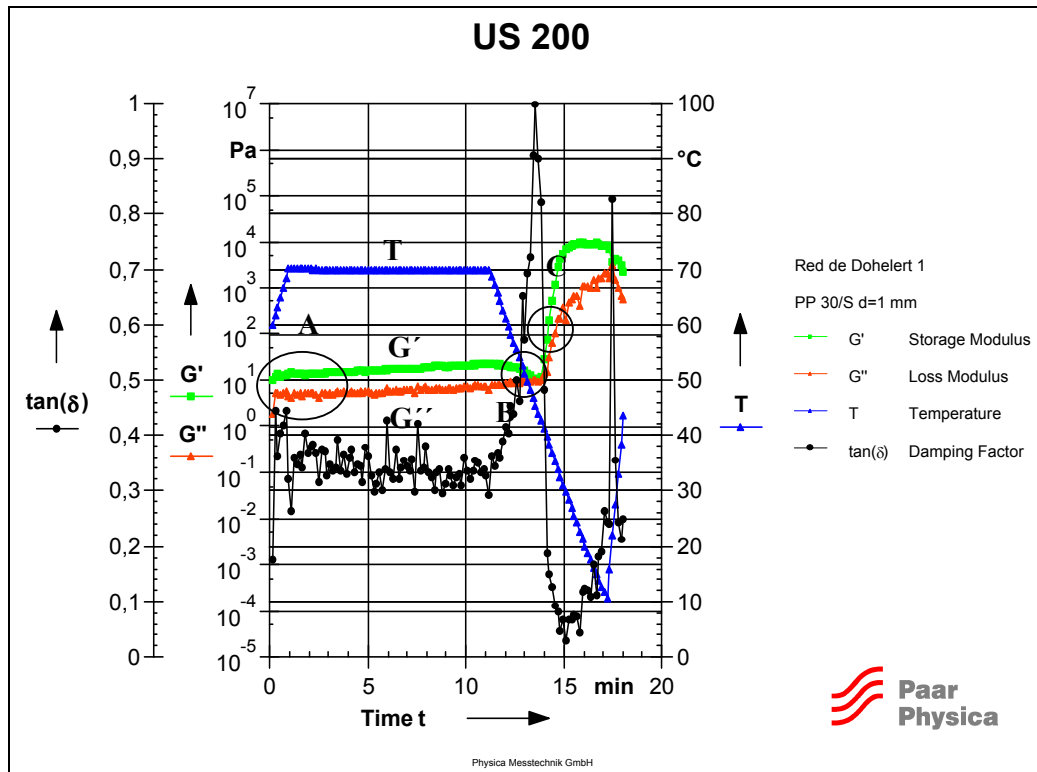
En el caso en estudio, debido a que el componente E4M gelifica durante el calentamiento y funde durante el enfriamiento y además el  $\kappa$ C gelifica durante el enfriamiento de las espumas, (usado por tal motivo para la estabilización y formación de estructuras en espumas refrigeradas, como mousses y merengues), resulta de importancia el conocimiento de las transiciones térmicas de la fase continua ya que afectarán tanto a los fenómenos de desestabilización como a las propiedades sensoriales de las espumas formuladas. En particular, la temperatura de fusión de la fase continua tendría un impacto directo durante el proceso de masticación de una espuma refrigerada en la boca (35-37°C).

Por lo tanto se determinaron mediante reometría oscilatoria las propiedades viscoelásticas y transiciones térmicas de las soluciones utilizadas para formar las espumas, las cuales revelan las propiedades de la fase continua de las espumas estudiadas anteriormente. Para ello se utilizó el mismo diseño experimental del Capítulo III.1 basado en la red de Doehlert.

Se diseñó un programa de tiempo-temperatura a fin de poder evaluar las temperaturas de gelificación y fusión de E4M como así también de gelificación de  $\kappa$ C, mediante la determinación de las componentes elástica y viscosa del módulo complejo.

La Figura 8 muestra el programa de temperatura junto a la evolución de  $G'$  y  $G''$  en el tiempo para uno de los puntos experimentales a modo de ejemplo (PE n° 6).





**Figura 8:** Evolución de la componente elástica ( $G'$ ), viscosa ( $G''$ ) y  $\tan \delta$  en función del tiempo para un punto de la red experimental. El programa comprende una etapa de calentamiento (60 a 70°C), una isotérmica (70°C) y una final de enfriamiento (desde 70 a 10°C), que se grafica en la figura (T).

En la Figura 8 se observa que desde el comienzo del ensayo  $G' > G''$  con valores de  $\tan \delta$  de aproximadamente 0,35 lo que indica que a 60°C, que es la temperatura a la cual se forma la espuma, la E4M se encuentra gelificada (indicado como A) Existen diferentes interpretaciones respecto al mecanismo de gelificación de la metilcelulosa y de las HPMCs en la literatura. La mayoría de los trabajos concuerdan que existe un mecanismo con dos pasos. El primero llamado “pregel-regime” involucra interacciones hidrofóbicas principalmente entre los grupos metilo de las moléculas de HPMC, que conducen a la formación de un “cluster”. El segundo, una etapa de “gel-regime” que corresponde a la gelificación (formación de una red) ocurre a más altas temperaturas. La transición desde una a otra etapa, ha sido observada alrededor de 50°C (Kobayashi y col.,1999). Perez y col.,(2006) han usado diferentes técnicas experimentales para caracterizar la gelificación de soluciones de HPMCs durante el calentamiento. La reometría dinámica permitió

determinar el punto gel, alrededor de 60°C. Se observó que la componente elástica  $G'$  aumentó luego y se mantuvo casi constante cerca de los 75 °C donde el desarrollo del gel de HPMC se maximizó.

Durante el período de enfriamiento (Figura 8), se observaron dos transiciones térmicas, (aunque no en todos los casos, por la superposición de fenómenos). La primera corresponde a la fusión de E4M representado por la coincidencia de  $G'$  y  $G''$  y la abrupta subida de  $\tan \delta$  (indicada como **B**).  $\tan \delta$  representa la viscoelasticidad relativa ( $G''/G'$ ) y un valor del orden de 1 como el que se muestra en la Figura 8 indica que la mezcla no es más un gel y predomina el carácter viscoso. La segunda transición térmica (indicada como **C**) corresponde a la gelificación del  $\kappa C$ , representado por una rápida subida de la componente elástica ( $G'$ ) y la abrupta disminución de  $\tan \delta$  a valores del orden de 0,1.

### III.2.1 Propiedades viscoelásticas de la fase continua de las espumas

La Tabla 5 muestra los valores obtenidos de las componentes elástica ( $G'$ ), viscosa ( $G''$ ) y  $\tan \delta$  al final de la etapa de calentamiento (70°C).

PE/Componentes	H3	E4M	$\kappa C$	$G'70^{\circ}C$	$G''70^{\circ}C$	$\tan \delta 70^{\circ}C$
1	6	1	1	20,25	5,86	0,297
2	6	1,8	1	109,17	27,5	0,298
3	6	0,2	1	10,9	5	0,378
4	10	1,4	1	37,18	9,4	0,264
5	2	0,6	1	3	0,9	0,3
6	2	1,4	1	12,8	5,54	0,337
7	10	0,6	1	9,5	3,55	0,336
8	7,33	1,4	1,8	17,6	7,17	0,408
9	4,67	0,6	0,2	3,07	1,36	0,443
10	4,67	1,4	0,2	34,7	6,78	0,222
11	8,67	1	0,2	4,6	2,3	0,5
12	7,33	0,6	1,8	2,84	1,42	0,5
13	3,33	1	1,8	38,35	12,34	0,302
14	6	1	1	18,2	6,02	0,331
15	6	1	1	17,8	6,14	0,318

Tabla 5: Propiedades viscoelásticas al final de la etapa de calentamiento (70°C) correspondientes a los 15 puntos experimentales de la red de Doehlert.

Se observa que algunas muestras (PE 5, 9, 11 y 12) presentaron valores muy bajos del módulo elástico ( $G'$ ). Estas muestras presentaron reogramas diferentes al resto de las muestras (ilustrado en la Figura 1) debido a una gran fluctuación de los valores de  $G''$  y por lo tanto de  $\tan \delta$ , indicando que en estas muestras no se llega a establecer una estructura gelificada estable.

Se realizó el análisis de regresión múltiple para las respuestas  $G'$  y  $\tan \delta$  al final de la etapa de calentamiento. Los coeficientes de regresión obtenidos se muestran en la Tabla 6.

	$G'70^{\circ}\text{C}$	$\tan \delta 70^{\circ}\text{C}$
Constantes	22,699	0,313
<i>Lineales</i>		
H3	-3,3711*	0,0893*
E4M	37,3697*	-0,0931*
$\kappa\text{C}$	(0,4462)	(0,0108)
<i>Cuadráticos</i>		
$\text{H3}^2$	-12,4348*	-0,0943*
$\text{E4M}^2$	35,9278*	(0,0257)
$\kappa\text{C}^2$	-19,1065*	0,1428*
<i>Interacciones</i>		
(H3).(E4M)	(2,2988)	0,0723**
(H3).( $\kappa\text{C}$ )	-11,5847*	(-0,0620)
(E4M).( $\kappa\text{C}$ )	-19,8397*	(0,0588)
$\text{R}^2$	0,8481	0,7376
Lack of fit	*	*

**Tabla 6:** Coeficientes de regresión del modelo para las propiedades viscoelásticas al final de la etapa de calentamiento ( $70^{\circ}\text{C}$ ).

\* significativo ( $p < 0,05$ ); \*\* significativo ( $p < 0,01$ ); ( ) no significativo.

En este caso el “lack of fit” resultó significativo para ambas respuestas, sin embargo el modelo puede ser usado si se tiene suficiente cantidad de datos (Box y Draper, 1987).

Las variables con  $p < 0,05$  y  $p < 0,01$  fueron utilizados para elaborar las ecuaciones de regresión reducidas, que se muestran en la Tabla 7.

<b>Propiedades viscoelásticas</b>	$G'70^{\circ}\text{C} = 22,7 - 3,4 H3 + 37,4 E4M - 12 H3^2 + 36 E4M^2 - 19,1 \kappa C^2 - 11,6 H3.\kappa C - 19,8 E4M.\kappa C$ $\tan \delta 70^{\circ}\text{C} = 0,3 + 0,09 H3 - 0,09 E4M - 0,09 H3^2 + 0,14 \kappa C^2 + 0,07 H3.E4M$
-----------------------------------	---

Tabla 7: Modelos reducidos para las propiedades viscoelásticas al final de la etapa de calentamiento (70°C).

El análisis de varianza del modelo completo de segundo orden para el módulo elástico ( $G'$ ) arrojó un  $R^2$  de 0,848 (Tabla 6); los términos lineales significativos fueron H3 y E4M. El valor positivo del coeficiente de regresión para E4M indica que un aumento en la concentración de HPMC provoca un aumento de  $G'$ . Sin embargo, debido a la existencia de un valor significativo en el término cuadrático, este aumento es no lineal. La variable de más peso resultó ser E4M dado al alto valor del coeficiente de regresión lineal, es decir E4M es el componente principal que determina el carácter sólido de la fase continua. Contrariamente el término lineal negativo para H3 en conjunto al término cuadrático significativo indican una disminución no lineal de  $G'$  al aumentar la concentración de H3. El  $\kappa C$  mostró un término cuadrático negativo significativo lo cual indica la existencia de un máximo al aumentar la concentración del  $\kappa C$ . Los términos de interacción significativos (H3.  $\kappa C$  y E4M.  $\kappa C$ ) presentaron valores negativos lo cual indica un efecto antagónico porque reduce el carácter elástico de la fase continua de las espumas.

El análisis de varianza del modelo completo de segundo orden para  $\tan \delta$  arrojó un valor  $R^2$  de 73,76% con un “lack of fit” significativo (Tabla 6). El valor relativamente bajo de  $R^2$  y la significancia del lack of fit señalan que el modelo no es suficientemente bueno. Además como se ha dicho anteriormente la fluctuación de  $\tan \delta$  para los PE 5, 9, 11 y 12 puede ser responsable del bajo valor de  $R^2$ . Sin embargo, su utilización y análisis resultó muy provechoso a fin de comprender cómo todos los componentes interactúan sobre la viscoelasticidad relativa ( $\tan \delta$ ) de la fase continua.

De manera similar a lo observado para  $G'$  se encontraron términos lineales significativos para los componentes H3 y E4M. En este caso los signos invertidos son esperables; el

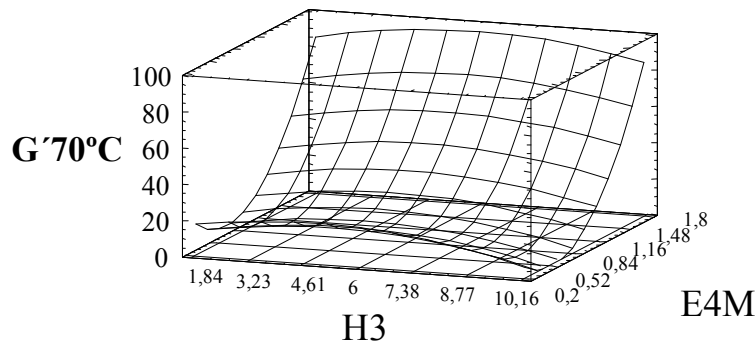
signo positivo del coeficiente de regresión para H3 indica que un aumento de su concentración produce un aumento (no lineal, dado que presenta un término cuadrático significativo) de  $\tan \delta$ , lo cual indica una fase continua menos viscoelástica. Esto se corresponde con un menor valor de  $G'$ , es decir, del carácter sólido.

Por otro lado un aumento en la concentración de E4M produce una disminución (coeficiente de regresión negativo) de la  $\tan \delta$  el cual se corresponde con el aumento de  $G'$ .

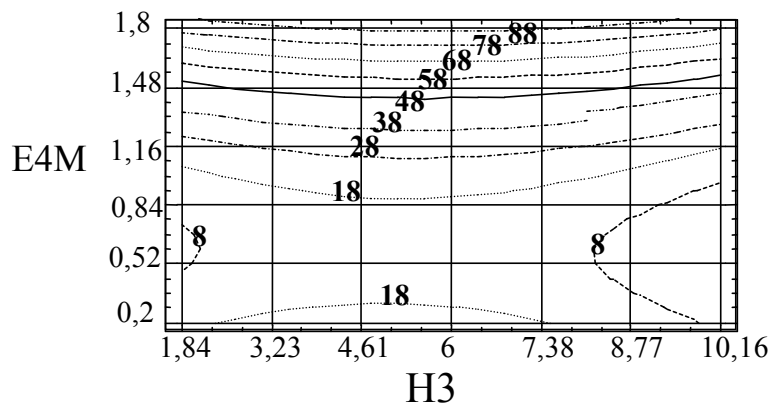
El  $\kappa C$ , también como en  $G'$ , presenta un término cuadrático significativo. En el caso de  $\tan \delta$ , el único término de interacción significativo fue el correspondiente a H3.E4M ( $p < 0,1$ ).

En las Figuras 9 a-c y 10 a-c se muestran las líneas de contorno de las respuestas estudiadas en función de los factores que resultaron significativos en cada caso.

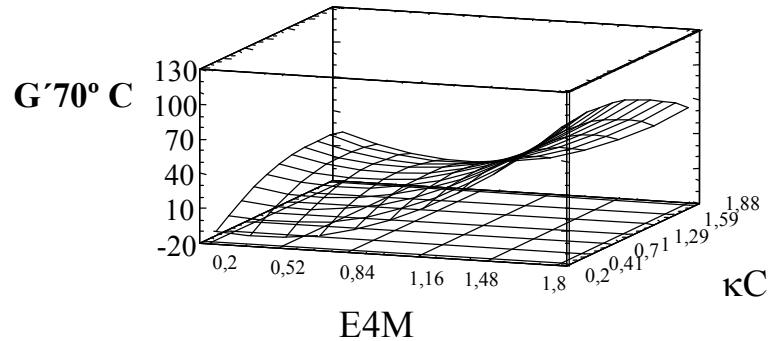
**a**



**b**



c

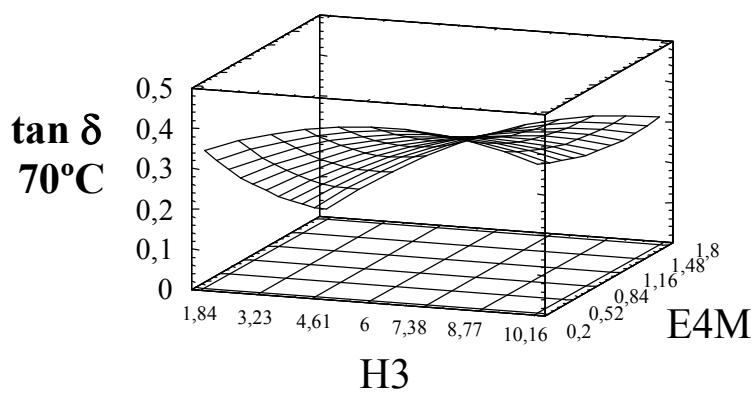


**Figura 9:** Gráficos correspondientes a  $G' 70^{\circ}\text{C}$ ; (a) superfície de resposta em função de la concentración de H3 y E4M con  $\kappa\text{C}$  en un valor constante correspondiente al punto central (1%); (b) líneas de isorespuesta correspondientes y (c) superficie de respuesta en función de la concentración de E4M y de  $\kappa\text{C}$ , manteniendo constante la concentración de H3 en el punto central (6%).

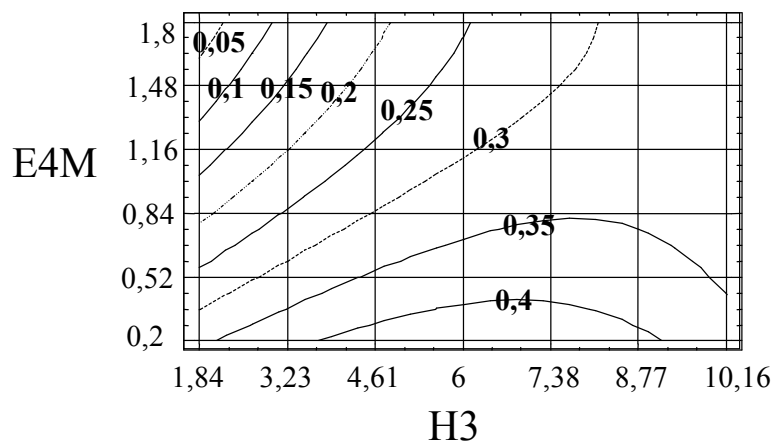
Dado que la variable  $\kappa\text{C}$  resultó tener un menor coeficiente de regresión se generaron las superficies de respuesta y las líneas de contorno manteniendo  $\kappa\text{C}$  constante en un valor central (Figura 9 a y b). Los mayores valores del módulo elástico se obtienen en mezclas que tienen una alta concentración de E4M, siendo escasa la influencia de H3. El efecto del agregado de  $\kappa\text{C}$  en presencia de E4M que se muestra en la superficie de respuesta de la Figura 9 c es muy pequeño si la concentración de E4M es alta. Cuando E4M se encuentra en baja concentración el aumento de la concentración de  $\kappa\text{C}$  produce un aumento de  $G'$ . Se concluye que el componente que determina principalmente el carácter elástico de la fase continua es E4M, dado que es esperable dado que este polisacárido gelifica durante el calentamiento. La proteína de soja hidrolizada presenta un efecto negativo en el módulo elástico, mientras que el  $\kappa\text{C}$  contribuye al carácter sólido básicamente cuando E4M se encuentra en baja concentración.

La Figura 10 a-c muestra los gráficos correspondientes a  $\tan \delta$ .

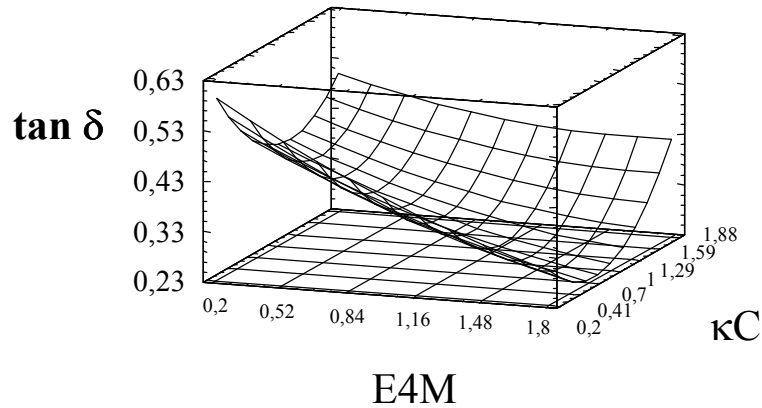
**a**



**b**



c



**Figura 10:** Gráficos correspondientes a  $\tan \delta$  al final del calentamiento; (a) superficie de respuesta en función de la concentración de H3 y de E4M, manteniendo constante la concentración de  $\kappa C$  en el punto central (1 %) (b) líneas de isorespuesta correspondientes; y (c) superficie de respuesta en función de la concentración de E4M y de  $\kappa C$ , manteniendo constante la concentración de H3 en el punto central (6 %).

Las superficies de respuesta (Figuras 10 a y c) y el gráfico de contorno (Figura 10 b) muestran que los menores valores de  $\tan \delta$  es decir, la máxima viscoelasticidad de la fase continua, se logran a altas concentraciones de E4M y bajas de H3.

El efecto del  $\kappa C$  se observa en la superficie de respuesta en la Figura 10 c donde H3 se ha mantenido constante. Se corrobora que el  $\kappa C$  aumenta la  $\tan \delta$  y presenta un mínimo a bajas concentraciones de E4M.

Del análisis conjunto del efecto combinado de los componentes en el módulo elástico y la viscoelasticidad relativa se puede concluir que E4M es el componente que determina principalmente las características elásticas y viscoelásticas de la fase continua a 70°C, debido a que E4M puede gelificar a esta temperatura. El  $\kappa C$  a esta temperatura se encuentra como “random coil” es decir, no gelificado.

La presencia de una alta concentración de la proteína hidrolizada (H3) y/o  $\kappa C$  impedirán la gelificación de E4M la cual se manifiesta en muy bajos valores de  $G'$  y altos de  $\tan \delta$ . Esto



explica porqué en los puntos experimentales 5, 9 11 y 12 no se logró detectar una formación definida de gel.

### III.2.2 Transiciones térmicas de la fase continua de las espumas

Se evaluaron las transiciones térmicas de los polisacáridos E4M y  $\kappa$ C a partir de las mediciones reológicas, como los cruces de  $G'$  y  $G''$  y cambios en la  $\tan \delta$  durante la medición.

En la Tabla 8 se muestran las respuestas medidas para cada uno de los 15 puntos experimentales: temperatura de fusión de E4M (T.f. E4M), y temperatura de gelificación de  $\kappa$ C (T.gel de  $\kappa$ C).

PE/Componentes	H3	E4M	$\kappa$ C	T.f.E4M(°C)	T.gel. $\kappa$ C(°C)
1	6	1	1	41,15	38,3
2	6	1,8	1	49,7	49
3	6	0,2	1	46,8	42,6
4	10	1,4	1	41,15	39
5	2	0,6	1	64,2	32,6
6	2	1,4	1	45,13	44,7
7	10	0,6	1	42,6	36,15
8	7,33	1,4	1,8	41,14	39
9	4,67	0,6	0,2	49,7	21,4
10	4,67	1,4	0,2	38,3	31,19
11	8,67	1	0,2	41,1	21,4
12	7,33	0,6	1,8	62,7	40,4
13	3,33	1	1,8	51	44,7
14	6	1	1	41,1	36,86
15	6	1	1	41,1	36,86

**Tabla 8:** Temperaturas de fusión de E4M y de gelificación de  $\kappa$ C correspondientes a los 15 puntos experimentales.

Respecto a la temperatura de fusión de E4M no se observa una relación directa de ésta y la concentración de E4M presente en la mezcla, debido a la posible interacción entre

componentes. En el caso de la temperatura de gelificación de  $\kappa\text{C}$ , se observa que existe una correlación entre dicha temperatura y la concentración del polisacárido en el PE.

El análisis de regresión múltiple y el ANOVA permitieron identificar las variables significativas. Los coeficientes de regresión obtenidos se muestran en la Tabla 9.

	<b>T.f.E4M(°C)</b>	<b>T.gel.<math>\kappa\text{C}</math>(°C)</b>
Constantes	41,513	37,416
<i>Lineales</i>		
H3	-5,695*	(-1,364)
E4M	-6,070*	4,220*
$\kappa\text{C}$	4,980*	10,172*
<i>Cuadráticos</i>		
H3 <sup>2</sup>	6,798*	(-2,597)
E4M <sup>2</sup>	6,595*	8,356*
$\kappa\text{C}^2$	5,019*	-8,152*
<i>Interacciones</i>		
(H3).(E4M)	10,952*	(-3,915)
(H3).( $\kappa\text{C}$ )	4,240*	(-3,686)
(E4M).( $\kappa\text{C}$ )	-10,892*	-5,664*
R <sup>2</sup>	0,689	0,9612
Lack of fit	*	NS

Tabla 9: Coeficientes de regresión del modelo para las transiciones térmicas de los polisacáridos.

\* significativo ( $p < 0,05$ ); ( ) no significativo.

El ANOVA para la temperatura de fusión de E4M, arrojó un R<sup>2</sup> de 0,689 y un “lack of fit” significativo, por tal motivo, el modelo propuesto no sería el más adecuado. El bajo R<sup>2</sup> debe también atribuirse a la incertidumbre en los valores de T. fusión de E4M en los sistemas donde no se forma un gel estable (PE 5, 9,11 y 12). Dado que en la literatura, se han reportado ajustes con menores R<sup>2</sup> (Anne y col., 1993; Meullenet y col., 1994; Smith, y col., 1995) se decidió analizar esta regresión pero con cautela.

Los coeficientes con  $p < 0,05$  y  $p < 0,01$  fueron utilizados para elaborar la ecuación de regresión reducida, que se muestra en la Tabla 10.

<b>Transiciones Térmicas de los polisacáridos</b>	$\mathbf{T.f.E4M} = 41,5 - 5,7 H3 - 6,1 E4M + 4,9 \kappa C + 6,8 H3^2 + 6,5 E4M^2 + 5,2 \kappa C^2 + 10,9 H3.E4M + 4,2 H3. \kappa C - 10,9 E4M. \kappa C$ $\mathbf{T.gel.\kappa C} = 37,4 + 4,2 E4M + 10,2 \kappa C + 8,4 E4M^2 - 8,2 \kappa C^2 - 5,6 E4M.\kappa C$
---	--

Tabla 10: Modelos reducidos para las transiciones térmicas de los polisacáridos.

Todos los coeficientes de regresión resultaron altamente significativos para la temperatura de fusión de E4M. Es decir, esta respuesta está fuertemente determinada por efectos lineales, cuadráticos y de interacción de los tres componentes. Dentro de los efectos lineales se encontró que H3 y E4M reducen la temperatura de fusión de E4M, dado por sus coeficientes negativos, mientras que el  $\kappa C$  produce un aumento de esta respuesta (coeficiente positivo). Los tres componentes, presentan coeficientes cuadráticos positivos. Los efectos de interacción mostraron que la interacción de H3 y E4M produce un aumento de la temperatura de fusión de E4M, dado por el coeficiente positivo; lo mismo sucede entre H3 y el  $\kappa C$  pero en menor grado (menor valor del coeficiente respectivo), mientras que la interacción de E4M y  $\kappa C$  produce una reducción de la temperatura de fusión de E4M, debido a su coeficiente negativo.

En la Figura 11 a-f se muestran los gráficos correspondientes a la temperatura de fusión de E4M en función de pares de componentes.

La Figura 11, 12 y 13 muestra el efecto de la concentración de E4M y de la concentración de H3 para un valor fijo de  $\kappa C$  en el punto central (1%).

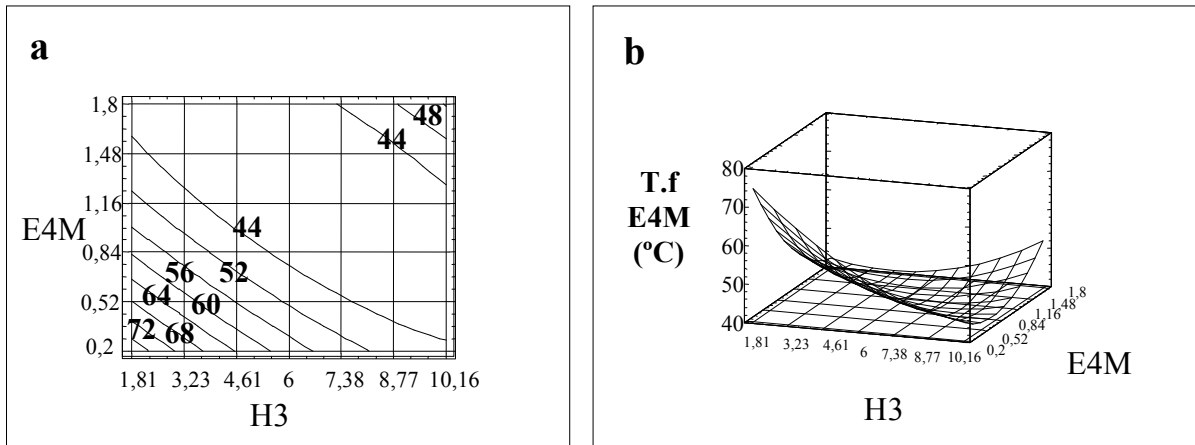


Figura 11: Gráficos correspondientes a la temperatura de fusión de E4M en función de H3 y de E4M, ( $\kappa C = 1\%$ ); (a) líneas de isorespuesta; (b) superficie de respuesta.

Ambos gráficos muestran que al aumentar la concentración de H3, a un valor bajo de concentración de E4M, disminuye significativamente la temperatura de fusión de E4M, con la presencia de un mínimo hacia las mayores concentraciones de H3. Si E4M se encuentra a altas concentraciones, la presencia de H3 tiene poco efecto. Por el contrario, si se analiza el efecto de E4M fijando un valor de concentración de H3, el efecto de E4M sobre la temperatura de fusión va a depender de la concentración de H3. Si es baja, la T.fusión tiende a disminuir, si es alta, aumenta levemente. Este comportamiento indica una fuerte influencia de la interacción entre los componentes.

En la Figura 12 a-b se muestra el efecto de la concentración de  $\kappa C$  y H3 a una concentración fija de E4M en el punto central (1%).

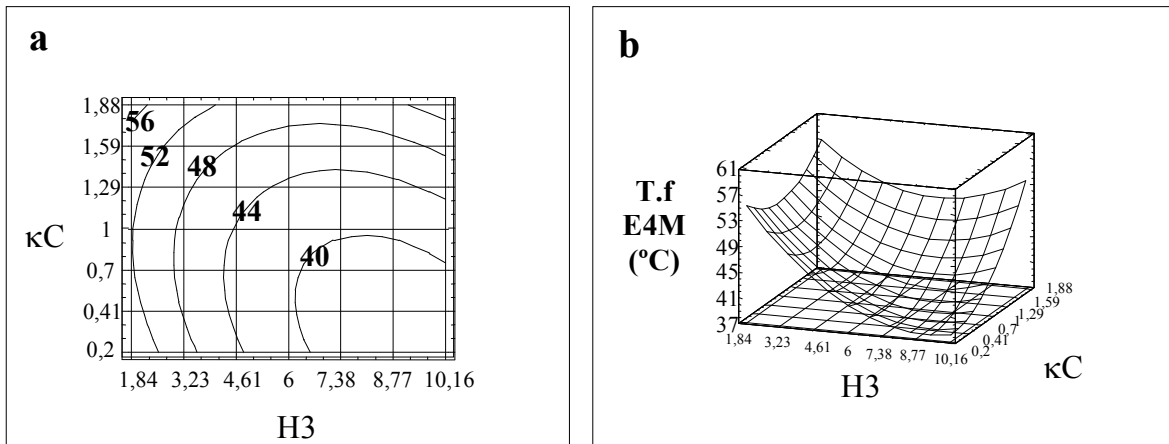


Figura 12: Gráficos correspondientes a la temperatura de fusión de E4M en función de H3 y de κC (E4M=1%) (a) líneas de isorespuesta; (b) superficie de respuesta.

Se puede observar nuevamente que H3 reduce la temperatura de fusión de E4M y el κC la aumenta con la presencia de mínimos.

En la Figura 13 a-b se muestra el efecto de la concentración de κC y de E4M en un valor fijo de H3 en el punto central (6%).

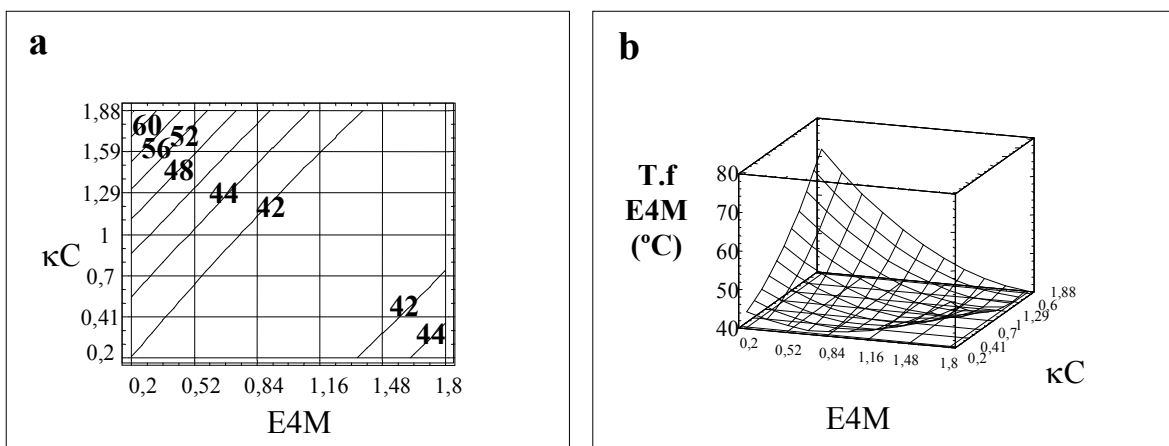


Figura 13: Gráficos correspondientes a la temperatura de fusión de E4M en función de E4M de κC (H3=6%) (a) líneas de isorespuesta; (b) superficie de respuesta.

Los gráficos muestran que fijando un valor bajo de concentración de E4M el efecto de la adición del  $\kappa$ C provoca un aumento muy grande de la temperatura de fusión de E4M, mientras que fijando un valor alto de concentración de E4M, la adición del  $\kappa$ C promueve un leve descenso de la respuesta llegando a un mínimo. Nuevamente, este comportamiento es resultado de la interacción entre componentes, ya que el  $\kappa$ C, en forma lineal produce un aumento de la temperatura de fusión de E4M, dado a su coeficiente positivo, obtenido en la regresión (Tabla 9). El mismo fenómeno se encuentra fijando un valor bajo o alto del  $\kappa$ C, resultando en un aumento o disminución de la variable (pasando por un mínimo), lo cual también se explica por efectos de interacción entre componentes, ya que el aumento de E4M tiende a una reducción de su temperatura de fusión en forma lineal (Tabla 9).

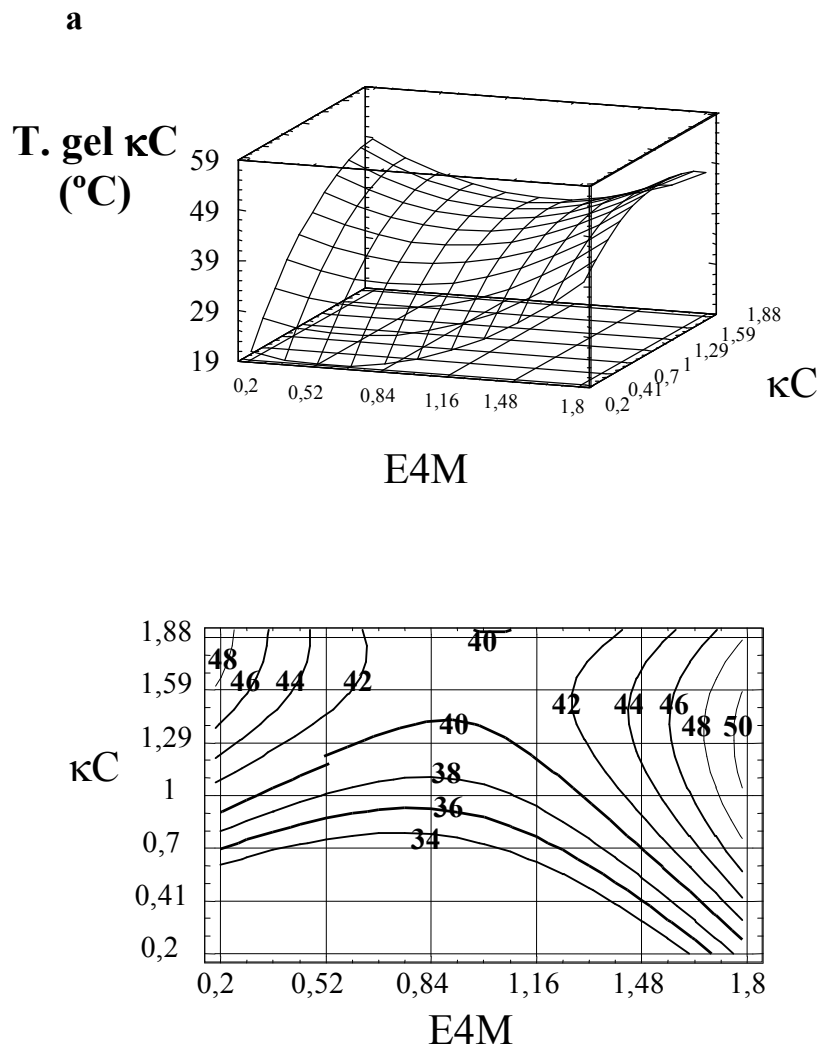
En la Tabla 9 se observa que el análisis de ANOVA para la temperatura de gelificación de  $\kappa$ C indicó que el modelo propuesto explica el 96,12% de las respuestas, con un “lack of fit” no significativo.

El modelo reducido para la T.gel del  $\kappa$ C en la Tabla 10 muestra que E4M y  $\kappa$ C tienen efectos lineales positivos en la T.gel del  $\kappa$ C siendo el  $\kappa$ C el factor de mayor peso como lo muestra su mayor coeficiente. Al ser coeficientes positivos, se puede inferir que la T.gel. de  $\kappa$ C aumenta con el aumento de la concentración de E4M y  $\kappa$ C. Los mismos componentes también presentaron un coeficiente cuadrático significativo, siendo para E4M positivo lo que indica la presencia de un valor mínimo en la variable con el aumento de la concentración de E4M. Por el contrario,  $\kappa$ C presentó un coeficiente cuadrático negativo, el cual indica la presencia de un máximo al aumentar la concentración del  $\kappa$ C.

La temperatura de gelificación de  $\kappa$ C depende de su concentración del mismo (Anderson y col., 1969). En presencia de los iones adecuados la formación del gel ocurriría a mayor temperatura cuanto mayor sea la concentración del polisacárido ya que más fácilmente se agregaran los dominios previamente ordenados.

Se encontró un efecto de interacción entre E4M y  $\kappa$ C. El coeficiente negativo obtenido en la regresión indica una reducción de la T.gel. $\kappa$ C producto de la mezcla mencionada.

La Figura 14 a-b muestra los gráficos correspondientes a la T.gel del  $\kappa$ C manteniendo constante la concentración de H3 en su valor central (6%), dado que esta fue una variable no significativa.



**Figura 14:** Gráficos correspondientes a la temperatura de gelificación de  $\kappa$ C (a) superficie de respuesta, (b) líneas de isorespuesta.

Se observa que las mayores  $T_{gel}$  para  $\kappa$ C se obtienen cuando los sistemas tienen una concentración de  $\kappa$ C alrededor de 1,4%, siendo pequeña la influencia de E4M en estas condiciones. En cambio, cuando la concentración de  $\kappa$ C es menor, la presencia de E4M tiene más influencia produciendo un aumento de la  $T_{de}$  gelificación del  $\kappa$ C. El aumento de la temperatura de gelificación de  $\kappa$ C en presencia de E4M puede atribuirse a un

fenómeno de incompatibilidad termodinámica a pH neutro que conlleva a un aumento de la concentración efectiva del  $\kappa$ C, debido al fenómeno de volúmenes de exclusión (Tolstoguzov, 1997).

El  $\kappa$ C es un polisacárido aniónico sulfatado y forma geles termorreversibles en presencia de cationes (Samant y col., 1993; Ipsen, 1995; Drohan y col., 1997; Mleko y col., 1997; Lundin y Hermansson, 1998; Tziboula y Horne, 1998a,b; Ould Eleya y Turgeon, 2000). En solución acuosa a una temperatura mayor a 60°C el polisacárido se hidrata y adopta una conformación “random coil”. La gelificación ocurre durante el enfriamiento a una temperatura crítica y ha sido atribuido a una reacción en dos etapas, la cual involucra una transición desde “coil”(rollo) hacia hélice seguida por la agregación de las hélices (Morris y col., 1980; Morris, 1998). Un posterior enfriamiento, fortalece la asociación entre las hélices agregadas (Hermansson, 1995). El proceso de gelificación es influenciado por muchos factores como el tipo y concentración de sales en solución, velocidad de enfriamiento y calentamiento, concentración del hidrocólide y la presencia de otros biopolímeros. Se encontró que la gelificación es afectada por fracciones de caseína (Lundin y Hermansson, 1998), caseínas micelares (Drohan y col., 1997) y proteínas del suero lácteo (Ould Eleya y Turgeon, 2000). Baeza y col., (2002) estudiaron los procesos de gelificación y fusión del  $\kappa$ C a pH neutro en presencia de  $\beta$ -lactoglobulina y proteínas de soja nativa y desnaturalizada mediante técnicas reológicas dinámicas, medidas de viscosidad aparente y calorimetría diferencial de barrido. En presencia de proteínas se ha observado un aumento de la temperatura de gelificación del  $\kappa$ C y del módulo elástico de los geles mixtos comparando con los geles de  $\kappa$ C solo.

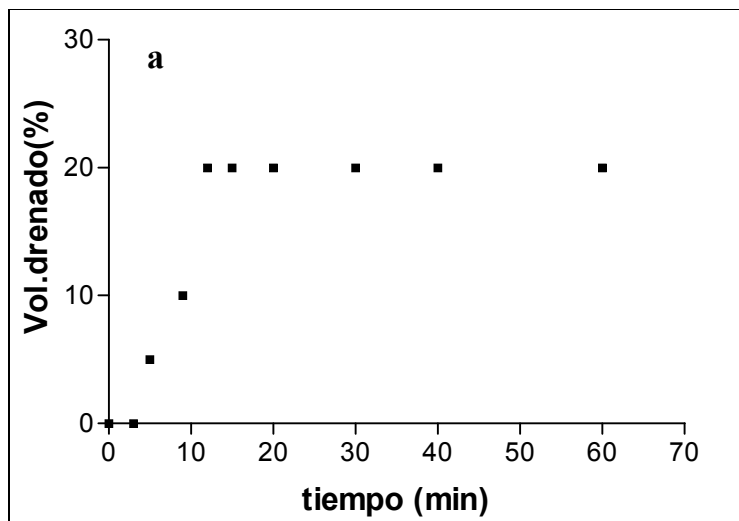
Observaciones previas sobre sistemas de  $\kappa$ C-proteínas mostraron efectos sinérgicos entre los biopolímeros sobre las propiedades de gelificación a pHs por encima del punto isoeléctrico de las proteínas (Kampf y Nussinovitch, 1997; Mleko y col., 1997; Neiser y col., 2000; Ould Eleya y Turgeon, 2000; Schorsch y col., 2000). La principal causa de este efecto sinérgico sería la incompatibilidad termodinámica entre los diferentes biopolímeros en solución. Esto conduce a un aumento mutuo de la concentración de ambos biopolímeros en fases separadas que favorece la gelificación del hidrocólide.



### III.3 Comportamiento térmico de los polisacáridos durante la etapa de enfriamiento y durante el almacenamiento refrigerado.

Para tener una mayor estabilidad de las espumas durante el enfriamiento (desde 70°C a 10 °C) sería deseable que la temperatura de fusión de E4M fuera lo más próxima a la de gelificación de  $\kappa$ C, de tal forma que se mantenga una estructura gelificada en todo el rango de enfriamiento.

El PE 9 que tiene una diferencia entre T.gel  $\kappa$ C y T.f. E4M de aproximadamente 18°C,(Tabla 8) presenta durante el enfriamiento a 10 °C en heladera un drenado de líquido de 20% y un colapso del 38% de la espuma. En la Figura 15 a-b se muestra el volumen de líquido drenado y la altura de espuma colapsada en función del tiempo para el PE número 9 cuando la espuma luego de ser obtenida a 70°C se almacena a 10°C.



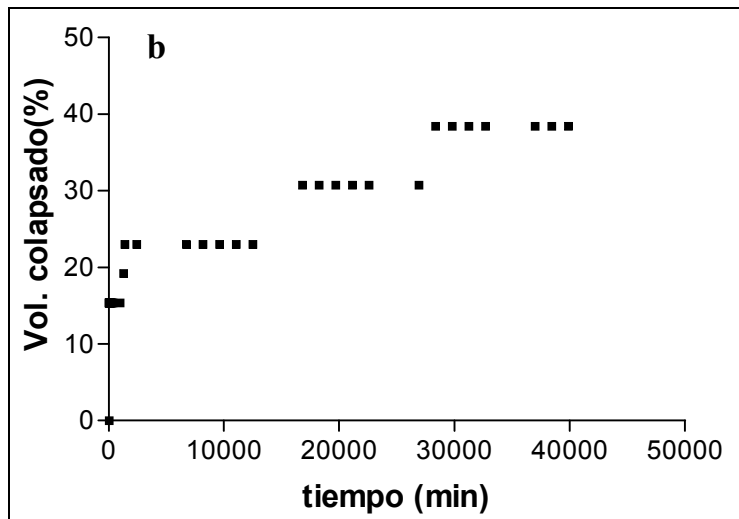
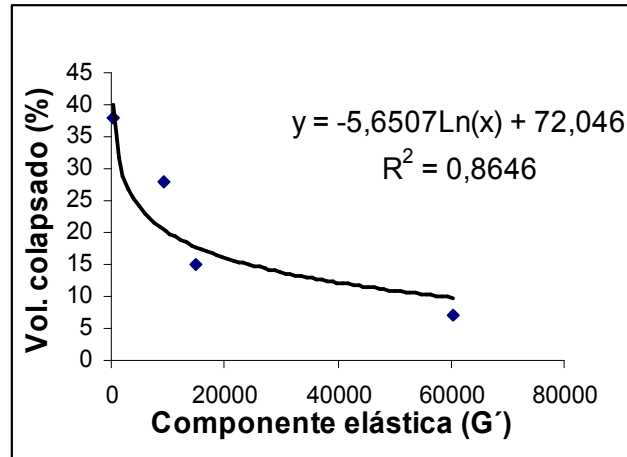


Figura 15: (a) Volumen de líquido drenado (%), (b) volumen de espuma colapsada (%) en función del tiempo de almacenamiento a 10°C.

En los sistemas donde esta diferencia es pequeña (menor a 6-8 °C) no se observó drenado de las espumas durante el enfriamiento (PE 1, 6 y 13 de la Tabla 8). Sin embargo, aún no habiendo drenado, estas espumas colapsaron en algún grado durante el almacenamiento refrigerado (10°C). Las espumas correspondientes a los PE 1,6 y 13 colapsaron el 15, 28 y 7% respectivamente al cabo de 60 días a 10 °C. El grado de colapso podría estar relacionado a las propiedades reológicas de las espumas enfriadas.

En la Figura 16 se muestra el volumen colapsado (%) de las espumas al cabo de 60 días a 10°C en función de la componente elástica ( $G'$ ) de la fase continua a la misma temperatura, para los PE estudiados 1, 6, 9 y 13.



**Figura 16:** Volumen Colapsado (%) de las espumas al cabo de 60 días a 10°C en función de la componente elástica (G') de la fase continua.

La buena correlación obtenida indica que efectivamente el colapso de las espumas refrigeradas es atribuible al comportamiento viscoelástico de la fase continua, el cual como se ha demostrado está determinado a temperaturas de refrigeración, principalmente por el  $\kappa C$ .

### Conclusiones

*Los resultados obtenidos muestran que el agregado combinado de  $\kappa C$  y E4M es una estrategia adecuada para generar espumas en base a hidrolizados proteicos de soja, con una elevada estabilidad al drenado y colapso bajo condiciones de calentamiento, sin reducir la CE. Por otro lado, estas espumas bajo refrigeración presentarían una alta estabilidad debido a la gelificación del  $\kappa C$ .*

*La concentración de  $\kappa C$  necesaria para obtener espumas de buen volumen (CE no menor al 200%) y con un tiempo lag de drenado y colapso alto (50-130 minutos), que permitiría eventualmente la pasteurización o la cocción de una espuma sin que sufra una desestabilización significativa, resultó ser menor al 0,7 %, debido principalmente a que una mayor concentración de  $\kappa C$  reduce mucho el volumen de espuma por su carácter viscosante. La concentración óptima de HPMC en espumas formuladas con una concentración de hidrolizado mayor al 7% fue entre 1 y 1,8 %.*

---

*El enorme aumento de estabilidad a altas temperaturas es atribuible a un efecto combinado entre la gelificación del E4M a 70°C y la interacción del mismo con el κC, el cual aportaría efectos viscosantes a la fase continua.*

*El análisis del efecto combinado de los componentes en el módulo elástico y la viscoelasticidad relativa de la fase continua de las espumas permitió corroborar que E4M es el componente que determina principalmente las características elásticas y viscoelásticas de la fase continua a 70°C, debido a que E4M puede gelificar a esta temperatura. Sin embargo una alta concentración de la proteína hidrolizada (H3) y/o κC impedirán la gelificación de E4M lo cual se manifestó en muy bajos valores de  $G'$  y altos de  $\tan \delta$ .*

*Para tener una mayor estabilidad de las espumas durante el enfriamiento (desde 70°C a 10 °C) la temperatura de fusión de E4M debe ser suficientemente próxima a la de gelificación de κC, de tal forma que se mantenga una estructura gelificada en todo el rango de enfriamiento.*

*Finalmente para lograr una alta estabilidad al colapso durante el almacenamiento refrigerado de las espumas se requiere una fase continua con un elevado módulo elástico el cuál es aportado principalmente por la gelificación del carragenano.*

## *Bibliografia*

- Adler-Nissen, J. (1986) "A review of food protein hydrolysis-General Issues" Enzymic hydrolysis of food proteins, London: Elsevier Applied Science, Chap 3 , pp 25-52.
- Ahmed, M. and Dickinson, E. (1991) "*Foaming of aqueous solutions of protein + propylene glycol alginate*", Food Hydrocolloids, 4, 395-402.
- Arboleya, J.C. and Wilde, P. (2005) "*Competitive adsorption of proteins with methylcellulose and hydroxypropyl methyl cellulose*", Food Hydrocolloids, 19, 485-491
- Alves, M. M.; Antonov, Y.A. and Gonçalves, M.P. (1999) "*The effect of structural features of gelatine on its thermodynamic compatibility with locust bean gum in aqueous media*", Food Hydrocolloids, 13, 157-166.
- Albert, S. and Mittal, G. S. (2002), Food Research International, 35, 445.
- Anderson, NS; Campbell, J.W. and Hording, M.M. (1969), Journal Molecular Biology, 45, 85.
- Anne, A.; Guillou and Floros, J.D. (1993) "*Multiresponse optimization minimizes salt in natural cucumber fermentation and storage*", Journal of Food Science, 58,1381-1389.
- Arteaga, G.E. and Nakai, S. (1993b) "*Predicting protein functionality with artificial neural networks: Foaming and emulsifying properties*", Journal of Food Science, 58, 1152-1156.
- Arteaga, G.E.; Li-Chan, E.; Nakai, S.; Cofrades, S. and Jiménez-Colmonero, F. (1993a) "*Ingredient interaction effects on protein functionality: mixture design approach*", Journal of Food Science, 58, 656-662.
- Babiker, E. E.; Hiroyuki, A.; Matsudomi, N.; Iwata, H.; Ogawa, T.; Bando, N. and Kato, A. (1998) "*Effect of polysaccharide conjugation or transglutaminase treatment on the allergenicity and functional properties of soy protein*", Journal of Agricultural & Food Chemistry, 46, 866-871.
- Badley, R.A.; Atkinson, D.; Hauser, H.; Oldani, D.; Green, J. and Stubbs, J.M. (1975) "*The structure, physical and chemical properties of the soy bean protein glycinin*", Biochimica et Biophysica Acta, 412, 214-228.
- Baeza, R.I.; Carp, D.J.; Pérez, O. and Pilosof, A.M.R. (2002) " *$\kappa$ -Carrageenan-protein interactions: effect of proteins on polysaccharide gelling and textural properties*", Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 35, 741-747.
- Baeza, R.I. (2003) "*Interacciones entre  $\beta$ -lactoglobulina y polisacáridos en coloides alimentarios*", Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- Baeza, R.I.; Carrera Sanchez, C.; Pilosof, A. M.R. and Patino, J.M.R. (2004) "*Interactions of polysaccharides with  $\beta$ -lactoglobulin spread monolayers at the air-water interface*", Food Hydrocolloids, 18, 959-966.

Baeza, R.I.; Carrera Sanchez, C.; Pilosof, A.M.R. and Patino, J.M.R. (2005a) "*Interactions of polysaccharides with  $\beta$ -lactoglobulin adsorbed films at the air-water interface*", *Food Hydrocolloids*, 19, 239-248.

Baeza, R.I.; Carrera Sanchez, C.; Rodríguez Patino, J.M. and Pilosof, A.M.R. (2005b) "*Interactions between  $\beta$ -Lactoglobulin and Polysaccharides at the Air-Water Interface and the Influence on Foam Properties*", in Food Colloids : interactions microstructure and processing, E. Dickinson (Ed), (pp. 301-316). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

Balasubramaniam, V.M.; Chinnan, M.S.; Mallikarjunan, P. and Phillips, R.D. (1997), *Journal Food Processes Engineering*, 20,17.

Bals, A. and Kulozik, U. (2003) "*Effect of pre-heating on the foaming properties of whey protein isolate using a membrane foaming apparatus*", *International Dairy Journal*, 13, 903-908.

Baniel, A.; Fains, A. and Popineau, Y. (1997) "*Foaming properties of egg albumen with a bubbling apparatus compared with whipping*", *Journal of Food Science*, 62, 377-381.

Barigou, M.; Deshpande, N.S. and Wiggers, F.N. (2001) "*An enhanced electrical resistance technique for foam drainage measurement*", *Colloids and Surfaces*, 189, 237-246.

Bell, D.A. (1990), *Cereal Foods World*, 35,1001.

Benjamins, J. (2000) "*Static and dynamic properties of protein adsorbed at liquid interfaces*" Ph D. Thesis, Wageningen University.

Bergenstahl, B.; Faldt, P. and Malmsten, M. (1995) "*Surface structures and surface – active components in food emulsions*", in Food Macromolecules and Colloids, ed. by Dickinson, E. and Lorient, D., The Royal Society of Chemistry, 201-214.

Bernardi, Don LS; Pilosof, A.M.R. and Bartholomai, G.B. (1991) "*Enzymatic modification of soy protein concentrates by fungal and bacterial proteases*", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68, 102-105.

Bisperink, C.G.J.; Akkerman, J.C.; Prins, A. and Ronteltap, A.D. (1992) "*A moving optical fibre technique for structure analysis of heterogeneous products: Application to the determination of the bubble-size distribution in liquid foams*", *Food Structure*, 11, 101-108.

Bixler, H.J. (1996) "*Recent developments in manufacturing and marketing carrageenan*", *Hydrobiologia*, 326, 35 -57.

Bombara, N.; Añon, M.C. and Pilosof, A.M.R. (1997) "*Functional properties of protease modified wheat flours*", *Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie*, 30, 441-447.

Blank, M. (1969) "*Intermolecular interactions in newly spread serum albumin monolayers*", Journal of Colloid and Interface Science, 29, 205-209.

Blank, M. and Britten, J.S. (1970) "*Determination of yield stress in surface films of lung extract*", Journal of Colloid and Interface Science, 32, 62-66.

Britten, M. and Lavoie, L. (1992) "*Foaming properties of proteins as affected by concentration*", Journal of Food Science, 57, 1219-1222.

Box, G. and Drapper, N. (1987) "*Empirical model-building and response surfaces*", Wiley, New York.

Brook, J.R. and Morr, C.V. (1985) "*Current aspects of soy protein fractionation and nomenclature*", Journal of the American Oil Chemists' Society 62, 1347-1354.

Bryant, C.M. and McClements, D.J. (2000) "*Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denatured whey proteins solutions and gels*", Food Hydrocolloids, 14, 383-390.

Burova, T.V.; Grinberg, N.V.; Grinberg, V.Y.; Leontiev, A.L. and Tolstoguzov, V.B. (1992) "*Effects of polysaccharides upon the functional properties of 11 S globulin of broad beans*", Carbohydrate Polymers, 18, 101-108.

Capron, I.; Nicolai, T. and Durand, D. (1999) "*Heat induced aggregation and gelation of  $\beta$ -lactoglobulin in the presence of  $\kappa$ -carrageenan*", Food Hydrocolloids, 13, 1-5.

Carrera Sánchez, C.; Rodríguez Niño, M. and Rodríguez Patino, J.M.(1999) "*Relaxation phenomena in monoglyceride films at the air-water interface*", Colloids and Surfaces B:Biointerfaces, 12, 175-192.

Carrera Sánchez, C.; Molina Ortiz, S.E.; Rodríguez Niño, M.R.; Añón, M.C. and Rodríguez Patino, J.M. (2003) "*Effect of pH on structural topographical, and dynamic characteristics of soy globulin films at the air-water interface*", Langmuir, 19, 7478-7487.

Carrera Sánchez, C.; Rodríguez Niño, M.R.; Molina Ortiz, S.E.; Añón, M.C. and Rodríguez Patino, J.M. (2004) "*Soy globulin spread films at the air-water interface*", Food Hydrocolloids, 18, 335-347.

Carrera Sánchez, C. and Rodríguez Patino, J.M. (2005) "*Interfacial, foaming and emulsifying characteristics of sodium caseinate as influenced by protein concentration in solution*", Food Hydrocolloids, 19, 407-416.

Carp, D.J.; Wagner, G.B.; Bartholomai, G.B. and Pilosof, A.M.R.(1997) "*Rheological method for kinetics of drainage and disproportionation of soy proteins foams*", Journal of Food Science, 62, 1105-1109.



- Carp, D.J.; Bartholomai, G.B. and Pilosof, A.M.R. (1999) “*Electrophoretic studies for determining soy proteins-xanthan gum interactions in foams*”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 12, 309-316.
- Carp, D.J.; Bartholomai, G.B.; Relkin, P. and Pilosof, A.M.R. (2001) “*Effects of denaturation on soy protein-xanthan interactions: comparison of a whipping-rheological and bubbling method*”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 21, 163-171.
- Carp, D.J. (2001) “*Formación y estabilidad de espumas de proteínas de soja: efecto de la desnaturalización térmica y de la interacción con polisacáridos*” Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- Carp, D.J.; Baeza, R.I.; Bartholomai, G.B. and Pilosof, A.M.R. (2004) “*Impact of protein- $\kappa$ -carrageenan interactions on foam properties*”, *Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie*, 37, 573-580.
- Catsimpoolas, N. and Ekenstein, C. (1969) “*Isolation of alpha, beta and gamma conglycinins*”, *Archives Biochemistry and Biophysics*, 129, 490.
- Courthaudon, J.L.; Dickinson, E. and Christie, W.W. (1991) “*Competitive adsorption of lecithin and  $\kappa$ -casein in oil-in-water emulsions*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1365-1368.
- Couper, A. (1993) “*Physical Methods of Chemistry*”, Food Research International, Vol 9A. John Wiley and Sons, NY-USA. Dalgleish, D. G. 29, 541.
- Cheftel, J.C.; Cuq, J.L.; Lorient, D. (1985) “*Amino Acids Peptides and Proteins*” in Food Chemistry, edited by O.W. Fennema, Marcel Dekker, N.Y. pp. 245-370
- Cheftel, J.C.; Cuq, J.L.; Lorient, D. (1989) Proteínas Alimentarias, Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- Chen, B.H-Y. and Morr, C.V. (1985) “*Solubility and foaming properties of phytate-reduced soy protein isolate*”, *Journal of Food Science*, 50, 1139-1142.
- Chobert, J.M.; Sitohy, M.Z. and Whitaker, J.R. (1988) “*Solubility and Emulsifying Properties of Caseins Modified Enzymatically by Staphylococcus aureus*”, *Protease*, Ibid, 36, 220-224.
- Church, F.C.; Swaisgood, H.E.; Porter, D.H. and Catignani, G.L. (1983) “*Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins*”, *Journal Dairy Science*, 66, 1219-1227.
- Clark, D.C.; Coke, M.; Smith, L.J. and Wilson, D.R. (1989) “*The formation and stabilization of protein foams*”, Foams: Physics, Chemistry and Structure, ed. by A.J.Wilson, Basel: Springer-Verlag, Ch.5: 55-68.

Clark, D.C.; Mackie, A.R.; Wilde, P.J. and Wilson, D.R. (1994 ) "*Differences in the structure and dynamics of the adsorbed layers in protein – stabilized model foams and emulsions*", *Faraday Discussions*, 98, 253-262.

Clark, G.L. and Ross, S. (1940) "*Measurement of static and dynamic foams in characteristic units*", *Industrial and Engineering Chemistry*, 32, 1594-1598.

Crescenzi, V.; Dentini, D.; Risica, S.; Spadoni, G.; Skjak-Break, G.; Capitani, D.; Mannina, L. and Viel, S. (2004), *Biomacromolecules*, 5, 537-546.

Cuq B.; Gontard N. and Guilbert, S. (1998) "*Proteins as agricultural polymers for packaging production*", *Cereal Chemistry*, 75, 1-9.

Daas, P.J.H.; Schols, H.A.; Jager, H.H. (2000) "*On the galactosyl distribution of commercial galactomannans*", *Carbohydrate Research*, 329, 609-619.

Damodaran, S. and Song, K.B. (1988) "*Kinetics of adsorption of protein at interfaces: Role of protein conformation in diffusional adsorption*", *Biochimica et Biophysica Acta*, 954, 253-264.

Damodaran, S. (1989) "*Film properties of modified proteins*", Food proteins, ed. by J.E. Kinsella and W.G. Soucie. The AOCS - Champaign, IL., Ch.5: 78-99.

Damodaran, S. (1990) "*Interfaces, proteins films, and foams*", *Advances in Food Nutrition and Research*, 34, 1-79.

Damodaran, S. (1997) "*Protein - stabilized foams and emulsions* ", Food proteins and their applications, ed. by Damodaran, S. and Paraf, A., Marcel Dekker, Ch.3: 57-110.

Dea, I.C.M. and Morrison, A. (1975) "*Chemistry and interactions of seed galactomannans*", *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 31, 242-312.

Dey, P.M. (1978), *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 35, 341.

De Feijter, J. and Benjamins, J. (1987) "*Adsorption kinetics of proteins at the air-water interface*", in Food Emulsions and Foams, E. Dickinson (Ed). (pp. 72-85). London: The Royal Society of Chemistry.

Dickinson E.; Rolfe, S.E. and Dalgleish, D.G. (1988) "*Competitive adsorption of  $\alpha$  s1-casein and  $\beta$ -casein in oil-in-water emulsions*", *Food Hydrocolloids*, 2, 397-405.

Dickinson E. (1992) An Introduction to Food Colloids, Oxford University Press, Ed. Oxford-UK.

Dickinson E. and McClements, D.J. (1995a) "*Protein – Polysaccharide interactions*", in Advances in food colloids, ed. by Dickinson E. and McClements, D.J. , Blakie Academic and Professional, Ch.3: 81-101.

- Dickinson E. and McClements, D.J. (1995b) "*Ultrasonic characterization of food colloids*", in *Advances in food colloids*, ed. by Dickinson E. and McClements, D.J. , Blakie Academic and Professional, Ch.6: 176-210.
- Dickinson, E. (1989) "*Protein Adsorption at Liquid Interfaces and the Relationship to foam stability*", *Foams: Physics, Chemistry and Structure*, ed. by A.J.Wilson, Basel: Springer-Verlag, Ch.4: 39-53.
- Dickinson, E.(1998), *Journal Chemical Society Faraday Transactions*, 94, 1667.
- Dickinson, E. (2001) "*Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology*", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 20, 197-210.
- Dickinson, E. (2003) "*Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems*", *Food Hydrocolloids* 17, 25-39.
- Dirección de Industria Alimentaria sobre la base de datos del USDA y la GPYA (2007)
- Doehlert D. H. (1970) "*Uniform shell desing*", *Appl. Statistics* 19, 231.
- Doublier, J.L.; Launay, B. and Cuvelier, G. (1992) "*Viscoelastic properties of food gels*", in *Viscoelastic properties of foods*, ed. by M.A. Rao and J.F. Steffe, Barking, England, Elsevier Science, p. 371-434.
- Drohan, D.D.; Tziboula, A.; McNulty, D. and Horne, D.S. (1997) "*Milk proteins – carrageenan interactions*", *Food Hydrocolloids*, 11, 101-107.
- Elizalde, B.E.; Pilosof, A.M.R and Bartholomai, G.B. (1991) "*Predictions of emulsion instability from emulsion composition and physicochemical properties of proteins*" *Journal of Food Science*, 56, 116-120.
- Elizalde, B.E.; Giaccaglia, D.; Pilosof, A.M.R. and Bartholomai G.B. (1991) "*Kinetics of liquid drainage from protein-stabilized foams*", *Journal of Food Science*, 56, 24 - 26.
- Evans, D. F. and Wennerstrom, H. (1994) "*The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet*", VCH Publishers, NY-USA.
- Ferreira, M.; Behringer, R. and Jost, R. (1995) "*Instrumental method for characterizing protein foams*", *Journal of Food Science*, 60, 90-93.
- Ford, J.L. (1999), *International Journal of Pharmacy*, 179, 209.
- Franzen, K.L. and Kinsella, J.E. (1976) "*Functional properties of succinylated and acetylated soy protein*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24, 786-794.
- Frias, A.C. and Sgarbieir, V.C. (1998) "*Guar gum effects on food intake, blood serum lipids and glucose levels of wistar rats*", *Plant Food Human Nutrition* 53, 15-28.

- Fukushima, D. (1991) "*Recent progress of soybean protein foods: chemistry, technology and nutrition*", Food Review International, 7,323-351.
- García, M.C.; Torre, M.; Marina, M.L. and Laborda, F. (1997) "*Composition and characterization of soybean and related products*", Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 37, 361-391.
- Genovese, M.I. and Lajolo, F.M. (1993) "*Composition and structural characteristics of isolated soy proteins from broken and damaged seeds*", Journal of Food Science, 58, 148-151.
- Garti, N.; Slovin, Y. and Aserin, A. (1999) "*Surface and emulsification properties of a new gum extracted from Portulaca oleracea L*", Food Hydrocolloids, 13, 145-155.
- Gaonkar, A.G. (1991) "*Surface and interfacial activities and emulsions characteristics of some food hydrocolloids*", Food Hydrocolloids, 5, 329-337.
- Ganzevles, R.A.; Cohen Stuart, M.A.; van Vliet, T. and Jongh, H.H.J. (2006) "*Use of polysaccharides to control protein adsorption to the air-water interface*", Food Hydrocolloids, 20, 872-878 "
- German, J.B.; O'Neill, T.E. and Kinsella, J.E. (1985) "*Film forming and foaming behavior of food proteins*", Journal of the American Oil Chemists' Society, 62,1358-1366.
- Glicksman, M. (1983) "*Functional properties of hydrocolloids*", Food Hydrocolloids, ed. by M. Glicksman, CRC press, Vol. I Ch.3: 47-100.
- Gonzalez, G. and MacRitchie, F. (1970) "*Equilibrium adsorption of proteins*", Journal of Colloid and Interface Science, 32, 55-61.
- González, R.J.; Remondetto, G.E.; Coutaz, R.; Santiago, L.G. y Bonaldo, A.G. (1995) "*Efectos de variables del proceso en planta piloto sobre algunas propiedades de aislados proteicos de soja*", Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos, 1, 35.
- Graham, D.E. and Phillips, M.C. (1976) "*The conformation of proteins at the air-water interface and their role in stabilizing foams*" in Foams, edited by R.J. Akers, Academic Press, N.Y. pp. 237-255.
- Graham, D.E. and Phillips, M.C. (1979a) "*Proteins at liquid interfaces I. Kinetics of adsorption and surface denaturation*", Journal of Colloid Interface Science. 70, 403-414.
- Graham, D.E. and Phillips, M.C. (1979b) "*Proteins at liquid interfaces II. Adsorption isotherms*", Journal of Colloid Interface Science, 70, 415-426.
- Grinberg, V. and Tolstoguzov, V.B. (1997) "*Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions*", Food Hydrocolloids, 11, 145-158.

Guillerme, C.; Loisel, W.; Bertrand, D. and Popineau, Y. (1993) "*Study of foam stability by video image analysis: relationship with the quantity of liquid in the foams*", Journal of Texture Studies, 24, 287-302.

Gunning, A.P.; Wilde, P.J.; Clark, D.C.; Morris, V.J.; Parker, M.L. and Gunning, P.A. (1996) "*Atomic force microscopy of interfacial protein films*", Journal of Colloid and Interface Science, 183, 600-602.

Gunther, R.C. (1979), Journal American Oil Chemist's Society, 56, 345.

Halling, P.J. (1981) "*Protein-stabilized foams and emulsions*", CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 12, 155-203.

Hamada, J.S. and Marshall, W.E. (1989) "*Preparation and functional properties of enzymatically deamidated soy proteins*", Journal of Food Science, 54, 598-601.

Hansen, P.M.T. (1982) "*Hydrocolloid-protein interactions: Relationship to stabilization of fluid milk products. A review*", Progress in Food and Nutrition Science, 6, 127-138.

Hayakawa, S. and Nakai, S. (1985) "*Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins*", Journal of Food Science, 50, 486.

Heil, J.R.; McCarthy, K.L.; German, J.B.; McCarthy, M.J. and Patino, H. (1990) "*Use of magnetic resonance imaging for evaluation of beer characteristics*", ASBC Journal, 48, 119-122.

Heinzelmann, K.; Hone, T.Z.; Muschiolik, G. and Rawel, H.M. (1994) "*Protein modification by high pressure homogenization*", Nahrung, 38, 478-490.

Henley, E.C. (1993) "*A brief discussion of soy protein food ingredients*", Korean Society of Food Science and Technology, 4, 20.

Hermansson, A.M.; Sivik, B. and Skjoldebrand, C. (1971) "*Functional properties of protein for foods factors affecting solubility, foaming and swelling of fish protein concentrate*", Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie, 4, 201.

Hermansson, A.M. (1986) "*Soy protein gelation*", Journal of the American Oil Chemists' Society, 63, 658-666.

Hermansson, A.M. (1995) "*The importance of biopolymers in structure engineering*", in Food colloids and macromolecules, ed. by E. Dickinson & D. Lorient, Cambridge, UK, The Royal Society of Chemistry, p. 363-375.

Hettiarachchy, N. and Kalapathy, U. (1997) "*Soybean protein products*", in Soybeans: chemistry, technology and utilization, ed. by Liu, K., Chapman & Hall, Ch.8: 379-411.

- Hiemenz, P.C. (1986) "*Principles of Colloid and Surface Chemistry*", Marcel Dekker, NY-USA.
- Horne, D.S.; and Rodriguez Patino, J.M. (2003) "*Adsorbed biopolymers: behavior in food applications*". In *Biopolymers at interfaces* M. Malmsten (Ed), (pp. 857-900). New York. Dekker.
- Horiuchi, T.; Fukushima, D.; Sugimoto, H. and Hattori, T. (1978) "*Studies on enzyme-modified proteins as foaming agents: effect of structure on foam stability*", Food Chemistry, 3, 35-42.
- Huang, Y.T. and Kinsella, J.E. (1987) "*Effects of phosphorylation on emulsifying and foaming properties and digestibility of yeast protein*", Journal of Food Science, 52, 1684-1688.
- Huang, X.L.; Catignani, G.L. and Swaisgood, H.E. (1997) "*Micro-scale method for determining foaming properties of protein*", Journal of Food Science, 62, 1028-1030.
- Hunter, R. J. (1986) *Foundations of Colloid Science*, Vol 2. Oxford University Press, Oxford-UK.
- Hunter, J.R.; Kilpatrick, P.K. and Carbonell, R.G. (1991) " *$\beta$ -casein adsorption at the air/water interface*", Journal of Colloid and Interface Science, 142, 429-447.
- Ipsen, R. (1995) "*Mixed gels made from protein and kappa-carrageenan*" Carbohydrate Polymers, 28, 337-339.
- Ipsen, R.; Otte, J.; Sharma, R., Nielsen, A.; Gram Hansen, L. and Qvist, K. (2001) "*Effect of limited hydrolysis on the interfacial rheology and foaming properties of  $\beta$ -lactoglobulin*" A. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 21, 173-178.
- Iwabuchi, S. and Shibasaki, K. (1981a) "*Immunochemical studies of the effects of ionic strength on thermal denaturation of soybean 7S globulin*", Agricultural and Biological Chemistry, 45, 1365-1371.
- Janicki, A. and Gomoliszek, M. (1993) "*Interactions effect of protein preparations and emulsifier on the foaming process of model solutions*", Food Technology and Nutrition, 35, 42.
- Kajiyama, N.; Isobe, S.; Uemura, K. and Noguchi, A. (1995) "*Changes of soy protein under ultra-high hydraulic pressure*", International Journal of Food Science and Technology, 30, 147-158.
- Kamata, Y.; Otsuna, S.; Sato, M. and Shibasaki, K. (1982) "*Limited proteolysis of soybean beta-conglycinin*", Agricultural and Biological Chemistry, 46, 2829-2834.

Kamata, Y., and Shibasaki, K. (1978a) "*Degradation sequence of glycinin by tryptic hydrolysis*", *Agricultural Biological Chemistry*, 42, 2103-2109.

Kamata, Y. and Shibasaki, K. (1978b) "*Formation of digestion intermediate of glycinin*", *Agricultural Biological Chemistry*, 42, 2323-2329.

Kampf, N. and Nussinovitch, A. (1997) "*Rheological characterization of  $\kappa$ -carrageenan soy milk gels*", *Food Hydrocolloids*, 11, 261-269

Kato, A. and Nakai, S. (1980) "*Hydrophobicity determined by a Fluorescence Probe Methods and its Correlation with Surface of Proteins*", *Biochimica and Biophysica Acta*, 624, 13-20.

Kato, A.; Mifuru, R.; Matsudomi, N. and Kobayashi, K. (1992) "*Functional casein-polysaccharide conjugates prepared by controlled dry heating*", *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 56, 567-571.

Kato, A.; Murata, K. and Kobayashi, K. (1988) "*Preparation and characterization of ovalbumin-dextran conjugate having excellent emulsifying properties*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 421-425.

Kato, A.; Osako, Y., Matsudomi, N. and Kobayashi, K. (1983a) "*Changes in the emulsifying and foaming properties of proteins during heat denaturation*", *Agricultural Biological Chemistry*, 47, 33-37.

Kato, A.; Takahashi, A.; Matsudomi, N. and Kobayashi, K. (1983b) "*Determination of foaming properties of proteins by conductivity measurements*", *Journal of Food Science*, 48, 62-65.

Kilara, A. and Panyam, D. (2003) "*Peptides from milk proteins and their applications*" *Critical Review of Food Science Nutrition*, 43, 607-633.

Kim, S.H. and Kinsella, J.E. (1985) "*Surface activity of food proteins: Relationships between surface pressure development, viscoelasticity of interfacial films and foam stability of bovine serum albumin*", *Journal of Food Science*, 50, 1526-1530.

Kim, S.H. and Kinsella, J.E. (1987a) "*Surface active properties of food proteins: Effects of reduction of disulfide bonds on a film properties and foam stability of glycinin*", *Journal of Food Science*, 52, 128-131.

Kim, S.H. and Kinsella, J.E. (1987b) "*Surface active properties of proteins: Effects of progressive succinylation on film properties and foam stability of glycinin*", *Journal of Food Science*, 52, 1341-1343.

- Kim, S.Y.; Park, P.S.W. and Rhee, K.C. (1990) "*Functional Properties of Proteolytic Enzyme Modified Soy Protein Isolate*" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 651-656.
- Kinsella, J.E. (1976), CRC. *Critical Review of Food Science Nutrition*, 7, 219.
- Kinsella, J.E. (1979) "*Functional properties of soy proteins*", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56, 242-258.
- Kinsella, J.E. (1981a) "*Functional properties of proteins: possible relationships between structure and function in foams*", *Food Chemistry*, 7, 273-288.
- Kinsella, J.E. (1981b) "*Relationships between structure and functional properties of food proteins*", in *Food Proteins*, ed. by P.E. Fox and J.J. Condon, Applied Science Publishers, Essex, England. Ch.3: 51-103.
- Kinsella, J.E. and Phillips L.G. (1989) "*Structure: function relationships in food proteins, film and foaming behavior*", in *Food proteins*, ed. by J.E. Kinsella and W.G. Soucie. The AOCS - Champaign, IL., Ch.4: 52-77.
- Kinsella, J.E.; Damodaran, S. and German, B. (1985) "*Physicochemistry and function of oilseed proteins*", in *Foods*, A.M.Atschul and H.L.Wilke (Eds.), *New Protein Vol.5*, Academic press, New York, Ch.5: 108 - 179.
- Kiosseoglou, V. and Doxastakis, G. (1988) "*The Emulsification Properties of Soybean Protein in the Presence of Polysaccharides*", *Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie* 21, 33-35.
- Kitabake, N. and Doi, E. (1982) "*Surface tension and foaming of protein solutions*", *Journal of Food Science*, 47, 1218-1225.
- Kitabake, N. and Doi, E. (1988) "*Surface tension and foamability of protein and surfactant solutions*", *Journal of Food Science*, 53, 1542-1569.
- Kloek, W.; van Vliet, T. and Meinders, M. (2001) "*Effect of bulk and Interfacial rheological properties on bubble dissolution*", *Journal of Colloid and Interface Science*, 237, 158-166
- Kobayashi, K.; Kato, A. and Matsudomi, N. (1991) "*Developments in new functional food materials by hybridization of soy protein to polysaccharides*", *Nutritional Science of Soy Protein*, 11 , 23-28.
- Kobayashi, K.; Huang, C. and Lodge, T.P. (1999) "*Thermorreversible gelation of aqueous methylcellulose solutions*", *Macromolecules*, 32, 7070-7077.



- Kobylasni, J.R.; Perez, O.E. and Pulosof, A.M.R. (2004) "*Thermal transitions of gluten-free doughs as affected by water, egg white and hydroxypropylmethylcellulose*", *Thermochimica Acta*, 411, 81-89.
- Kuehler, C.A. and Stine, C.M. (1974), *Journal of Food Science*, 39, 379.
- Laemmli, U.K.(1970) "*Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4*", *Nature*, 227, 680-687.
- Lahl, W.J. and Braun, S.D. (1994) "*Enzymatic production of protein hydrolysates for food use*", *Food Technology*, 48, 68-71.
- Leckband, D. and Israelachvili, J. (1993) "*Molecular basis of protein function as determined by direct force measurements*", *Enzyme Microbial Technology* 15, 450-459.
- Ledward, D.A. (1994) "*Protein – polysaccharide interactions*", Protein Functionality in Food Systems, ed. by Hettiarachchy, N. and Ziegler, G.; Marcel Dekker, New York, ch.8: 225-260.
- Lewis, B.A. and Chem, J.H. (1979) "*Effect of concentration and structure changes induced by solvent and limited enzyme modification on the functionality of soy proteins*", *ACS Symp. Ser.*, 92, 27-35.
- Liu, M.; Lee, D-S. and Damodaran, S. (1999) "*Emulsifying properties of acidic subunits of soy 11S globulin*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4970-4975.
- Lin, Y.; Hsieh, F.; Huff, H.E. and Iannotti, E. (1996) "*Physical, mechanical and thermal properties of water-blown rigid polyurethane foam containing soy protein isolate*", *Cereal Chemistry*, 73, 189-196.
- Lynch; C.J., Rha, C.K. and Catsimpoolas, N. (1977 a) "*Tryptic hydrolysis of glycinin and its subunits*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 971-979.
- Lynch,C.J.; Rha, C.K. and Catsimpoolas, N.(1977 b) "*Note on the rapid proteolysis of glycinin by pepsin and trypsin*", *Cereal Chemistry*, 54, 1282-1285.
- Lippi, M.S. and Taranto, M.V. (1981) "*Soy protein - acidic polysaccharide interaction: modification of the emulsification properties of soy protein isolate*", *Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie*, 14, 55-59.
- Loisel, W.; Guéguen, J. and Popineau, Y. (1993) "*A new apparatus for analyzing foaming properties of proteins*", Food proteins. Structure and Functionality, ed. by K.D. Schwenke and R. Mothes. VCH, Publishers, New York Germany, 320 - 323.

Lovati, M.R.; Manzoni, C.; Gianazza, E. and Sirtori, .R. (1998) “*Soybean protein products as regulators of liver low – density lipoprotein receptors – I Identification of active  $\beta$ -conglycinin subunits*” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2474-2480.

Lucassen-Reynders, E.H. (1993) “*Interfacial viscoelasticity in emulsions and foams*”, *Food Structure*, 12, 1-12.

Lumen, B. O. (1990) “*Molecular approaches to improving the nutritional and functional properties of plant seeds as food sources: developments and comments*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1779-1788.

Lundin, L. and Hermansson, A.-M. (1998) “*Multivariate analysis of the influences of locust beam gum,  $\alpha_s$ -casein,  $\kappa$ -casein on viscoelastic properties of Na- $\kappa$ -carrageenan gels*”, *Food Hydrocolloids*, 12, 175-187.

Mackie, A.R.; Gunning, A.P.; Wilde, P.S. and Morris, V.J. (1999) “*The orogenic displacement of proteins from the air-water interface by surfactant*”, *Journal of Colloids and Interface Science*”, 210, 157-166.

Mackie, A.R.; Gunning, A.P.; Wilde, P.S. and Morris, V.J. (2000) “*Competitive displacement of  $\beta$ -lactoglobulin from the air-water interface by sodium dodecyl sulphate*”, *Langmuir*, 16, 8176-8181.

Mackie, A.R.; Gunning, A.P.; Ridout, M.J.; Wilde, P.J. and Rodriguez Patino, J.M. (2001) “*In situ measurement of the displacement of proteins films from the air/water by surfactant*”, *Biomacromolecules*, 2, 1001-1006.

Mahmoud, M.I.; Malone, W.T. and Cordle, C.T. (1992) “*Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical proprieties*”, *Journal of Food Science*, 57, 1223-1229.

Mannheimer, R.J. and Schechter, R.S. (1970) “*An improved apparatus and analysis for surface rheological measurements*”, *Journal of Colloids and Interface Science*, 32, 195-211.

Martin, A.H.; Bos, M.A. and van Vliet, T. (2002) “*Interfacial rheological properties and Conformational aspects of soy glycinin at the air/water interface*”, *Food Hydrocolloids*, 16, 63-71.

Martínez, K.D.; Baeza, R.I.; Millán, F. and Pilosof, A.M.R. (2005) “*Effect of limited hydrolysis of sunflower protein on the interactions with polysaccharides in foams*”, *Food Hydrocolloids*, 19, 361-369.

Martínez, K.D.; Carrera Sánchez, C.; Pizones Ruiz-Henestrosa, V.; Rodríguez Patino, J. M. and Pilosof, A.M.R. (2006a) ” *Soy protein interactions-polysaccharides interactions at the air-water interface*”, *Food Hydrocolloids*. In press.

- Martínez, K.D.; Carrera Sánchez, C.; Pizones Ruiz-Henestrosa, V.; Rodríguez Patino, J. M. and Pilosof, A.M.R. (2006b) " *Effect of limited hydrolysis of soy protein on the interactions with polysaccharides at the air-water interface*", Food Hydrocolloids. In press.
- McCarthy, K.L. and Heil, J.R. (1990) " *Internal liquid flow during foam drainage: A comparison of theory and experiment*", Chemical Engineering Symposium Series, 86, 71-75.
- McCarthy, K.L.; McCarthy, M.J. and German, J.B. (1989) " *Foam and emulsion stability: Measurements by MRF*", Proc. Int. Congr. Eng. Food, 5th, 28, 3.
- McClements, D.J. (1999) " *Interfacial properties and their characterization*", in Food emulsions: principles, practice and techniques, ed. by McClements, D.J., CRC press Ch. 5: 127-159.
- McCristal, C.B.; Ford, J.L. and Rajabi-Siahboom, A.R. (1997), *Thermochimica Acta*, 291-94.
- MacRitchie, F. (1978) " *Proteins at interfaces*", *Advances in Protein Chemistry*, 32, 283-323.
- MacRitchie, F. (1989) " *Protein adsorption/desorption at fluid interfaces*", *Colloids Surfaces*, 41, 25-34.
- Matsumura, Y. and Mori, T. (1996) " *Gelation*", in: Methods of testing protein functionality, edited by Hall, G.M., Blakie Academia and Professional, London, U.K. Cap. 4, 76-109.
- Meullenet, J.F.; Chang, H.C.; Carperter, J.A. and Resurreccion, A.V.A. (1994) " *Textural properties of chicken frankfurters with added collagen fibers*", *Journal of Food Science* 59, 729-733.
- Millán, F.; Vioque, J.; Sanchez Vioque, R.; Clemente, A.; Pedroche, J. and Bautista, J. (1999). *Hidrolizados proteicos para la preparación de alimentos específicos*. VER
- Miller, R.; Krägel, J.; Wüstneck, R.; Wilde, P.J.; Li, J.B.; Fainerman, V.B.; Loglio, G. and Neumann, A.W. (1998) " *Adsorption kinetics and rheological properties of food proteins at air/water and oil/water interfaces*", *Nahrung*, 42, 225-228.
- Miller, S.; Aksenenko, E.V.; Fainerman, V.B. and Pison, U. (2001) " *Kinetics of adsorption of globular proteins at liquid/fluid interfaces*", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 183, 381-390.
- Miñones Conde, J.M.; Yust, J. Pedroche, M.M.; Millán, J.J. and Rodríguez Patino, J.M. (2005) " *Effect of enzymatic treatment of extracted sunflower proteins on solubility, amino acid composition, and surface activity*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 153, 8038-8045.

Miñones Conde, J.M., and Rodríguez Patino, J.M. (2006) “*The effect of enzymatic treatment of a sunflower protein isolate on the rate of adsorption at the air-water interface*”, *Journal of Food Engineering*, 78, 1001-1009.

Mita, T., Ishida, E. and Matsumoto, H. (1978) “*Physicochemical studies on wheat protein foams: Relationship between bubble size and stability of foams prepared with gluten and gluten components*”, *Journal of Colloids Interface Science*, 64, 143-153.

Mita, T.; Nikai, K.; Hiraoka, T.; Matsuo, S. and Matsumoto, H. (1977) “*Physicochemical studies on wheat protein foams*”, *Journal of Colloids Interface Science*, 59, 172-177.

Mleko, S.; Li-Chan, E.C.Y. and Pikus, S. (1997) “*Interactions of  $\kappa$ -carrageenan with whey proteins in gels formed at different pH*”, *Food Research International*, 30, 427-433.

Monnereau, C. and Vignes-Adler, M. (1998) “*Optical tomography of real three-dimensional foams*”, *Journal of Colloids and Interface Science*, 202, 45-53.

Molina, S.E. and Wagner, J.R. (2002) “*Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties*”, *Food Research International*, 35, 511-518.

Molina, S.E.; Sánchez, C.; Rodríguez Niño, M.R.; Añón, M.C. and Rodríguez Patino, J.M. (2003) “*Structural characterization and surface activity of spread and adsorbed soy globulin films at equilibrium*”, *Colloids and Surfaces*, 32, 57-67.

Moreira, M.A.; Hermodson, M.A.; Larkins, B.A. and Nielsen, N.C. (1979) “*Partial characterization of the acidic and basic polypeptides of glycinin*”, *The Journal of Biological Chemistry*, 254, 9921-9926.

Morris, E., Rees, D. and Robinson, G. (1980) “*Cation-specific aggregation of carrageenan helices. Domian model of Polymers gel structure*”, *Journal of Molecular Biology*, 138, 349-362.

Morris, V.J. (1998) “*Gelation of polysaccharides*”, in Functional properties of food macromolecules, ed. by Hill, S.E.; Ledward, D.A. and Mitchell, J.R., Aspen Publication, Ch.4: 143-226.

Mouécoucou, J.; Villaume, C.; Bau, H.M.; Schwertz, A.; Nicolas, J.P. and Méjean, L. (1995) “*Decrease of in vitro hydrolysis of soybean protein by sodium carrageenan*”, in Food colloids and macromolecules, ed. by E. Dickinson & D. Lorient, Cambridge, UK, The Royal Society of Chemistry, p. 357-359.

Murray, B.S. (2002) “*Interfacial rheology of food emulsifiers and proteins*”, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 7, 426-431

- Nagano, T.; Akasaka, T. and Nishinari, K. (1995) “*Study on the heat-induced conformational changes of  $\beta$ -conglycinin by FTIR and CD analysis*”, *Food Hydrocolloids*, 9, 83-89.
- Nahringbauer, I. (1995), *Journal of Colloids and Interface Science*, 176, 318.
- Narsimhan, G. and Uraizee, F. (1992) “*Kinetics of adsorption of globular proteins at an air-water interface*”, *Biotechnology Progress*, 8, 187-196.
- Nielsen, N. C. (1985a) “*Structure of soy proteins*”, *New protein foods*, Vol.5, Ch.II: 27-64.
- Neiser, S.; Draget, K. & Smidsrod, O. (2000) “*Gel formation in heat-treated bovine serum albumin-  $\kappa$ -carrageenan systems*”, *Food Hydrocolloids*, 14, 95-110.
- Nielsen, N. C. (1985b) “*The structure and complexity of the 11S polypeptides in soybeans*”, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62, 1680-1686.
- Nutt, C. W. and Burley, R.W. (1989) “*The influence of foam rheology in enhanced oil recovery operations*”, in *Foams: Physics, Chemistry and Structure*. ed. by A.J. Kilson, Springer-Verlag, London, Ch.8: 105-147.
- Ould Eleya, M.M. and Turgeon, S.L. (2000) “*Rheology of  $\kappa$ -carrageenan and  $\beta$ -lactoglobulin mixed gels*”, *Food Hydrocolloids*, 14, 29-40.
- Panyam, D., Kilara, A. (1996) “*Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification*”, *Trends of Food Science and Technology*, 7, 120-125.
- Petrucelli, S. (1993a) “*Modificaciones estructurales de aislados proteicos de soja producidas por tratamientos reductores y térmicos y su relación con propiedades funcionales*”, Tesis, Univ. Nac. de La Plata, Argentina.
- Pérez, O.E. (2005) “*Funcionalidad de Proteínas Alimentarias: Modificaciones inducidas por la aplicación de campos eléctricos pulsantes y por interacción con polisacáridos*”, Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- Pérez, O.E.; Carrera Sánchez, C.; Rodríguez Patino, J.M. and Pilosof, A.M.R. (2006) “*Thermodynamic and dynamic characteristics of hydroxypropylmethylcellulose adsorbed Films at the air-water interface*”, *Biomacromolecules*, 7, 388-393.
- Pérez, O.E.; Carrera Sánchez, C.; Rodríguez Patino, J.M. and Pilosof, A.M.R. (2007) “*Adsorption dynamics and surface activity at equilibrium of whey proteins and hydroxypropyl-methyl-cellulose mixtures at the air-water interface*”, *Food Hydrocolloids*, in press.

Petrucelli, S. and Añón, M.C. (1994b) “*Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 1. Structural and hydration properties*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2161-2169.

Petrucelli, S. and Añón, M.C. (1994b) “*Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 2. Surface properties*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2170-2176.

Phianmongkhol, A. and Varley, J. (1999) “*A multi point conductivity measurement system for characterisation of protein foams*”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 12, 247-259.

Phillips, M.C.; Evans, M.T.A.; Graham, D.E. & Oldani, D. (1975) “*Structure and properties of proteins films adsorbed at the air-water interface*”, *Colloid and Polymer Science*, 253, 424-427.

Phillips, M.C. (1981) “*Protein conformation at liquid interfaces and its role in stabilizing emulsions and foams*”, *Food Technology*, 35, 50-57.

Phillips, L.G.; Haque, Z. and Kinsella, J.E. (1987) “*A method for the measurement of foam formation and stability*”, *Journal of Food Science*, 52, 1074-1077.

Phillips, L.G.; Whitehead, D.M. and Kinsella, J. (1994a) “*Functional properties of proteins*” Structure-Function Properties of Food Proteins, ed. by Phillips, L.G.; Whitehead, D.M. and Kinsella, J. Academic Press, U.K.; 108-110.

Phillips, L.G.; Whitehead, D.M. and Kinsella, J. (1994b) “*Protein films*” Structure-Function Properties of Food Proteins, ed. by Phillips, L.G.; Whitehead, D.M. and Kinsella, J. Academic Press, U.K.; Ch.5: 111-130.

Phillips, L.G.; Whitehead, D.M. and Kinsella, J. (1994c) “*Protein- Stabilized foams*” Structure-Function Properties of Food Proteins, ed. by Phillips, L.G.; Whitehead, D.M. and Kinsella, J. Academic Press, U.K.; Ch.6: 131-152.

Plietz, P.; Damaschum, G.; Müller, J.J. and Schwenke, K.D. (1983) “*The structure of IIS globulins from sunflower and rape seed. A small angle X-ray scattering study*”, *European Journal of Biochemistry*, 130, 315 - 320.

Pomeranz, Y. (1985) “*Proteins specific foods*”, in Functional properties of food components, ed by Pomeranz, Y. Academic Press, Ch. 6: 189-240.

Prins, A. (1988) “*Principles of Foam Stability*”, in Advances in Food Emulsions and Foams ed. by E. Dickinson and G. Stainsby, Elsevier Applied Science, London, Ch.3: 91-122.

- Prins, A. (1999) “*Stagnant surface behaviour and its effect on foam and film stability*”, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 149, 467-473.
- Pusky, G. (1975) “*Modification of functional properties of soy proteins by proteolytic enzyme treatment*”, Journal of the American Association of Cereal chemistry, 52, 655-664.
- Rao, M.A.; Damodaran,S.; Kinsella, J.E. and Cooley, H.J. (1986) “*Flow properties of 7S and 11S soy protein fractions*”, in Food Engineering and Process Applications: Transport Phenomena, ed. by Lemagher, M. and Jelen, P., Basel, Applied Science Publishers,N.Y. pp. 39-48.
- Rawel, H.M. and Muschiolik, G. (1994) “*Effect of structural changes on foaming properties of soy proteins*”, Food Hydrocolloids, 8, 287-298.
- Rhim, J.W.; Wu, Y.; Weller, C.L. and Schnepf, M. (1999) “*Physical characteristics of a composite film of soy protein isolate and propyleneglycol alginate*”, Journal of Food Science, 64, 149-152.
- Rodríguez Niño, M.R.; Wilde, J.P.;Clark, D.,Husband, F.A. and Rodríguez Patino, J.M. (1997a), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 3010.
- Rodríguez Niño, M.R.; Wilde, J.P.;Clark,D.;Husband, F.A. and Rodríguez Patino, J.M. (1997b) “*Rheokinetic analysis of protein films at the air-aqueous phase interface.2 Bovine serum albumin adsorption from sucrose aqueous solutions*” Journal of Agricultural Food Chemistry, 45, 3016-3021.
- Rodríguez Niño, M.R.; Carrera Sánchez, C. and Rodríguez Patino, J.M. (1998) “*Interfacial characteristics of  $\beta$ -casein spread films at the air-water interface*”, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 11, 13.
- Rodríguez Niño, M.R. and Rodríguez Patino, J.M (2002) “*Effect of the aqueous phase composition on the adsorption of bovine serum albumin to the air-water interface*” ,Industrial and Engineering Chemistry Research, 41, 1489-1495.
- Rodríguez Niño, M.R; Rodríguez Patino, J.M; Carrera Sánchez, C; Cejudo Fernández and Navarro García, J.M. (2003) “*Physicochemical characteristics of food lipids and proteins at fluid-fluid interfaces*”,Chemical Engineering Comm., 190, 15-47.
- Rodríguez Niño, M.R; Carrera Sánchez, C; Pizones, V. and Rodríguez Patino, J.M. (2004) “*Milk and soy proteins films at the air-water interface*”, Food Hydrocolloids in this issue doi: 10.1016/j Food Hyd.2004.10.008.
- Rodríguez Niño, M.R; Carrera Sánchez, C; Ruíz-Henestrosa, V. and Rodríguez Patino, J.M. (2005) “*Milk and soy protein films at the air-water interface*”, Food Hydrocolloids,19, 417-428.

- Rodríguez Patino, J.M.; Ruíz, M. and de la Fuente, J. (1992) “*Monostearin monolayers spread on aqueous solutions containing ethanol*”, *Journal of Colloid Interface Science*, 154, 146-159.
- Rodríguez Patino, J.M.; Naranjo, M. and Linares, J.A. (1995) “*Stability and mechanical strength of aqueous foams containing food proteins*”, *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, 99, 65-78.
- Rodríguez Patino, J.M.; Rodríguez Niño, M.R and Alvarez, J.M (1997) “*Interfacial and foaming characteristics of protein-lipid systems*”, *Food Hydrocolloids*, 11, 49-58.
- Rodríguez Patino, J.M.; Rodríguez Niño, M.R. and Carrera Sánchez, C. (1999) “*Adsorption of whey protein isolate at the oil-water interface as a function of processing conditions: a rheokinetic study*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3640-3648.
- Rodríguez Patino, J.M.; Carrera Sánchez, C.; Rodríguez Niño, M.R. and Cejudo Fernández (2001) “*Structural and dynamic properties of milk proteins spread at the air-water interface*”, *Journal of Colloids and Interface Science*, 242, 141-151.
- Rodríguez Patino, J.M.; Molina, S.E.; Carrera Sánchez, C.; Rodríguez Niño, M.R. and Añón, M.C. (2003a) “*Dynamic properties of soy globulin adsorbed films at the air-water interface*”, *Journal of Colloids and Interface Science*, 268, 50-57.
- Rodríguez Patino, J.M.; Rodríguez Niño, M.R. and Carrera Sánchez, C. (2003b) “*Protein-emulsifier interactions at the air-water interface*”, *Current opinion in Colloid and Interface Science*, 8, 387-395.
- Rodríguez Patino, J.M.; Carrera, C.; Molina, S.; Rodríguez Niño, M. R. and Añón, C. (2004) “*Adsorption of soy globulin films at the air-water interface*”, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 43, 1681-1689.
- Rodríguez Patino, J.M.; Carrera, C.; Molina, S. and Añón, M. C. (2005) “*Dilatational properties of soy globulin adsorbed films at the air-water interface from acidic solutions*”, *Journal of Food Engineering*, 68, 429-437.
- Rosell, C.M; Rojas J.A. and Benedito de Barber, C. (2001) “*Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality*”, *Food Hydrocolloids*, 15, 75-81.
- Samant, S.K.; Singhal, R.S.; Kulkarni, P.R. and Rege, D.V. (1993) “*Protein-polysaccharide interactions: a new approach in food formulations*”, *International Journal of Food Science and Technology*, 28, 547-562.
- Sanchez, C.; Schmitt, C.; Babak, V.G. and Hardy, J. (1997) “*Rheology of whey protein isolate-xanthan mixed solutions and gels. Effect of pH and xanthan concentration*”, *Nahrung*, 41, 336-343.



Sánchez, V.; Bartholomai, G.B. and Pilosof, A.M.R. (1994) “*Rheological properties of food gums as related to their water binding capacity and to soy protein interaction*”, *Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie*, 28, 380-385.

Sand, R.E.(1983) "*Nomenclature and structure of carbohydrate hydrocolloids*", Food Hydrocolloids, ed. by M. Glicksman, CRC press, Vol. I Ch.2: 19-46.

Sanz, T.; Salvador, A. and Fiszman, S.M.(2004), *Food Hydrocolloids*, 18, 227.

Sarkar, N. and Walker, L.C.(1995), *Carbohydrate Polymers*, 27,177.

Sathe, S.K. (1991) “*Isolation and characterization of the protein that co-purifies with soybean (Glycine Max L.) glycinin*”, *Journal of Food Biochemistry*, 15, 33-49.

Schmidt, R.H. and Padua, M.R. (1982) “*Effects of heat treatment and  $\kappa$ -carrageenan addition on protein solubility and viscosity of milk protein/peanut flour blends in an ionic environment simulating cow’s milk*”, *Journal of Food Processing and Preservation*, 6, 243-252.

Schmitt, C.; Sanchez, C.; Desobry – Banon, S. and Hardy, J. (1998) "*Structure and technofunctional properties of protein – polysaccharide complexes: a review*", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 689 – 753.

Schorsch, C.; Jones, M. and Norton, I. (2000) “*Phase behaviour of pure micellar casein /  $\kappa$ -carrageenan systems in milk salt ultrafiltrate*”, *Food Hydrocolloids*, 14, 347-358.

Semenova, M.G. (1996) “*Factors determining the character of biopolymer-biopolymer interactions in multicomponent aqueous solutions modeling food systems*”, in Macromolecular interactions in food technology, ed. by N. Parris; A. Kato; L.K. Creamer and J. Pearce, Washington, DC: ACS Symposium, Series 650, American Chemical Society, p. 37-49.

Semenova, M.G.; Belyakova, L.E.; Antipova, A.S. and Jubanova, M.A. (1999) “*Influence of maltodextrins with different dextrose equivalent on the thermodynamic properties of legumin in a bulk and at the air-water interface*”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 12, 287-297.

Sengupta, T., Razunovsky, L. and Damodaran, S. (2000) “*Phase separation in two-dimensional  $\alpha_s$ -casein/ $\beta$ -casein/water ternary film at the air-water interface*”, *Langmuir*, 16, 6583-6589.

Shih, F.F. (1991) “*Effect of anions on the deamidation of soy protein*”, *Journal of Food Science*, 56, 452-454.

Shih, F.F. (1994) "*Interaction of soy isolate with polysaccharide and its effect on film properties*", *Journal of the American Chemists’ Society*, 71, 1281 – 1285.

- Shih, F.F. and Campbell, N.F. (1993) “*Enzymic modification of soy proteins to improve their functional properties for food use*” ACS Symp. Ser., 528 (Food Flavor and Safety), 181-191.
- Sorgentini, D.A.; Wagner, J.R. and Añón, M.C. (1995) “*Effects of thermal treatment of soy protein isolates on the characteristics and structure-function relationship of soluble and insoluble fractions*”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 2471-2479.
- Sorgentini, D.A.; Wagner, J.R. (1999) “*Comparative study of structural characteristics and thermal behaviour of whey and isolate soybean proteins*”, Journal of Food Biochemistry, 23, 489-507.
- Smith, D.M.; Award, A.C.; Bennink, M.R. and Gill, J.L. (1995) “*Cholesterol reduction in liquid egg yolk using  $\beta$ -cyclodextrin*”, Journal of Food Science, 60, 691-694.
- Söderberg, I; Dickinson, E. and Murray, B.S.(2003) “*Coalescence stability of gas bubbles subjected to rapid pressure change at a planar air/water interface*”, Colloid and Surfaces, B: Biointerfaces, 30, 237-248.
- Stainsby, G. (1980) “*Proteinaceous gelling systems and their complexes with polysaccharides*”, Food Chemistry, 6, 3.
- Staub, H.W. and Ali, R. (1983) “*Nutritional and physiological values of gums*”, Food Hydrocolloids, Ed. M. Glicksman, CRC press, Vol. I Ch. 4, 101-121.
- Subirade, M.; Kelly, I.; Guéguen, J. and Pézolet, M. (1998) “*Molecular basis of film formation from a soybean protein: comparison between the conformation of glycinin in aqueous solution and in films*”, International Journal of Biological Macromolecules, 23, 241-249.
- Suttiprasit, F., Krisdahasima, V. and McGuire, J. (1992) “*The surface activity of  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin and BSA I*”, Journal of Colloids and Interface Science, 154, 316-326.
- Symers, K.C. (1980) “*The relationship between the covalent structure of the xanthomonas polysaccharide (xanthan) and its function as a thickening, suspending and gelling agent*”, Food Chemistry, 6, 63-76.
- Syrbe, A.; Fernandes, P.B.; Dannenberg, F.; Bauer, W. and Klostermeyer, H. (1995) “*Whey protein + polysaccharide mixtures: polymer incompatibility and its application*”, in Food colloids and macromolecules, ed. by E. Dickinson and D. Lorient, Cambridge, UK, The Royal Society of Chemistry, p. 328-339.
- Tanaka, M. and Fukuda, H. (1976) “*Studies on the texture of salad dressings containing xanthan gum*”, Journal Institute Canadian Science and Technology, 9, 130-134.

Thanh, V.H. and Shibasaki, K. (1976a) "*Mayor protein of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24, 1117-1121.

Thanh, V.H. and Shibasaki, K. (1976b) "*Heterogeneity of  $\beta$ -conglitinin*", *Biochimica Biophysica Acta*, 439, 326-338.

Thanh, V.H. and Shibasaki, K. (1978) "*Major proteins of soybean seeds. Subunit structure of  $\beta$ -conglitinin*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 692-695.

Thanh, V.H. and Shibasaki, K. (1979) "*Major proteins of soybean seeds. Reversible and irreversible dissociation of  $\beta$ -conglitinin*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27, 805-809.

Thomas, W.R. (1992) "*Carrageenan*", in Thickening and Gelling Agents for Food. Ed. by A. Imeson, Blackie Academic & Professional, London, Ch.2.

Tolstoguzov, V.B. (1986) "*Functional properties of proteins – polysaccharides mixtures*", in Functional properties of food macromolecules, ed. by Mitchell, J.R. and Ledward, D.A., Elsevier applied science publishers, London, 385.

Tolstoguzov, V.B. (1993) "*Thermodynamic incompatibility of food macromolecules*", in Food colloids and polymers: stability and mechanical properties, ed. By Dickinson, E. and Walstra, P., The Royal Society of Chemistry, 94-102.

Tolstoguzov, V.B. (1995) "*Some physico-chemical aspects of protein processing in foods. Multicomponent gels*", *Food Hydrocolloids*, 9, 317-332.

Tolstoguzov, V.B. (1997) "*Protein – Polysaccharide Interactions*", in Food Proteins and their Applications, ed. By Damodaran, S. and Paraf, A.; Marcel Dekker, Inc., New York, p. 171 – 198.

Tolstoguzov, V.B. (2003) "*Some thermodynamic considerations in food formulation*", *Food Hydrocoll*, 17, 1-23.

Tömösközi, S. and Pungor, A. (1993) "*A modified conductometric method for the measuring of foaming properties of protein concentrates and isolates*", Food proteins. Structure and Functionality, ed. by K.D. Schwenke and R. Mothes. VCH, Germany, pág. 316 - 319.

Toprakcioglu, C. (1994) "*Surface force measurements*", in Physical techniques for the study of food biopolymers, ed. by Ross-Murphy, S.B., Chapman & Hill, Ch.8: 393-440.

Torikata, Y.; Kato, M.; Kumagai, H. and Yano, T. (1991) "*Estimation of Foam Stability by Parameters in the Capillary Model*", *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 1307-1312.

- Tornberg, E. (1978) “*The interfacial behaviour of three food proteins studied by the drop volume technique*”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29,762-776.
- Tornberg, E. (1979) “*The adsorption behaviour of proteins at an interface as related to their emulsifying properties*”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 105-123.
- Toufeili, I; Daghner, S.; Shaderivian, S; Nouredine,A.; Sarakavi, M.; Farran, M.T. (1994), *Cereal Chemistry*, 71 , 594.
- Tsaliki, E.; Kechagia,U. and Doxastakis.,G. (2002) “*Evaluation on the foaming properties of cottonseed protein isolates*”, *Food Hydrocolloids*, 16, 645-652.
- Tsekov, R. (1999) “*Drainage of foams films*”, in Foams and Emulsions, ed. by J.F. Sadoc & N. Rivier, Netherlands, Kluwer Academic Publishers, p. 83-90.
- Tung, C.M. and Dynes, P.J. (1982) “*Relationship between viscoelastic properties and gelation in thermosetting systems*”, *Journal Applied Polymer Science*, 27, 569-580.
- Tziboula, A. and Horne, D.S. (1998a) “*Influence of milk proteins on the gel transition temperature and mechanical properties of weak  $\kappa$ -carrageenan gels*”, in Gums and stabilisers for the food industry , 9, ed. by Williams, P.A. and Phillips, G.O., The Royal society of Chemistry, UK, 202-211.
- Tziboula, A. and Horne, D.S. (1998b) “*Influence of whey protein denaturation on  $\kappa$ -carrageenan gelation*”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1-10.
- Tsumura, K.; Saito, T.; Tsuge, K.; Ashida, N.; Kugimiya, W. and Inouye, K. (2005) “*Functional Properties of Soy Protein Hydrolysates obtained by Selective Proteolysis*”, *Swiss Society of Food Science and Technology*, 38 ,255-261.
- Urlacher, B. and Dalbe, B. (1992) “*Xanthan Gum*”, in Thickening and Gelling Agents for Food, ed. by A. Imeson, Blackie Academic & Professional, London, Ch.9
- Utsumi, S. and Kinsella, J.E. (1985) “*Structure-Function Relationships in Food Proteins: Subunits Interactions in Heat-Induced Gelation of 7S, 11S, and soy isolate Proteins*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33, 297-303.
- Utsumi, S.; Matsumura, Y. and Mori, T. (1997) “*Structure – Function relationships of soy proteins*”, Food proteins and their applications, ed. by Damodaran, S. and Paraf, A., Marcel Dekker, Ch.9: 257-292.
- Van de Velde, F.; Peppelman, H.A; Rellena, H.S. and Tromp, R.H. (2001) “*On the structure of kappa/iota-hybrid carrageenans*”, *Carbohydrate Research*, 331, 271-283.
- Villanueva, A.; Vioque, J.; Sanchez-Vioque, R.; Clemente, A.; Bautista, J. and Millán, F. (1999 a) “*Reduction of an extensive sunflower protein hidrolysate by secuential hydrolysis with endo- and exo-proteases*” , *Grasas y Aceites*, 50, 472-476.

Villanueva, A.; Vioque, J.; Sanchez-Vioque, R.; Clemente, A.; Bautista, J. and Millán, F. (1999 b) "*Peptide characteristics of sunflower protein hydrolysates*", Journal of the American Oil's Chemist Society, 76, 1455-1460.

Vioque, J.; Sánchez-Vioque, R.; Clemente, A.; Pedroche, J. and Millán, F. (1999) "*Production and characterization of an extensive rapeseed protein hydrolysate*", Journal of American Oil's Chemist Society, 76, 819-823.

Vioque, J.; Sánchez-Vioque, R.; Clemente, A.; Pedroche, J. & Millán, F. (2000) "*Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties*", Journal of the American Oil's Chemist Society, 77, 1-4.

Wagner, J.R. (1994) curso "Funcionalidad y Tecnología de las Proteínas de Soja", Dpto. de Industrias, F.C.E.y N. - U.B.A.

Wagner, J.R. (2000) "*Propiedades superficiales*", en Caracterización funcional y estructural de proteínas, ed. por A.M.R. Pilosof y G.B. Bartholomai, cap. 3: 41-74.

Wagner, J.R. and Guéguen, J. (1999a) "*Surface functional properties of native, acid-treated, and reduced soy glycinin. I. Foaming properties*", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 2173-2180.

Wagner, J.R.; Sorgentini, D.A. and Añón, M.C. (1996) "*Thermal and electrophoretic behaviour, hydrophobicity, and some functional properties of acid-treated soy isolates*", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 1881-1889.

Walstra, P. (1988) "*Overview of emulsion and foam stability*", in Food Emulsions and foams, ed. by E. Dickinson, 242-257.

Walstra, P. (1989) "*Principles of foam formation and stability*", in Foams: Physics, chemistry and structure, ed. by A.J.Wilson, Basel: Springer-Verlag, Ch.1: 1-15.

Walstra, P. (1993) "*Principles of emulsion formation*", Chemical and Engineering Science, 48, 333-349.

Walton, A.G. and Maenpa, F.C. (1979) "*Application of fluorescence spectroscopy to the study of proteins at interfaces*", Journal of Colloid and Interface Science, 72, 265-277.

Wang, C.H. and Damodaran, S. (1990) "*Thermal gelation of globular proteins: weight – average molecular weight dependence on gel strength*", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38, 1157-1164.

Wang, J.C. and Kinsella, J.F. (1976) "*Functional properties of alfalfa leaf protein: foaming*", Journal Food Science, 41, 498-501.

- Waniska, R.D. and Kinsella, J.E. (1979) "*Foaming properties of proteins: evaluation of a foaming column aeration apparatus using ovalbumin*", *Journal of Food Science*, 44, 1398-1401.
- Ward, A.F.H. y Tordai, L. (1946) "*Time dependence of boundary tensions of solutions I*", *J. Chem. Phys.*, 14: 353-361.
- Were, L.; Hettiarachchy, N.S. and Kalapathy, U. (1997) "*Modified soy proteins with improved foaming and water hydration properties*", *Journal of Food Science*, 62, 821-850.
- Whistler, R.L.; Daniel, J.R. (1993) "*Carbohidratos*", Química de los Alimentos, ed. por Fennema, Ed. Acribia, Zaragoza, España, cap. 3.
- Wilde, P.J. and Clark, D.C. (1996) "*Foam formation and stability*", in Methods of testing protein functionality, ed. by G.M. Hall, Blakie Academic & Professional, ch.5: 110-148.
- Wilde, P.J. ; Mackie, A.R.; Husband, F.A.; Gunning, A.P. and Morris, U.J. (2004) "*Protein and emulsifiers at liquid interfaces*", *Advances in Colloid and Interface Science*, 108, 63-71.
- Wilson, A.J. (1989) "*Cryo – microscopical methods for the investigation of foam structure*", in Foams : Physics, chemistry and structure, ed. by Wilson, A.J., Basel: Springer-Verlag, Ch.6: 69-88.
- Wolf, W. J. (1970) "*Soybean proteins: Their functional, chemical and physical properties*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18, 969-976.
- Wolf, W. J. (1972) "*Purification and properties of the proteins*" in Soybeans: Chemistry and Technology, ed. by Smith, A.K. and Circle, Ch.4 : 93-143.
- Wolf, W.J. (1993) "*Sulphydryl content of glycinin: effect of reducing agents*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41,168–176.
- Wollenweber, C.A.V.; Makievski, R. and Daniels, R. (2000) "*Adsorption of hydroxypropyl methylcellulose at the liquid/liquid interface and the effect on emulsion stability*", *Colloids and Surfaces A*,172, 91-101.
- Wright, D.J. and Hemmant, W. (1987) "*Foaming of protein solutions: Comparison of large-scale whipping and conductimetric methods*", *Journal of Agricultural and Food Science*, 41, 361 – 371.
- Xie, Y.R. and Hettiarachchy, N.S. (1997) "*Xanthan gum effects on solubility and emulsification properties of soy protein isolate*", *Journal of Food Science*, 62, 1101-1104.
- Xie, Y.R. and Hettiarachchy, N.S. (1998) "*Effect of xanthan gum on enhancing the foaming properties of soy protein isolate*", *JAOCS*, 75, 729-732.

Xu, S. and Damodaran, S. (1993) “Comparative adsorption of native and denatured egg-white, human, and T<sub>4</sub> phage lysozymes at the air-water interface”, *Journal of Colloids and Interface Science*, 159,124-133.

Xu, S. y Damodaran, S. (1994) “Kinetics of adsorption of protein at the air-water interface from a binary mixture”, *Langmuir*, 10, 472-480.

Yamagishi, T.; Yamauchi, F. and Shibasaki, K. (1980) “Isolation and partial characterization of heat-denatured products of soybean 11S globulin and their analysis by electrophoresis”, *Agricultural and Biological Chemistry*, 44, 1575-1582.

Yamauchi, F.; Sato, M.; Sato, W., Katamata, Y. and Shibasaki, K. (1981a) “Isolation and purification of a new type of  $\beta$ -conglycinin in soybean globulins”, *Agricultural and Biology Chemistry*, 45, 2863.

Yamauchi, F.; Sato, M.; Sato, W., Katamata, Y. and Shibasaki, K. (1981b) “Isolation and purification of a new type of  $\beta$ -conglycinin in soybean globulins”, *Agricultural and Biology Chemistry*, 45, 2863.

Yamauchi, F.; Yamagishi, T. and Iwabuchi, S. (1991) “Molecular understanding of heat-induced phenomena of soybean protein”, *Food Reviews International*, 7, 283-322.

Yao, J.J.; Tanteeratarm, K. and Wei, L.S. (1990) “Effects of maturation and storage on solubility, emulsion stability and gelation properties of isolated soy proteins”, *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 67 , 974-979.

Yu, M. and Damodaran, S. (1991a) “Kinetics of protein foam destabilization: Evaluation of a method using bovine serum albumin”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1555-1562.

Yu, M. and Damodaran, S. (1991b) “Kinetics of destabilization of soy protein foams”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1563-1567.

Zasytkin, D.V.; Dumay, E. and Cheftel, J.-C. (1996) “Pressure and heat induced gelation of mixed  $\beta$ -lactoglobulin / xanthan solutions”, *Food Hydrocolloids*, 10, 203-211.

Zylberman,V. and Pilosof, A.M.R.(2002) “Relationship between the Glass Transition, Molecular Structure and Functional Stability of Hydrolyzed Soy Proteins”, in Amorphous Food and Pharmaceutical Systems, H. Levine (Ed.), (pp. 158-168). Royal Society of Chemistry.