



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

Trabajo de Tesis para optar al:

Magíster en Tecnología e Higiene de los Alimentos

Universidad Nacional de La Plata

SUERO DE SOJA LIOFILIZADO:

**COMPORTAMIENTO TÉRMICO Y
ESTABILIDAD**

Tesista: Bioq. Pablo Antonio Sobral

Director: Dr. Jorge Ricardo Wagner

La Plata, 2007

AGRADECIMIENTOS

Con todo mi afecto dedico este trabajo a mis padres Martha y Tito quienes siempre me apoyaron en forma incondicional, comprendiendo y aceptando los tiempos que conlleva todo trabajo experimental. A mi hermano Martín, quien pese a la distancia, siempre estuvo cuando lo necesité y me ayudó en todo.

Al Dr. Jorge Ricardo Wagner, por sus enseñanzas y correcciones en lo académico, las cuales junto a sus recomendaciones y consejos hicieron posible la conclusión de esta tesina.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA) y a sus autoridades, por haber facilitado sus instalaciones para el desarrollo de este trabajo.

A los profesores del Magíster, por su gran contribución en mi formación y al entendimiento de los aspectos teóricos-prácticos involucrados en este trabajo.

A todos aquellos profesores y personal de apoyo quienes excedieron sus obligaciones estrictamente académicas o laborales y me asistieron en cuestiones concretas y cotidianas, con invalorable charlas y recomendaciones, material bibliográfico y de laboratorio, e incluso el uso de las instalaciones pertenecientes a las cátedras.

Al personal del LIPROBE, por su buena disposición, facilitar técnicas y bibliografía y permitir el uso de sus laboratorios y equipos.

A la Fundación Ciencias Exactas (FONCYT), por otorgarme una beca que permitió profundizar los trabajos sobre el sistema en estudio y la presentación de resultados en Congresos.

A mis compañeros del Laboratorio de Proteínas, donde comencé mis primeros pasos, quienes no dudaron en ayudarme y orientarme, y a la gente del Laboratorio de Aceites por abrirme las puertas y hacerme un lugar.

A la Dra. Mabel Tomás por su constante apoyo, y por el gran aporte realizado en todas las cuestiones administrativas y demás gestiones tendientes a obtener los medios necesarios, para el desarrollo de este trabajo.

Finalmente quiero agradecer a los compañeros “permanentes del box”: Bioq. Paula Conforti, Ing. Analía Gómez, Dra. Cecilia Lupano, Ing Andrés Márquez, Dr. Gonzalo Palazolo y Dra. Cecilia Puppo, por crear y mantener una atmósfera de cordialidad, respeto y confianza.

ÍNDICE

Tema	Página
Agradecimientos	1
Índice	2
Resumen	6
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 – La soja	8
1.2 - Proteínas de soja	12
1.2.1 Solubilidad	12
1.2.2 Ultracentrifugación	13
Fracción 11S	13
Fracción 7S	15
Fracción 2S	16
1.3 - Oligosacáridos y polisacáridos	17
1.4 - Otros componentes de la soja	19
1.5 - Productos derivados del poroto de soja	21
1.6 - Estudios previos realizados en proteínas de suero de soja	25
1.7 - Pardeamiento no enzimático	28
1.7.1 Caramelización de azúcares	29
1.7.2 Reacción de Maillard	30
Etapas de la reacción de Maillard	32
Factores que afectan su desarrollo	33
Métodos de medición del pardeamiento no enzimático	33
1.8 Transición vítrea	36
Determinación de la Tg	38
Factores que afectan la Tg	42
1.9 Liofilización	43
Congelación	44
Sublimación del hielo	46
Almacenamiento en estado deshidratado en condiciones controladas	49

HIPÓTESIS DE TRABAJO	51
OBJETIVO GENERAL	52
Objetivos particulares	52
Metodología	52
2. MATERIALES Y MÉTODOS	54
2.1 Obtención del suero de soja	54
2.2 Tratamiento y fraccionamiento del suero de soja obtenido	54
2.2.1 Liofilización	55
2.2.2 Cinética de hidratación	56
2.2.3 Manipulación del suero de soja liofilizado	57
2.2.4 Tratamiento térmico del suero de soja liofilizado	58
2.3 Obtención de las proteínas de suero de soja	58
2.3.1 Por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 90%	58
2.3.2 Por precipitación con acetona al 50%	59
2.4 Determinación del porcentaje de proteínas	60
2.4.1 Método de Kjeldahl	61
2.4.2. Método de Lowry	61
2.4.3. Método de Bradford	62
2.5 Determinación de hidratos de carbono	63
2.5.1. Método de Antrona	63
2.5.2. Método de Dubois	64
Variantes del método	65
* Tratamiento térmico de los tubos	65
* Estabilidad del color	66
Curva de calibración	68
2.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	69
2.6.1 Reactivos utilizados:	69
2.6.2 Preparación de las muestras	70
2.6.3 Coloración de los geles	71
2.7 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	71
2.7.1 Calibración	72

2.7.2	Condiciones usadas en el trabajo y muestras analizadas por DSC	73
2.7.3	Tratamiento térmico del liofilizado de suero de soja	74
2.7.4	Aislamiento de las proteínas desde suero de soja liofilizado tratado térmicamente	75
2.7.5	Determinación del grado de glicosilación de las proteínas aisladas desde suero de soja liofilizado tratado térmicamente	75
2.8	Determinación de cenizas	75
2.9	Microscopía electrónica de barrido ambiental	76
2.10	Cromatografía en capa fina de azúcares (TLC)	76
2.11	Determinación de la actividad antitriptica	78
3.	COMPOSICIÓN DEL SUERO DE SOJA	82
3.1	Contenido de sólidos totales y cenizas en el suero de soja	83
3.2	Contenido de proteínas en el suero de soja	83
3.2.1	Sobre muestra de suero líquido	83
3.2.2	Sobre muestra de suero liofilizado	84
3.2.2 a)	Medidas con el método de Kjeldahl	84
3.2.2 b)	Medidas con el método de Lowry	84
3.3	Glúcidos en suero de soja liofilizado	86
3.3.1	Contenido de hidratos de carbono	86
3.3.1 a)	Método de Antrona	86
3.3.1 b)	Método de Dubois	86
3.3.2	Cromatografía de azúcares presentes en el suero de soja liofilizado	88
3.4	Conjunto de resultados obtenidos en el suero de soja líquido y liofilizado	90
4.	COMPORTAMIENTO TÉRMICO DE SUERO DE SOJA LIOFILIZADO. ESTUDIO POR CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)	92
4.1	Factores que pueden afectar la cristalización y fusión de azúcares en el suero liofilizado	93
4.2	Efectos del almacenamiento del suero de soja liofilizado sobre su comportamiento térmico	95
4.2.1	Transición vítrea	95
4.2.2	Fusión de azúcares	98
4.2.3	Desnaturalización de proteínas	101
5.	SUERO DE SOJA LIOFILIZADO TRATADO TÉRMICAMENTE	109
5.1	Características macroscópicas de SSL y SSLC	109

5.2 Azúcares en suero de soja liofilizado tratado térmicamente	109
5.3 Estado de agregación y glicosilación de las proteínas de SSL y SSLC	111
5.4 Estado de desnaturalización de las proteínas de suero	117
5.5 Actividad antitriptica	119
5.6 Efecto del tratamiento térmico sobre el espectro de absorción del suero liofilizado	122
6. PROTEÍNAS AISLADAS DE SUERO DE SOJA LIOFILIZADO	125
Con ACETONA sobre suero de soja líquido	125
Con ACETONA, sobre suero de soja liofilizado	125
Con ACETONA, sobre suero liofilizado tratado térmicamente	126
Con (NH ₄) ₂ SO ₄ , sobre suero de soja líquido:	127
6.1 Electroforesis de las proteínas precipitadas con acetona desde suero liofilizado	128
6.2 Proteínas precipitadas con acetona de suero de soja liofilizado tratado térmicamente	133
6.2.1 Recuperación de muestras SSLC	133
6.2.2 Observaciones macroscópicas	134
6.2.3 Comportamiento térmico de las proteínas precipitadas con acetona	134
6.3 Grado de glicosilación de las proteínas aisladas desde suero de soja liofilizado tratado térmicamente	137
7. EFECTO COMBINADO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO Y DEL ALMACENAMIENTO SOBRE EL SUERO LIOFILIZADO DE SOJA	140
7.1 Sobre la cristalización de azúcares y desnaturalización proteica	140
7.2 Sobre la estructura microscópica del suero liofilizado	144
8. CONCLUSIONES	152
9. BIBLIOGRAFÍA	155

RESUMEN

El suero de soja (SS) es el sobrenadante resultante de la precipitación isoeléctrica en la preparación tradicional de aislados a partir de harina de soja desgrasada. Este sub-producto es un residual líquido cuya importancia reside en el alto contenido en oligosacáridos, isoflavonas, vitaminas, oligoelementos, péptidos y proteínas biológicamente activas que, una vez inactivadas, poseen un alto valor biológico. Un tratamiento térmico directo destinado a reducir la carga orgánica e inactivar los factores antinutricionales presentes (factores antitripticos, hemaglutinina) resulta una opción poco atractiva debido a su elevado volumen y alta dilución. En este trabajo se analizó una estrategia que incluye una etapa de concentración/secado que facilita operaciones como la manipulación, el almacenamiento, el transporte seguido de un tratamiento térmico de manera de reducir el impacto ambiental, produciendo a la vez, un producto de posible interés para la industria alimenticia.

El suero de soja resultó un producto altamente diluido (extracto seco < 4%) que se concentra 34 veces mediante liofilización para dar un polvo con una relación carbohidratos totales: material nitrogenado de 3: 1 si los resultados se expresan en % p/p; también contiene sales, minerales y otros componentes minoritarios. El suero de soja liofilizado (SSL) contiene sacarosa y rafinosa-estaquirosa en relación 6: 1. Las fracciones proteicas identificadas (SDS-PAGE) en SSL fueron: banda I (90-100 kDa) formada por agregados y lipoxigenasa (Lx); II (57 kDa), amilasas (A); III (30 kDa), subunidades de lectina (L) y bandas IV-V correspondientes al factor antitriptico de Kunitz (FAK) y factor antitriptico de Bowman-Birk (FABB) de 20 y 8 kDa respectivamente.

El SSL con almacenamiento prolongado a -80°C produce la desnaturalización de las principales fracciones proteicas y la recristalización de los azúcares presentes (ambos fenómenos posiblemente relacionados). El almacenamiento produce una mayor desnaturalización del KTI en comparación con la L. El análisis por DSC del SSL reveló la presencia de 3 regiones de interés; una zona ubicada por debajo de 100°C dentro de la cual se encuentran la T_g del sistema ($-3,3^{\circ}\text{C}$) y una transición endotérmica correspondiente a la fusión de los cristales de azúcares ubicada a 67°C que se manifiesta luego de 50 días de almacenamiento, indicando que aún en estado vítreo ($T < T_g$) hay recristalización de azúcares. Una zona entre 100 y 180°C donde encontramos una gran transición endotérmica correspondiente a un fenómeno de glicosilación; dentro de esta última pueden identificarse la desnaturalización de las principales fracciones proteicas y observarse una

inversión en la susceptibilidad térmica entre el FAK y la L con relación al comportamiento visto en dispersiones acuosas o de sus proteínas aisladas. Finalmente para temperaturas superiores a 180°C hay descomposición y carbonización de la muestra.

El tratamiento térmico de SSL hasta diferentes temperatura finales (90-180°C) condujo a la formación de muestras tipo caramelo con la aparición de colores pardo-rojizo. El corrimiento del máximo de absorción hacia 285 nm de soluciones acuosas de estos caramelos, se atribuye a la mayor exposición de tirosina (desnaturalización proteica) y a la formación de 5-hidroxiacetilfurfural (HMF), debido a las reacciones de pardeamiento no enzimático. En SSL calentado (SSLC) hay un incremento en la formación de agregados, una disminución en la cantidad de azúcares libres y se generan productos de degradación de Maillard. La estabilidad frente a la agregación térmica de las fracciones proteicas identificadas en SSLC sigue el orden: A = Lx < L < FAK. El tratamiento térmico del SSL produce la glicosilación de sus proteínas con incremento del PM medio. La L (glicoproteína) forma agregados a menor temperatura que el FAK sin desnaturalizarse. Las electroforesis reveladas con coloración específica para glicoproteínas confirman que el tratamiento térmico induce reacciones de glicosilación e identifican a L como la principal proteína glicosilada. Se halló una fuerte correlación entre la inactivación biológica del FAK y los procesos de agregación (SDS-PAGE) y desnaturalización (DSC) ocurridos durante el calentamiento. Los estudios (ESEM) del SSLC revelan un incremento en la tendencia a la cristalización de los azúcares presentes en SSL al tratarlo térmicamente ($T > 140^{\circ}\text{C}$); se postula que el agua liberada durante el proceso de glicosilación sumada a la alta temperatura promueven la hidrólisis de oligosacáridos hasta mono o disacáridos, los cuales tendrían mayor tendencia a cristalizar.

Las proteínas aisladas desde SSLC tienen modificadas su estabilidad debido a la formación de agregados, los procesos de glicosilación y las interacciones con otras sustancias presentes en el suero. Los estudios combinando tratamiento térmico y almacenamiento indican que la posibilidad de eliminar agua juega un papel importante en la cantidad y estabilidad de los cristales formados.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 – La soja

La Soja (*Glycine max (L.) Merrick*) es una legumbre originaria de Asia; se piensa que genéticamente deriva de la *Glycine Ussuriensis* que crece ampliamente en Asia. El poroto se lo usa desde hace aproximadamente unos 2000 años antes de Cristo en forma de una pasta o "Shih", en 1712 el botánico Engelbert Kaemfere discutió en detalle los alimentos elaboradas por los japoneses a partir de este poroto.

Su cultivo intensivo comenzó en 1930 en EEUU, superando la producción anual las 100.000 toneladas con un rinde promedio de 1860 kg/ha. Mediante la selección y en la actualidad con la obtención de granos transgénicos (OGM) se buscaron obtener las variedades más ricas en proteínas (40-45%) y lípidos (18-20%) debido a que originariamente se lo usó para extraerle el aceite, y la harina remanente resultaba ser un subproducto empleado en la alimentación animal y como fertilizante. Se ha establecido una correlación entre una ganancia del 1,0% en proteínas a costa de 0,5% en aceite al hacer estas modificaciones (Cheftel y col., 1989). El poroto de soja, siendo una legumbre o leguminosa, está constituido en un 90% de unas estructuras denominadas cotiledones, un 8% de envolturas y un 2% de hipocotilo. En la Tabla 1 se muestra la composición en macro componentes de las distintas partes del grano.

Tabla 1: Composición porcentual en macrocomponentes hallados tanto en el poroto de soja entero como en las partes que lo componen. Fuentes: Cheftel y col., 1989; (*) Pearson, 1983.

	% ponderal en la semilla	Proteínas % (N x 6,25)	Lípidos %	Glúcidos % (Incluye fibras)	Cenizas %
Grano entero	100	40-42 (*)	20	35	4,9-5,5 (*)
Cotiledones	90	43	23	29	5,0
Envolturas	8	8,8	1	86	4,3
Hipo-cotilo	2	41	1,1	43	4,4

Actualmente, la mayoría de la soja se la usa en alimentación animal en forma directa o indirecta, y tiene aplicaciones en la elaboración de ciertos alimentos para el consumo humano.

Uno de los crecimientos más grandes en la producción de soja lo ha hecho Brasil que desde 1969 en un lapso de 10 años pasó a suministrar del 2 al 16% de la producción mundial. En la actualidad la producción de soja continua creciendo y bate récord año tras año; esto se debe a la mayor superficie dedicada a este cultivo, superficie que se duplicó entre los años 1992 a 2001 con superficies sembradas (expresados en miles de hectáreas) de 5089 y 10300 respectivamente, alcanzando las 11611 para el período 2002, pero también debido a la mejora en los rindes por hectárea, los cuales pasaron de 2263, 2530 y 2630 Kg/hectárea para los períodos mencionados. La producción actual supera las 30 millones de toneladas/año; este crecimiento se debe al aumento de la superficie dedicada a la actividad por desplazamiento de otros cultivos, al traslado de actividades ganaderas hacia áreas más marginales; en forma paralela a las medidas de política económica sectorial que favorecen este cultivo agregándole valor al producto con impuestos diferenciales, y al aumento del consumo mundial de aceites vegetales. Esta suma de factores fue lo que permitió a la Argentina convertirse en la actualidad el primer exportador mundial de aceite y de harina de soja (Daza, 2002)

Se estima que el 95% de la totalidad de la soja mundial se procesa en harina y aceite generando el 21% del aceite y el 61% de las proteínas usadas a nivel mundial. Una de las posibles maneras en que puede ser procesado el grano es extraerle el aceite para obtener productos que son más bajos en calorías que los de partida, los cuales se presentan con buenas perspectivas, debido a la alta proporción de proteínas y que el aporte de energía esta dado mayoritariamente por los carbohidratos, de manera que pueden ser aprovechados en países con problemas de sobrepeso. En el grano los glúcidos corresponden a polisacáridos insolubles tales como las hemicelulosas del tipo de los arabino-galactanos, las pectinas la celulosa (responsables, junto con la lignina, de un contenido en “fibras” próximo al 5%) y oligosacáridos solubles entre los que podemos mencionar la hexosa, sacarosa, rafinosa, estaquiosa y verbascosa. La composición típica de los carbohidratos presentes en la harina de soja se presentan en la Tabla 3, donde se advierte que aproximadamente la mitad de los carbohidratos son insolubles, por lo que contribuyen poco al aporte calórico.

El análisis de la estructura del poroto de soja mostró que las cubiertas se forman de 4 a 5 capas superpuestas de células de diferentes tipos; mientras que los cotiledones que se encuentran

por debajo de éstas se forman de células alargadas llenas de “*cuerpos proteicos*”, mismos que son esféricos con un diámetro de 2-10 micras (μm) y contienen la mayoría de las “*proteínas estructurales*”. Además cuenta con numerosos “*esferosomas*” de 0,1-0,5 μm de diámetro que contienen el aceite. Siendo las proteínas y el aceite los principales productos que se obtienen actualmente en Argentina de la soja.

En el corte histológico mostrado en el Figura 1 se observan los diferentes tipos de células que forman cada una de las capas desde las más externas (parte superior del esquema), hacia las más internas (parte inferior); los 5 tipos más externos de células se los agrupan en lo que se conoce como cubiertas del grano en tanto que los 2 más internos constituyen el cotiledón.

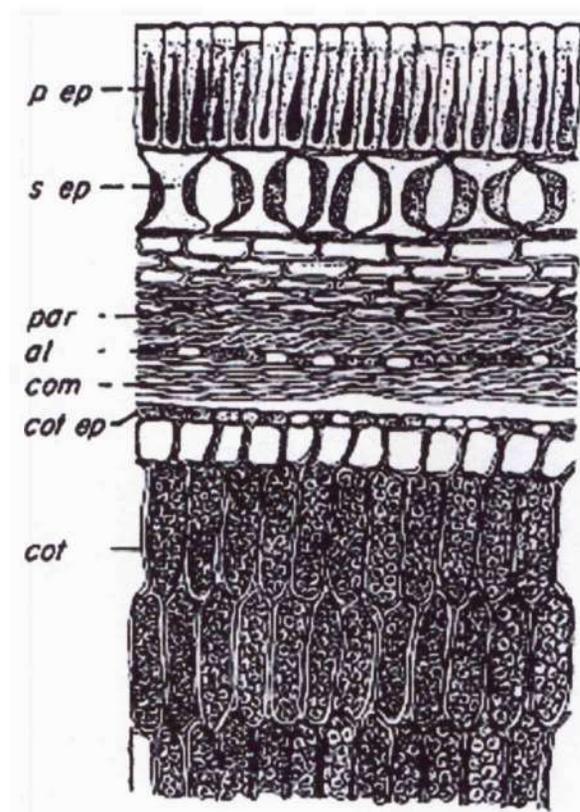


Figura 1: Corte histológico de Poroto de Soja. Se muestran los diferentes tipos de células presentes: Células en empalizada (notadas en esquema como “p ep”), por debajo las células en forma de copa (“s ep”), llamadas así por su semejanza con estas, por debajo están las células del parénquima (“par”), las de la aleurona (“al”) y las células del endosperma comprimidas (“com”),

conformando todas estas la cubierta del grano. En tanto el cotiledón se forma de epidermis del cotiledón (“cot ep”) y de células de la aleurona indicadas como “cot”. Pearson, (1983).

En la microfotografía electrónica de transmisión mostrada en la Figura 2 se destacan unas estructuras grandes, esféricas correspondientes a los cuerpos proteicos; en tanto los *esferosomas* conteniendo aceite son muchos más pequeños en comparación y presentan además un aspecto más claro. Estos cuerpos proteicos resisten la trituración moderada, y se los puede aislar a partir de la harina desgrasada; se sabe que contiene la mayor parte de las proteínas del grano, las que son llamadas proteínas de reserva o globulinas. Estas proteínas se hidrolizan durante la germinación y proporcionan el substrato nutritivo para el crecimiento del embrión, en tanto las otras proteínas estructurales o funcionales, como las enzimas o inhibidores de enzimas se localizan en el resto de la célula.

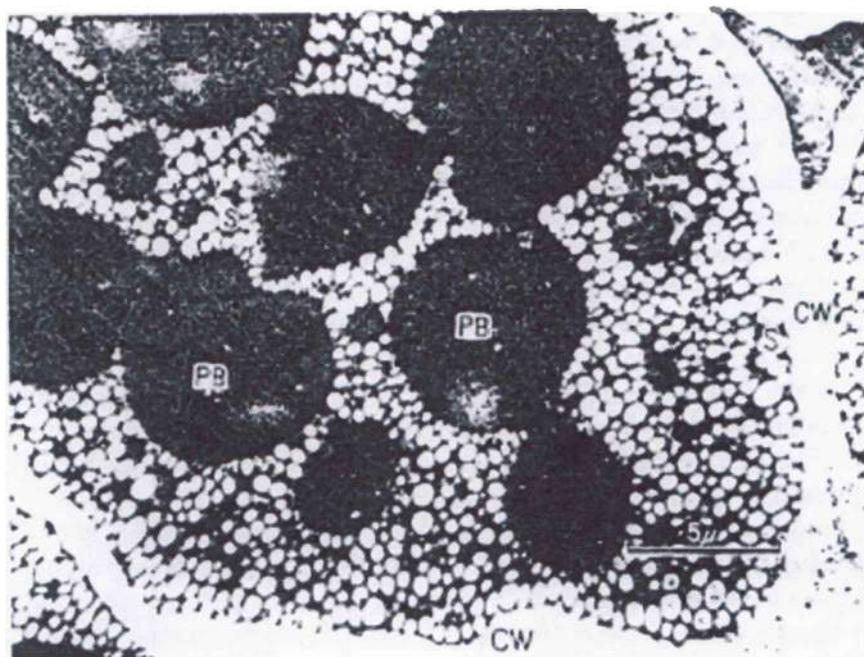


Figura 2: Microfotografía electrónica de transmisión de un poroto de soja, Pearson, 1983. Se observa principalmente dos clases de estructuras, las grandes, esféricas y densas identificadas en la misma como “PB” correspondientes a los cuerpos proteicos; los esferosomas son muchos más pequeños en comparación y presentan además un aspecto más claro; como referencia del

tamaño se incluye una escala de 5 micras y un tramo de pared celular identificado como "cw" en la parte derecha de la misma.

1.2 - Proteínas de soja

1.2.1 Solubilidad

Si analizamos la solubilidad global de las proteínas del grano de soja, triturado o entero en función del pH, (Lah y Cheryan, 1980) vemos que, las globulinas, principales constituyentes proteicos, presentan mínima solubilidad en el rango de pH (3,70-5,20) lo que está situado en torno de su punto isoelectrico (pH 4,2-4,6). Observándose un aumento de la solubilidad en la medida que nos alejamos de estos valores, hacia la región ácida (hasta pH 2,0), o hacia la alcalina. De hecho, tanto a un pH 2,0 como a pH 7,0 se solubiliza un 85% de las proteínas en agua y para el caso de la harina desgrasada la extracción en agua puede realizarse a pH 6,5 (Wolf y Cowan., 1975). Un agregado adicional de álcali aumenta la extracción de proteína en un 5-10% alcanzándose un porcentaje de solubilización del 95% a pH 11,0. Un perfil de solubilidad similar, puede ser obtenido si se parte desde una torta desgrasada de soja usando un solvente como el hexano, si esta ha sido preparada en condiciones suaves de trituración, sin calentamiento excesivo y haciendo el desolventizado a baja temperatura.

En este tipo de productos las proteínas más abundantes son las de reserva o globulinas, las cuales son insolubles en su Pi (punto isoelectrico), pero pueden ser solubilizadas parcialmente en estas condiciones por agregado de sales como el NaCl, hasta un valor de fuerza iónica (μ) de 0,5. También se observó que alejados del Pi estas son solubles aún en ausencia de sales o en condiciones de baja fuerza iónica (0-0,1), en forma más marcada en la zona alcalina pH \geq 7,0. De esta manera, el proceso de extracción de las proteínas de soja requiere maximizar la eficiencia de extracción minimizando la desnaturalización de las proteínas buscadas; para ello el procedimiento tradicional consiste en una extracción acuosa en condiciones ligeramente alcalinas (pH 8-9); para luego obtener los aislados proteicos acidificando la solución hasta una región de pH cercana al Pi en donde la solubilidad de las globulinas es mínima; el control del pH es importante ya que agregados adicionales de ácido ocasionan una resolubilización de las proteínas de soja; Pearson (1983).

1.2.2 Ultracentrifugación

Después de la disolución en agua a pH neutro o a un pH ligeramente alcalino, las proteínas de soja pueden separarse en varias fracciones por cromatografía permeable de gel, electroforesis o ultracentrifugación. Cuando se utiliza esta última técnica se separan cuatro fracciones cuyos coeficientes de sedimentación $S_{20,w}$ (unidades Svedberg, a 20°C en el agua) son respectivamente iguales a 2, 7, 11 y 15; Cheftel y col., 1989.

De los datos observados en la Tabla 2, se advierte que, las globulinas 7S y 11S representan por sí solas más del 70% de las proteínas de grano de soja, la fracción 15S no ha sido completamente estudiada aún, sin embargo estudios preliminares indican que estaría formada por polímeros de la subunidad 11S.

Fracción 11S

Esta fracción está constituida por la globulina 11S o glicinina de 350.000 Da, la que se compone de 12 polipéptidos; 6 de carácter ácido (A) y 6 de carácter básico (B) relativamente hidrofóbicos. Muchas veces el polipéptido A queda unido por un enlace disulfuro (S-S) al polipéptido B (ASSB); (Kitamura y col., 1976; Staswikj y col., 1984) por lo que se podría considerar a la glicinina como formada por 6 subunidades (AB). A su vez la glicinina parece contener dos grandes grupos distintos (I y II) de subunidades A (PM 31.000 a 38.000 Da) y de subunidades B (PM 18.000-20.000 Da). Aunque dentro de cada grupo hay polimorfismo, las analogías en secuencias N-terminales entre estos polipéptidos son del 85-90%, por el contrario entre los grupos I y II son mínimas con porcentajes de analogías menores al 50% entre diferentes grupos.

Un modelo estructural de la glicinina propone que las subunidades A y B están dispuestas en dos hexágonos idénticos que se superponen, asegurando una conformación globular rígida. En dicha estructura cada subunidad ácida, esta rodeada de tres subunidades básicas y recíprocamente, y la molécula contiene de 42-46 átomos de azufre especialmente bajo la forma

de uniones disulfuro entre subunidades o dentro de una misma subunidad, con presencia de grupos tioles lo que favorece los intercambios de uniones disulfuro.

Tabla 2: Fraccionamiento de las proteínas de soja por ultracentrifugación realizado sobre una muestra disuelta en agua o a un pH ligeramente alcalino. Fuente: Cheftel y col., (1989), (*) Pearson, (1983).

Fracción	Proporción (% p/p)	Componentes Proteicos	Masas Moleculares
2S	15 (22)*	Inhibidores de tripsina	7860-21500 (8000-21500) *
		Citocromo C	12000
		β amilasa	62000 (61700) *
7S	35	Lipoxigenasa	102000
		Hemaglutinina	110000
		Globulina 7S (β-Conglicinina)	140000-175000
11S	40 (31)*	Globulina 11S (glicinina)	320000-350000
15S	10 (11)	-----	600000

La glicinina se disocia fácilmente en sus subunidades, en condiciones de baja fuerza iónica (0,01), pH extremos, calentamiento a temperaturas de 80°C, o en presencia de urea, detergentes o agentes reductores, mientras que, con fuerza iónica más alta la estructura cuaternaria se estabiliza; esta estabilización se logra por un aumento de la hidrofobicidad superficial de las subunidades que favorezcan las interacciones hidrofóbicas entre las subunidades o bien por una neutralización de los grupos cargados, con un descenso de las repulsiones electrostáticas entre las subunidades.

Medidas físicas parecen indicar que en estado natural la glicinina o globulina 11S, así como la β-conglicinina o globulina 7S solo contienen un 5% de estructura de alfa hélice, estando constituida la estructura secundaria de la glicinina fundamentalmente por hojas β plegada (35% de la molécula) y un 60% de grupos compactos sin orden estadístico. En el caso de las globulinas 11S las subunidades que las conforman tienen una gran analogía aún entre especies diferentes de

leguminosas, siendo la hipótesis más aceptada la que basa su explicación en la necesidad de conservar la estructura cuaternaria compacta con el fin de mantener la máxima acumulación de proteínas de reserva para el desarrollo del embrión.

Fracción 7S

Esta fracción esta formada por varios tipos de proteínas, entre los más importantes podemos mencionar β -conglucina (principal globulina 7S), hemaglutininas, lipoxigenasas, β -amilasa y citocromo C. La principal globulina presente en la fracción 7S es la β -conglucina con una masa molecular comprendida entre 140-170 kDa; en el poroto se encuentra como glicoproteína con un contenido cercano al 5% de glúcidos (manosa y N-acetil-glucosamina), y existen al menos 7 formas (B₀-B₆) las cuales están constituidas por la combinación de tres subunidades α , α' y β (PM 57-68 kDa, 57-72 kDa y 42-52 kDa respectivamente) (Thanh y Shibasaki., 1978 a y b; Yamauchi y col., 1981). Las dos primeras subunidades tienen una composición aminoacídica muy afin desprovistas de cisteína y cistina, en tanto que la subunidad β carece de cisteína y metionina (Cheftel y col., 1989).

Las hemaglutininas (lectinas) se las llama así por su capacidad de formar complejos relativamente estables con compuestos glucídicos como los que se encuentra en la superficie de los glóbulos rojos, razón por la que los aglutina *in vitro*. Químicamente las lectinas halladas en la soja son glicoproteínas (110.000 Da, 4.5% D-mannosa, 1.5% de N-acetyl-D-glucosamina) representan del 1 al 3% de las proteínas presentes en la harina de soja. Estudios realizados por Liener (1974) informaron que de 2663 plantas estudiadas, 800 presentaron esta actividad, siendo algunas incluso tóxicas para animales o inhibiendo su crecimiento. Los granos de soja son conocidos por contener varias aglutininas con varios niveles de actividad (Kakade y col., 1972). Se sabe que todas las lectinas de soja son inactivadas por calor y por acción de proteasas como la pepsina. Según los estudios de Birk-Gertler (1961), las hemaglutininas contribuyen, aunque en forma mínima, en la disminución de la ganancia de peso observada en ratas y pollos alimentados con soja no tratada térmicamente. Estudios más recientes (Turner y col., 1975) demostraron que las hemaglutininas presentes en la soja sólo tienen una contribución menor al valor nutricional de las proteínas de soja, por lo que no representan problemas en los productos preparados a partir de

soja adecuadamente tratada como es la harina u otros productos que puedan ser usados en la alimentación humana.

En esta fracción también se encuentran dos o más lipoxigenasas. Son de especial interés en alimentos en los que catalizan la oxidación de ácidos grasos poli-insaturados dando peróxidos lipídicos que contribuyen a procesos de blanqueo, por ejemplo en la harina de trigo. Sin embargo la acción oxidativa de los ácidos grasos poli-insaturados es un efecto no deseable en la mayoría de los alimentos, y en los mismos productos de soja, ya que son responsables de la aparición de rancidez y del desarrollo de *off-flavors*. Son proteínas con un Pi 5,68 y fácilmente inactivadas por tratamiento térmico (Wolf y Corvan., 1975; Eskin y col., 1977; Iwabuchi y Yamauchi., 1987). Las β amilasas, otras enzimas presentes en soja, poseen una masa molecular de 57 kDa, un Pi 5,85 y carecen de puentes disulfuro (Morita y col., 1976).

Fracción 2S

Esta fracción contiene varios inhibidores de proteasas; al igual que en los granos de muchas otras plantas se encuentran en esta fracción debido a sus bajas masas moleculares. Liener (1981) demostró que los inhibidores de las proteasas son los responsables parciales del descenso del crecimiento observado en ratas alimentadas con soja cruda o preparaciones proteicas de soja no desnaturalizadas por calor, ya que el otro factor responsable del descenso del crecimiento reside en la baja digestibilidad de las globulinas de soja en estado natural. Estudios conducidos por Rackis (1978) indican que el consumo de alimentos preparados a partir de soja no tratada térmicamente ocasiona además una depresión energética del metabolismo y reduce la absorción de grasas.

Al parecer la presencia de inhibidores de las proteasas y globulinas no desnaturalizadas influyen en las ratas y otros animales de crianza complejando la tripsina, lo que provoca por medio de un mecanismo hormonal mediado por la colecistoquinina una hipertrofia del páncreas. Por otra parte el aumento de las secreciones pancreáticas con la excesiva eliminación en heces de enzimas ricas en aminoácidos azufrados agravan el déficit en aminoácidos azufrados debido a la ingestión de proteínas de soja. Sin embargo los alimentos destinado al consumo humano pasan por un tratamiento térmico que garantiza la inactivación de estos factores, en especial los destinados a ser empleados en la elaboración de fórmulas infantiles por lo que, si bien es cierto

que aún se detecta una actividad residual antitriptica esta no causa hipertrofia del páncreas al ser administradas a ratas (Churella y col., 1976).

Los dos factores antitripticos más importantes son el factor de Kunitz (FAK) y el de Bowman-Birk.(FABB) El primero tomó el nombre de quien primero cristalizó y caracterizó este factor (Kunitz, 1946); este factor es una globulina esférica con una estructura primaria y secundaria conocida con un predominio en pliegues β y con un centro activo que constituye el substrato específico de la tripsina, siendo la zona de contacto muy restringida en la que solo intervienen una docena de aminoácidos. Está constituido por 181 aminoácidos, tiene una masa molecular de 20 kDa y dos puentes disulfuro (Koide e Ikenaka., 1973). La presencia de estos puentes hace que sea un factor altamente estable en un rango de pH comprendido entre 3,0 y 10,0 mostrando asimismo una relativamente alta estabilidad térmica en condiciones de baja humedad (Koshiyama y col., 1981). Por su parte, el inhibidor de Bowman-Birk es una cadena de 71 aminoácidos, con un PM de 7861 Da con siete uniones disulfuro (Odani y col., 1972) de los cuales se conoce la ubicación y confieren a la molécula un acusado grado de simetría y una resistencia elevada frente a tratamientos térmicos (Dipietro y Liener., 1989a) así como al tratamiento con ácidos y proteasas. Como los sitios de inhibición se ubican en lados opuestos de la molécula, este factor tiene la capacidad de inhibir en forma simultánea a la tripsina y a la quimiotripsina.

1.3 - Oligosacáridos y polisacáridos

Como se observará más adelante en la Tabla 5, la contribución energética para el poroto intacto viene tanto del contenido graso como de los carbohidratos, mientras que para la harina desgrasada, así como en los concentrados o aislados, el aporte energético esta dado mayoritariamente por los carbohidratos, debido a que el aceite fue removido para su aprovechamiento, lo que lo convierte en un interesante producto para poblaciones con sobrepeso debido a que estos últimos productos son bajos en grasas y ricos en proteínas.

La composición típica de los carbohidratos presentes en la harina de soja se presentan en la Tabla 3, donde se advierte que aproximadamente la mitad de los carbohidratos son insolubles y constituyen la fibra dietaria, por lo que contribuyen poco al aporte calórico. Un 8,6% de los carbohidratos remanentes son oligosacáridos, los cuales son atacados por bacterias en el tracto

digestivo (Rackis, 1981) siendo los responsables de las flatulencias típicamente asociadas al consumo de la soja, al igual que el resto de las leguminosas. El problema con estos hidratos de carbono complejos es que al ser atacados por la microflora intestinal generan un gas que es mayoritariamente dióxido de carbono, hidrógeno y pequeñas cantidades de metano. Por otra parte el consumo de alimentos que ocasionan flatulencia estimula el desarrollo de la microflora anaerobia en el intestino (Rackis y col., 1970; Rockland y col., 1970). Entre los oligosacáridos presentes en la soja los que más contribuyen a este fenómeno son verbascosa, estaquiosa y rafinosa (Rackis, 1981) esto se debe a que escapan a la digestión siendo captados por los microorganismos responsables de dar cantidades extras de gas.

Tabla 3: Composición típica de los carbohidratos presentes tanto en escamas como en harina de soja, expresado en base seca (Pearson, 1983; Waggle y Kolar, 1979).

CARBOHIDRATOS		%
SOLUBLES, total		17
	Sacarosa	5,7
	Rafinosa	4,1
	Estaquiosa	4,5
	Verbascosa y hexosas	Trazas
INSOLUBLES, total		21
Hemicelulosa, celulosa, pectina, lignina		
Otros hidratos de carbono complejos		

La eliminación o reducción de oligosacáridos en los productos de soja es una alternativa importante para el consumo en humanos, porque estos ocasionan malestares como, calambres, náuseas, dolor abdominal, diarrea y aumento del peristaltismo intestinal. Los procesos desarrollados para tal fin incluyen una etapa de extracción con agua caliente o con mezclas etanol-agua, o tratamiento tales como la precipitación isoelectrica de las proteínas; paso que ocasiona la precipitación proteica y separación en el sobrenadante de los oligosacáridos en cuestión. De este modo los productos actualmente comercializados derivados de la soja como

concentrados o aislados son esencialmente libres o reducidos en compuestos generadores de flatulencia. Otros procesos empleados para librarse de este problema abarcan soluciones como remojar los granos, o realizar tratamiento como la hidrólisis enzimática, fermentación o simplemente hacer germinar los porotos, sin embargo es sabido que los polisacáridos de alto peso molecular presentes en la cubierta no dan flatulencia, pero los mismos son hidrolizados al germinar dando productos que si resultan ser flatulentos (Rackis, 1981). Desafortunadamente la harina desgrasada que suele ser el producto más comúnmente comercializado en general suele tener cantidades variables de estos oligosacáridos.

Sin embargo, estudios recientes mostraron que el consumo de oligosacáridos de soja es beneficioso por ejercer una acción probiótica basada en la estimulación del desarrollo de bacterias deseables en el intestino (prebióticos), lo que protege al intestino de la proliferación de bacterias nocivas y de la formación de sustancias tóxicas (Tomosatsu, 1994).

1.4- Otros componentes de la soja

En los granos de soja también hay presentes otros componentes, algunos de ellos con actividad biológica y otros que pueden ser usados como indicadores de proceso, entre estos últimos podemos mencionar la ureasa cuyo grado de inactivación es fácil de medir y sirve como indicador de la destrucción de los inhibidores de las proteasas durante el tratamiento térmico de las tortas destinadas a la alimentación animal. Entre los que cuentan con actividad biológica podemos mencionar compuestos con actividad goitrogénica, observando un agrandamiento de la tiroides en ratas alimentadas con una dieta basada en soja no tratada térmicamente (Wilgus y col., 1941) en tanto que si la misma era suplementada con yodo se suprimían estos síntomas.

Estudios realizados por Konijn y col., (1973) aislaron agentes goitrogénicos del fraccionamiento de la harina de soja los cuales están formados por 2-3 aminoácidos unidos por un azúcar y aunque su mecanismo de acción no está bien dilucidado aún, se cree que inhibe la recuperación intestinal de la tiroxina, por lo que se pierde yodo; esto ocasiona un aumento en la captación de yodo por parte de la tiroides resultando en una mayor pérdida por vía fecal de yodo, sin embargo el agrandamiento de la tiroides asociado al consumo de una dieta rica en soja es completamente reversible si se le suplementa una cantidad adecuada de yodo (Block y col., 1961). Estudios recientes realizados en poblaciones de ratas (Son y col., 2001) alimentadas con

dietas conteniendo diferentes proporciones de isoflavonas y harina desgrasada de soja con y sin deficiencias de yodo mostraron que, aunque el peso de la tiroides no se ve influenciado por las isoflavonas de soja, si se incrementa en las dietas conteniendo tanto harina desgrasada de soja como en aquellas con deficiencia de yodo, mostrando un incremento significativo en las dietas que combinan ambos factores. En comparación con una dieta control, los valores séricos de T_4 fueron significativamente ($P < 0,01$) incrementados en un 20% en las dietas conteniendo harina desgrasada en tanto que se vieron disminuidos ($P < 0,001$) en todas las dietas con déficit de yodo.

La soja contiene también un conjunto de isoflavonas glicosiladas entre las que podemos mencionar genisteina, daidzeina, glyciteina-7-O- β glucósido las cuales se saben tienen actividad estrogénica. El poroto de soja contiene 120 μg de coumestrol por cada 100 g (Knuckles y col., 1976) pero la mayor contribución a la actividad estrogénica la realizan la genisteina y la daidzeina (Drane y col., 1980).

Los fitatos o el ácido fitico (mio-inositol hexafosfatado) son componentes importantes en las semillas de las plantas y constituyen potencialmente una fuente importante de fósforo, que lamentablemente es pobremente digerido por los animales y el hombre. En la harina desgrasada de soja el contenido se ubica entre 1-5% de ácido fitico, generalmente asociado al germen intacto, este reacciona a pH ácido con las proteínas y luego de la neutralización forma complejos insolubles (Jaffe, 1981). Por este motivo durante el procesado pueden formarse complejos (proteínas-ácido fitico-minerales) lo que disminuye la biodisponibilidad de estos nutrientes, siendo éste el mecanismo de su acción antinutricional afectando más la biodisponibilidad del Zn seguido por el Fe y posteriormente por el Cu. Hay evidencias que algunos fitatos pueden ser hidrolizados en el tracto intestinal tanto del hombre como de animales, probablemente por la acción de la fosfatasa alcalina lo que volvería disponible el fosfato. Algunos estudios intentaron determinar los efectos de las proteínas de soja en la biodisponibilidad de los minerales en humanos así como optimizar los procesos para minimizar los efectos nocivos de los fitatos ya que la unión de los fitatos con proteínas ocurren durante el procesamiento (Jaffe, 1981).

Struthers y col. (1979) realizaron una revisión sobre lisinoalanina, su formación, importancia y control de los niveles en productos derivados de la soja por tratamiento térmico o alcalinos. El mecanismo es la eliminación del sulfuro de hidrógeno de la cisteína, deshidratación de la serina o hidratación de la cisteína en condiciones alcalinas, las que producen dehidroalanina, la que reacciona con el grupo ϵ -amino de la lisina. Este fenómeno es bien

conocido en los procesos que involucran tratamientos de proteínas en medios alcalinos y las cantidades formadas dependen de la temperatura, el tiempo de exposición al pH alcalino, el tipo y la concentración de la proteína presente y en ocasiones del tipo de catión que tengamos en el medio. Estudios toxicológicos revelan que salvo para el caso particular de la rata en donde la forma libre es un tóxico activo, no representa un peligro toxicológico para los humanos; sin embargo cantidades apreciables de lisinoalanina tanto libre como unida indica la destrucción de cistina, cisteína o lisina lo que indica que la biodisponibilidad de las proteínas probablemente haya sido muy afectada. Estudios posteriores realizados por Struthers (1981) concluye que con los tratamientos actuales que se le practican a las proteínas de soja, las mismas no representan un riesgo toxicológico para la alimentación humana.

Otros compuestos de importancia son las vitaminas y minerales. Respecto a las primeras, Liener (1978) informó que la harina de soja puede proporcionar entre 1/3 a 1/2 de la tiamina, riboflavina y niacina requeridas en la alimentación, tomando como base que la mitad de las proteínas ingeridas sean de soja, la deficiencia vitamínica más grande de la soja es la vitamina B₁₂ que esta virtualmente ausente en las proteínas vegetales.

La composición típica en base seca de los principales minerales presentes en diferentes productos derivado de la soja usados en alimentación humana se muestra en la Tabla 4. Los minerales significativamente importantes son calcio, hierro, cobre, fósforo y zinc (Waggle y Kolar, 1979), aunque los estudios realizados por Liener (1978) señalan que la cantidad y viabilidad de estos minerales se ven notablemente reducidas por el efecto complejante del ácido fítico.

1.5 - Productos derivados del poroto de soja

En la actualidad, en la Argentina, del poroto de soja se obtienen fundamentalmente dos productos de importancia comercial que son aceite y harina. En el caso del aceite hay excelentes revisiones que detallan el proceso (Eldridge, 1978; Serrato, 1981), a fin de optimizar la obtención del aceite, estos métodos proponen que previo al proceso de extracción del aceite, el poroto debe ser limpiado y descortezado para remover el 5% de materia extraña que contiene y llevarlo a valores del orden del 0,5% (Serrato, 1981) antes de proceder a las etapas de descortezado, quebrado y escamado del mismo.

Tabla 4 Composición típica en base seca de los principales minerales presentes en diferentes productos de soja usados en la elaboración de alimentos para el consumo humano. Pearson, 1983 citado de Waggle y Kolar (1979); (*) Erickson (1995).

Elemento	Harina desgrasada	Concentrado proteico	Aislado proteico
Azufre	0,25 %	0,42 %	0,63 %*
Calcio	0,22 %	0,22 %	0,18 %
Cloro	0,13 %	0,11 %	0,13 %; 0,15 %*
Cobre	23 ppm	16 ppm	12 ppm; 14 ppm*
Hierro	110 ppm	100 ppm	160 ppm
Magnesio	0,31 %	0,25 %	380 ppm; 415 ppm*
Manganeso	28 ppm	30 ppm	17 ppm; 11 ppm*
Fósforo	0,68 %	0,70 %	0,76 %; 0,82 %*
Potasio	2,37 %	2,10 %	960 ppm
Selenio	0,6 ppm	----	0,36 ppm; 0,20 ppm*
Sodio	254 ppm	50 ppm	1,1 %; 1,0 %*
Zinc	61 ppm	46 ppm	40 ppm; 36 ppm*

El descascarado es la etapa en donde se produce la separación de las cubiertas, lo que produce entre un 3-5% de cáscara con un 2,5% de aceite residual, el siguiente paso consiste en acondicionar el grano, para esto se usa una temperatura comprendida entre 65-70°C, ajustando la humedad al $11 \pm 0,5\%$. A continuación viene el escamado, etapa muchas veces considerada como la etapa más importante (Serrato, 1981), ya que de ésta dependerá en gran medida el rendimiento en aceite conseguido posteriormente. La extracción de aceite se realiza introduciendo las escamas dentro de un extractor que se encuentra a de 55°C, pasando por un sello de vapor que minimiza la pérdida de hexano, que es el solvente usado para hacer la extracción. El extractor es un recipiente cerrado donde se realiza la extracción del aceite desde las escamas del poroto de soja por percolación del solvente, en los sistemas más modernos el hexano se hace pasar a contracorriente, lo que incrementa significativamente la eficiencia de esta etapa del proceso.

Luego la mezcla de aceite-hexano llamada *micela* es bombeada fuera del reactor donde el hexano se recupera para ser reutilizado al ser evaporado en condiciones de baja presión, en tanto el aceite sufre las demás etapas de refinación de un aceite. El hexano remanente que queda en la "torta de escamas" se recupera por calentamiento, manteniendo la humedad entre 20-22% de modo de inactivar la ureasa y otorgar las cualidades nutricionales buscadas en la harina. Es en esta etapa donde se mide la actividad ureásica y se la utiliza como indicador, de cumplimiento de las condiciones necesarias para la destrucción de los factores antinutricionales. Una harina adecuadamente tratada debe tener un contenido de proteína ($N \times 6,25$) de 48-50% y un 12% de humedad.

Una vez obtenido el aceite, se procede con la separación de la harina, siendo el paso clave que determina la calidad de la harina de soja el proceso de desolventación y tostado (Mustakas y col., 1981), se han estudiado las variables de temperatura, humedad y tiempos de tratamiento con el objeto de optimizar el proceso, los resultados muestran que un enfriamiento rápido mejoran la calidad de la harina, así también la calidad de la harina aumenta con el contenido de humedad y calentamientos más prolongados. Respecto de la temperatura de tostado la eficacia del proceso se determina al medir la actividad de la ureasa remanente la cual mantiene un paralelismo con la inactivación de los factores antitripticos. Parámetros como la actividad residual de enzimas, inhibidores de las proteasas, solubilidad de las proteínas y color de la harina pueden ser usados como un criterio de la calidad de la proteína y la efectividad del proceso de tostados (Mustakas y col., 1981).

Otros principales productos proteicos derivados de la soja son los concentrados y aislados los cuales difieren en el contenido de proteína, teniendo los concentrados un mínimo de 70% de proteína (dado que contienen toda la fibra) en tanto que los aislados deben tener un mínimo del 90% de proteína en base seca (Meyer y Williams., 1976; Ohren, 1981). En la Tabla 5 se muestra las diferencias en composición entre los aislados, concentrados, harina y la materia prima de partida, el grano de soja.

La obtención de concentrados de proteínas partiendo de escamas desgrasadas se pueden hacer por tres métodos diferentes (Ohren, 1981) aunque el objetivo en todos ellos sea el mismo, el cual consiste en la inmovilización de la mayor cantidad de proteínas posible conjuntamente con la extracción de los carbohidratos solubles, sustancias nitrogenadas remanentes, y otros componentes solubles. Un método consta de una extracción alcohólica para lo que se usa alcohol

al 60-80%, otro en una extracción con agua ácida (pH 4,5), en tanto que la tercer forma se basa en un tostado o desnaturalización previa de las proteínas, empleando un tratamiento con calor húmedo, para luego hacer una extracción acuosa de las escamas de soja. Aunque los procesos industrialmente usados son patentes se sabe que los diferentes tratamiento afectan la calidad y aspecto del producto final. A modo de ejemplo se sabe que en la extracción acuosa el producto tendrá un color más oscuro que en el método en que previamente se desnaturalizan las proteínas antes de la extracción.

Tabla 5: Composición porcentual de productos de soja (Pearson, 1983).

	Proteína (N x 6,25)	Aceite	Carbohidratos (Incluye fibra)	Ceniza	Fibra Cruda
Poroto intacto	42	20	35	5,0	5,5
Harina de soja	40	20	35	5,0	5,5
Harina desgrasada	54	1,0	38	6,0	3,5
Concentrado	70	1,0	24	5,0	3,5
Aislado	92	0,5	2,5	4,5	0,3

Para el caso de los aislados de proteínas de soja, la materia prima generalmente usada es harina o escamas de soja desgrasada a la que se le hace una extracción con agua o agua ligeramente alcalina. A diferencia de la obtención de concentrados, se requiere que la harina de partida contenga las proteínas con la mayor solubilidad posible por lo cual se debe evitar el desolventizado en caliente. Este proceso separa las proteínas del residuo insoluble compuesto principalmente por fibras, luego las proteínas de reserva son separadas del extracto por precipitación isoelectrica (pH 4,5), luego se lavan, son llevadas a la neutralidad, pueden ser modificadas por tratamientos adicionales (que pueden incluir calentamiento, adición de sales diversas o el empleo de fosfolípidos), se concentran y secan para ser usadas en la elaboración de alimentos. De este proceso queda una fracción soluble a pH 4,5 que se la conoce como suero de soja que contiene las proteínas biológicamente activas de la soja, oligosacáridos y otros componentes solubles como sales, vitaminas y pigmentos.

1.6 - Estudios previos realizados en proteínas de suero de soja

Sorgentini y Wagner (1999) estudiaron las proteínas de suero de soja en forma comparativa con las de reserva presentes en los aislados de soja. Las proteínas de soja están constituidas en forma mayoritaria por las globulinas de almacenamiento 7S y 11S, las cuales corresponden en conjunto el 61% de las proteínas totales halladas en el poroto, y por una segunda fracción minoritaria de proteínas solubles a pH 4,50 las cuales han sido denominadas por los autores como proteínas de suero de soja. El material de partida que utilizaron para la extracción de las proteínas fue harina desgrasada, aplicando un protocolo que les permitía separar las proteínas globulares de reserva de las proteínas de suero presentes en la harina.

Estas proteínas de suero fueron separadas y concentradas por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 90%, y posteriormente desaladas por diálisis contra agua y azida sódica al 0,02%, con un paso posterior de liofilización para su conservación. Estas proteínas fueron analizadas por DSC en dispersiones al 20% en agua, empleando un rampa de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. Los datos se muestran en la Tabla 6 y de su análisis se evidencia que hay una concordancia entre las transiciones halladas entre proteínas nativas de soja y las proteínas de suero de soja.

En los estudios realizados al variar la fuerza iónica (μ), notaron que en el caso del aislado nativo de soja (ANS), los picos se corren a mayores temperaturas en la medida que aumenta la fuerza iónica ($0 < \mu < 1$); mientras que las entalpías de desnaturalización exhiben bajos valores al trabajar entre $0,2 < \mu < 0,5$; hecho que puede ser atribuido a la elevada contribución proveniente de la entalpía de agregación como resultado de las interacciones proteína-proteína en condiciones de fuerzas iónicas elevadas (Hermansson, 1978). Una posible explicación para estos resultados involucra considerar la energía asociada a la agregación (proceso exotérmico) el cual se opone a la entalpía de desnaturalización la cual, en la naturaleza esta representada mayoritariamente por la ruptura de puentes de hidrógeno (Privalov y Khechinashvili, 1974).

En contraste con esto las proteínas de suero de soja (PSS) analizadas en el intervalo $0 < \mu < 1$ muestran poca variación en los valores de temperaturas de pico (T_p), incrementándose ligeramente con el aumento de la μ . Por otra parte los valores de ΔH calculados a partir de termogramas para el caso de las PSS son prácticamente constantes en el intervalo de μ analizadas con valores considerablemente menores que los hallados para ANS.

Tabla 6: Comportamiento térmico de proteínas de soja presentes en aislado nativo (ANS) y proteínas de suero de soja (PSS). FAK corresponde al Factor Antitriptico de Kunitz. Tp: Temperatura de pico

Muestra	Transiciones térmicas				Entalpía de desnaturalización (J/g)
	Pico 1		Pico 2		
	Tp (°C)	Facción Responsable	Tp (°C)	Facción responsable	
ANS	77,6 ± 1,2	7S	90,5 ± 1,6	11S	17,8 ± 0,8
PSS	74,0 ± 0,5	FAK	90,4 ± 0,8	Lectina	10,8 ± 1,2

Para identificar las proteínas que contribuyen a las transiciones mencionadas se realizaron estudios DSC en agua y en NaCl 1M de ANS, PSS y de proteínas control (presumiblemente presentes en estas fracciones) basándose en resultados previamente obtenidos por electroforesis, agregando además, un control de ureasa, por antecedentes de actividad enzimática determinada en muestras similares. La determinación de actividad ureásica indica que la harina usada no fue inactivada térmicamente (Dipietro y Liener, 1989b). Los datos de estos ensayos se muestran en la Tabla 7. Para el caso de ANS, utilizando en una relación 7S: 11S de 2: 3 (determinada por SDS-PAGE) la diferencia entre los valores teóricos de ΔH calculados (17,3 J/g) y los obtenidos por estos autores son mínimos. En tanto que para las PSS asumiendo una relación FAK : Lectina de 3: 2 los valores teóricamente calculados de ΔH (18,0 J/g) son significativamente mayores a los mostrados en la Tabla 7 (ΔH 10,8 J/g) diferencia que sugiere que las PSS sufren un grado de desnaturalización superior al 40%, sustentando la idea que estas proteínas son sensibles a los procesos de preparación.

Estudios realizados sobre el efecto de las condiciones ácidas en la actividad de proteínas biológicamente activas presentes en la soja demuestran que el FAK no se afecta entre $3,0 < \text{pH} < 11,0$. Por otra parte tanto la lipoxigenasa como ureasa a pH 4,50 son inactivadas en un 94% y 22% respectivamente (Koshiyama y col., 1981; Che Man y col., 1989). La falta de actividad ureásica ($\Delta \text{pH}=0$) en las muestra de PSS no puede ser explicado solamente por el factor pH, por lo que se presume una desnaturalización adicional, probablemente por el tratamiento de liofilización empleado en la conservación de las muestras.

Tabla 7: Resultados obtenidos a partir de termogramas DSC (10°C/min) de dispersiones 20% en agua destilada con y sin NaCl 1M de las muestras: ANS, PSS y los controles de proteínas constitutivas, fracción 7S, fracción 11S, FAK, Lectina, ureasa y factor antitriptico de Bowman-Birk (FBB). Las abreviaturas son las mismas que las empleadas en Tabla 6.

	Agua		NaCl 1M	
Muestras	Tp (°C)	Entalpía (J/g)	Tp (°C)	Entalpía (J/g)
ANS	77,6 ± 1,2 ; 90,5 ± 1,6	17,1 ± 0,8	95,0 ± 1,6 ; 110,8 ± 1,3	19,8 ± 2,8
7S	77,5 ± 0,5	13,8 ± 1,0	95,2 ± 0,6	14,2 ± 0,7
11S	91,0 ± 0,4	19,7 ± 0,9	111,0 ± 0,5	19,0 ± 1,1
PSS	74,0 ± 0,3 ; 90,4 ± 0,8	10,8 ± 1,2	81,7 ± 0,5 ; 92,9 ± 0,6	11,2 ± 1,5
FAK	75,7 ± 0,1	13,6 ± 0,5	82,5 ± 0,1	14,4 ± 0,2
Lectina	92,8	24,6 ± 0,4	95,6	24,4 ± 0,5
FBB	77,1 ± 0,3	4,0 ± 0,1	79,5 ± 0,4	4,1 ± 0,2
Ureasa	87,1 ± 0,4	16,6 ± 0,7	92,3 ± 0,3	16,8 ± 0,7

Las experiencias hechas con electroforesis muestran que las PSS se forman mayoritariamente de FAK (20 kDa) y Lectina (35 kDa). La ureasa no fue detectada por electroforesis, en tanto que el FABB si bien es detectado, se lo halla en baja proporción comparado con el FAK y se ubica en el rango de 8-10 kDa.

Por último, estos autores realizaron medidas de grupos sulfhídricos libres, totales, e hidrofobicidad superficial. En el caso de las ANS se observa un aumento de la hidrofobicidad superficial con la salinidad lo cual puede ser atribuido a la estructura formada entre la sal y el agua hecho que favorece las interacciones hidrofóbicas (Damodaran y Kinsella, 1982). Esta tendencia a la agregación es probablemente la causa de la alta estabilidad térmica registrada para las globulinas 7S y 11S en condiciones de alta fuerza iónica (μ), lo que se refleja en el incremento de los valores de Tp con el aumento de μ .

Por el contrario las PSS son menos estructuradas y de menor peso molecular, presentan comparativamente bajos valores de hidrofobicidad superficial siendo muy poco afectados por los cambios en la μ (en el rango ensayado). Entre las proteínas presentes en la fracción PSS, el FAK

es el que presenta los valores más bajos de hidrofobicidad superficial y T_p , hecho que sugiere que la baja estabilidad térmica es el resultado de la baja hidrofobicidad superficial.

1.7 - Pardeamiento no enzimático

Entre las reacciones que pueden ocurrir durante el almacenamiento y el procesamiento del suero de soja, dado su contenido de proteínas y oligosacáridos, se encuentran las reacciones de pardeamiento no enzimático las cuales conducen a la formación de pigmentos pardos y diversos compuestos intermedios, que ocasionan alteraciones en sus características nutricionales, organolépticas y funcionales.

Hay tres rutas principales por las cuales puede ocurrir la reacción de pardeamiento no enzimático en un alimento (Braverman, 1963), caramelización de azúcares, reacción de Maillard y oxidación del ácido ascórbico, esta última no posible en suero de soja dada la falta de vitamina C. Lo que caracteriza a estas reacciones, es que en todas ellas intervienen grupos carbonilos llamados "activos". La caramelización ocurre cuando se calientan compuestos polihidroxicarbonílicos (azúcares reductores y ácidos polihidroxicarbonílicos). En tanto que la llamada reacción de Maillard, es la ruta más frecuente hallada entre las reacciones de pardeamiento, involucra conjuntamente grupos carbonilo y grupos amino, provenientes en general de azúcares reductores y de proteínas respectivamente (Hodge y Osman, 1976).

De esta forma, los compuestos polihidroxicarbonílicos, azúcares no reductores y aquellas sustancias en las que la función carbonilo tiene un bloqueo permanente no dan reacciones de pardeamiento (Schwimmer y Olcott, 1953). Por tanto, un azúcar no reductor como la sacarosa primero debe hidrolizarse para dar compuestos reactivos y poder participar en las reacciones de pardeamiento. La composición así como el pH del medio junto con la temperatura a la que es sometido un alimento determinarán el tipo de reacción predominante. Los efectos del pardeamiento no enzimático sobre los alimentos son múltiples, entre ellos podemos nombrar:

- ◆ Cambios de color debidos a la producción de sustancias parduscas y destrucción de pigmentos presentes en el alimento (Meschter, 1953).
- ◆ Producción de aromas y sabores (Pokorny, 1980).
- ◆ Pérdida de solubilidad de proteínas con los consiguientes cambios en la textura y alteración en el poder de reconstitución de los alimentos deshidratados (Labuza y col., 1977).

- ◆ Pérdida del valor nutritivo al dañarse aminoácidos esenciales como la L-lisina (Mauron, 1981) o vitaminas como el ácido ascórbico (Clegg, 1964).
- ◆ Producción de metabolitos de potencial acción tóxica (Powries y col., 1981).
- ◆ Liberación de CO₂ (Cole, 1967).
- ◆ Disminución del pH (Ellis, 1959).

En la mayoría de los casos estos efectos son indeseables y resultan perjudiciales, particularmente en el procesamiento y almacenamiento de alimentos deshidratados (Lea, 1958) y de humedad intermedia (Erikson, 1982). Sin embargo hay procesos en que las reacciones de pardeamiento no enzimático resultan beneficiosas y deseables, como lo es en la cocción de la carne, fabricación de pan, caramelo, dulce de leche y productos relacionados. También podemos mencionar dos propiedades beneficiosas derivadas de la mezcla de compuestos producidos en las reacciones de pardeamiento no enzimático, por su acción antioxidante sobre los lípidos de ciertos alimentos (Lingnert y Eriksson, 1981) y su eventual acción antimicrobiana (Lara y Gilliland, 1985).

1.7.1 Caramelización de azúcares

Cuando se calientan azúcares en forma anhidra o en solución, éstos se descomponen dando un pigmento pardo, de naturaleza polimérica, conocido como “caramelo”. Esta descomposición es catalizada por ácidos y bases. Los azúcares experimentan hidrólisis, enolización, isomerización, deshidratación, fragmentación y oxidación. De este modo se forman compuestos carbonílicos altamente reactivos que reaccionan entre sí dando polímeros insaturados de color pardo (Hodge y Osman, 1976). En medio ácido predomina la deshidratación, siendo los principales intermediarios el furfural a partir de pentosas, mientras que la descomposición de hexosas produce el 5-hidroxiacetilfurfural (HMF), un esquema de estas reacciones se muestra en la Figura 3. En tanto en medio alcalino las reacciones de enolización ocurren rápidamente, abundan los productos de fragmentación y oxidación, y como resultado de esto el pardeamiento es muy rápido.

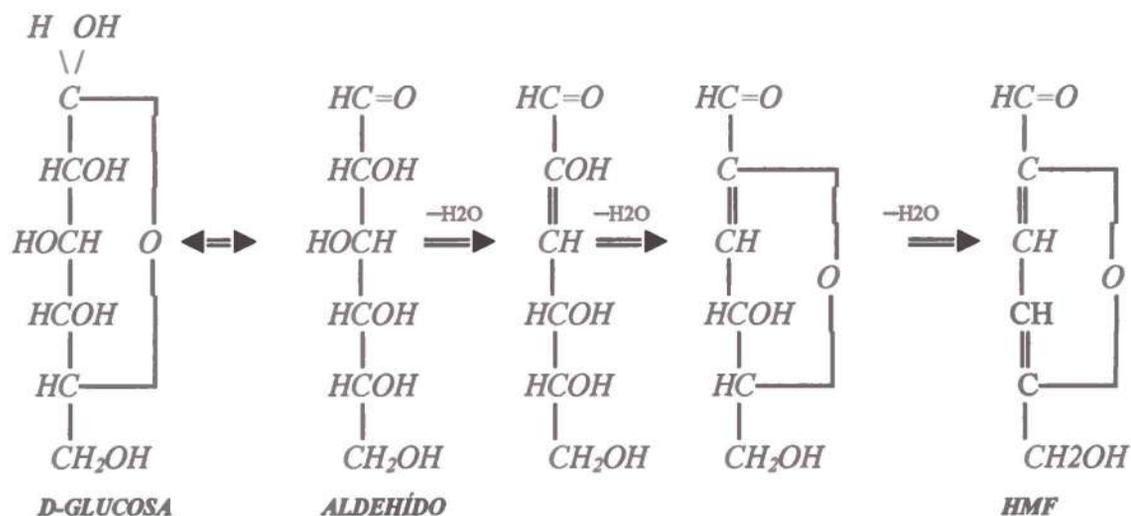


Figura 3: Mecanismo propuesto para las reacciones involucradas en las etapas iniciales del pardeamiento no enzimático, Braverman (1963).

1.7.2 Reacción de Maillard

Es la más frecuente causa del pardeamiento no enzimático en alimentos. La reacción se origina en la condensación de un grupo carbonilo reactivo, proporcionado usualmente por un azúcar reductor y un grupo amino proveniente de un aminoácido o proteína. Habiéndose demostrado su importancia en el pardeamiento de alimentos deshidratados y de humedad intermedia. La reacción de Maillard comprende un grupo complejo de varias reacciones que comienzan con la apertura del anillo hemiacetalico de los azúcares reductores y la enolización de los mismos, seguida de una serie de transformaciones que conducen a la formación de pigmentos amarillos rojos y/o marrones.

En el caso de la reacción de Maillard el pigmento que se forma tiene nitrógeno en su composición, y se denominan “*melanoidinas*” (Shallenberger y Birch, 1975). Las reacciones generales de caramelización y Maillard usualmente siguen la misma secuencial pero la principal diferencia es que en la reacción de Maillard los aminoácidos y péptidos reaccionantes se condensan con el azúcar y actúan como “catalizadores internos” en las reacciones de enolización y deshidratación subsiguientes, de manera que la reacción global de formación de pigmentos resulta acelerada.

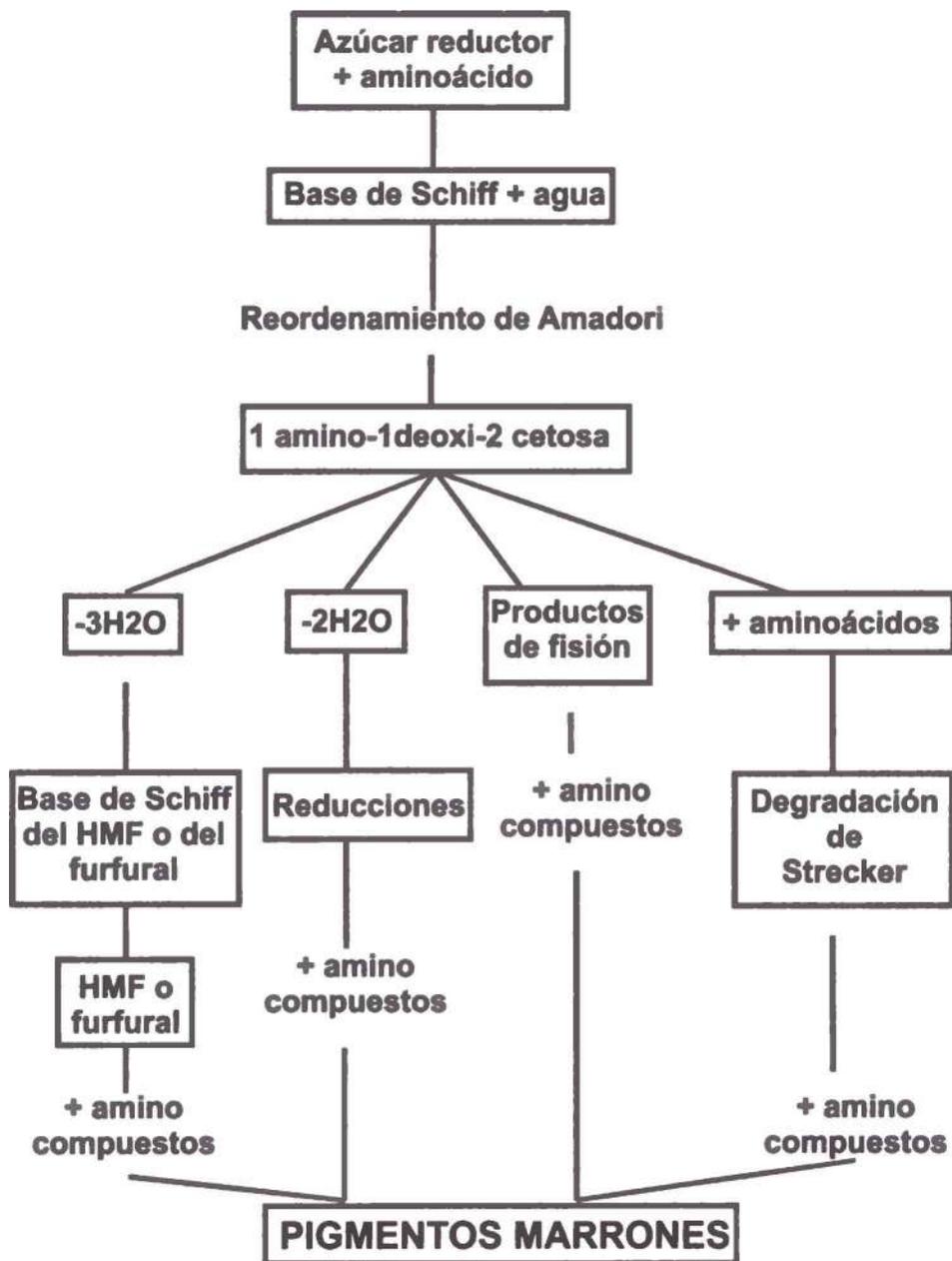


Figura 4: Esquema de la reacción de Maillard (adaptado de Hodge, 1953); el cual se considera una descripción apropiada de esta reacción.

La función del amino-compuesto es la de retener al azúcar en la conformación de cadena abierta, hecho que favorece la reacción de degradación. Hodge (1953) integró la información disponible, en un esquema simplificado, el cual se muestra en la Figura 4.

Etapas de la reacción de Maillard

◆ Etapa inicial que se caracteriza por la formación de productos incoloros sin absorción en el UV cercano, misma que se la puede dividir en una 1^{ra} etapa en donde se produce una condensación entre un azúcar-amino, seguida de un reordenamiento, denominado “Reordenamiento de Amadori”.

◆ Etapa intermedia caracterizada por la formación de productos incoloros o amarillo pálido con fuerte absorción en el UV; etapa en la que ocurren sucesivamente una deshidratación y fragmentación de azúcares, seguida por una degradación de amino ácidos.

◆ Etapa final caracterizada por la formación de productos coloreados con las etapas de condensación aldólica y polimerización aldehído-amina con formación de compuestos heterocíclicos conteniendo nitrógeno. Estas transformaciones conducen a la formación de pigmentos coloreados (amarillos, rojo y/o marrones) de naturaleza coloidal (Burton y Mc Weeny, 1963), denominados “*melanoidinas*”.

Estos polímeros insaturados contienen nitrógeno en su composición y en ellos, tanto la composición como el peso molecular dependen de las sustancias reactivas y de las condiciones de reacción. Algunas melanoidinas son solubles en agua y soluciones alcohólicas, en cambio otras son insolubles. Se han estudiado e identificado en sistemas modelo diversas estructuras heterocíclicas y grupos funcionales, pero no ha sido encontrada una secuencia homóloga (Kato y Tsuchida, 1981; Baltes, 1982).

Debe destacarse que también como consecuencia de la reacción de Maillard se forma 5-hidroximetilfurfural (HMF) y que además, durante la reacción, se desprende CO₂, y aunque el O₂ no es un componente indispensable para que la reacción se lleve a cabo, puede consumirse O₂ si el mismo está presente. En resumen aunque la reacción es muy compleja, la misma puede considerarse, en cierta forma, como una descomposición de azúcares catalizada por aminoácidos, aunque estos últimos se degradan en la misma. Por otra parte, hay otros componentes que pueden participar como son las bases nitrogenadas (Ej. tiamina y etanolamina) y compuestos carbonílicos provenientes de la oxidación de los lípidos (Suyama y Adachi, 1979; Doyon y Smyrl, 1983).

Factores que afectan su desarrollo

♦ Composición del sistema: Las aldopentosas son más reactivas que las aldohexosas, en tanto que estas últimas son más reactivas que los disacáridos reductores (Spark, 1969). Los disacáridos no reductores como la sacarosa deben primero hidrolizarse para poder participar en la reacción. Tal es el caso de sistemas proteína-sacarosa, en los cuales se produce pardeamiento cuando existen condiciones que favorecen la hidrólisis (alta humedad y bajo pH) (Hurrell y Carpenter, 1977). La L-lisina en los sistemas estudiados ha resultado ser el más reactivo de los aminoácidos comúnmente presentes en los alimentos. El grupo amino situado en la posición ϵ resulta ser más reactivo que el ubicado en la posición α (Dworschak, 1980).

♦ Humedad: El agua proporciona un medio para que la reacción se lleve a cabo, y es al mismo tiempo un producto de la misma. En un alimento sólido, deshidratado y a muy bajo contenido acuoso, los reactivos interaccionan difícilmente entre ellos, y aunque la reacción se lleva a cabo, la misma ocurre en forma muy lenta. En la medida que aumenta la humedad y por consiguiente la a_w del sistema se produce en forma simultánea un descenso en la viscosidad de la fase acuosa y una disolución de los reactivos en esa fase, esto se traduce en un incremento sostenido de la velocidad de reacción al aumentar el contenido de humedad.

Eventualmente, la fase acuosa se satura y un aumento del contenido acuoso no altera la concentración de los reactivos sino hasta el momento en que cesa la disponibilidad de los mismos para disolverse, a partir de este punto un aumento del contenido acuoso, sólo provoca una dilución del sistema. Este último efecto, sumado al hecho que el agua es un producto de la reacción, por lo que tiene un efecto inhibitorio sobre la velocidad, hace que se observe un máximo en la velocidad de la reacción que suele ubicarse en el rango de a_w , comprendido de 0,6 a 0,8 coincidiendo con la a_w de los alimentos de humedad intermedia (Labuza y Saltmarch, 1981). La dependencia de la velocidad de pardeamiento no enzimático en función de la a_w , puede observarse en la Figura 5.

Métodos de medición del pardeamiento no enzimático

Una de las consecuencias resultantes de la complejidad de las reacciones de pardeamiento no enzimático y de la multiplicidad de sus efectos sobre los productos alimenticios es la diversidad de medios empleados para su estudio. Entre los métodos utilizados podemos mencionar

la determinación del grado de avance el pardeamiento no enzimático a través de la medida de la liberación. de CO₂ (Cole, 1967), descenso del pH (Resnik y col., 1981), formación y descomposición de compuestos de Amadori (Lee y col., 1984), evolución de acción antioxidante (Park y Kim, 1983) y disminución de la concentración de azúcares (Cerrutti y col., 1985).

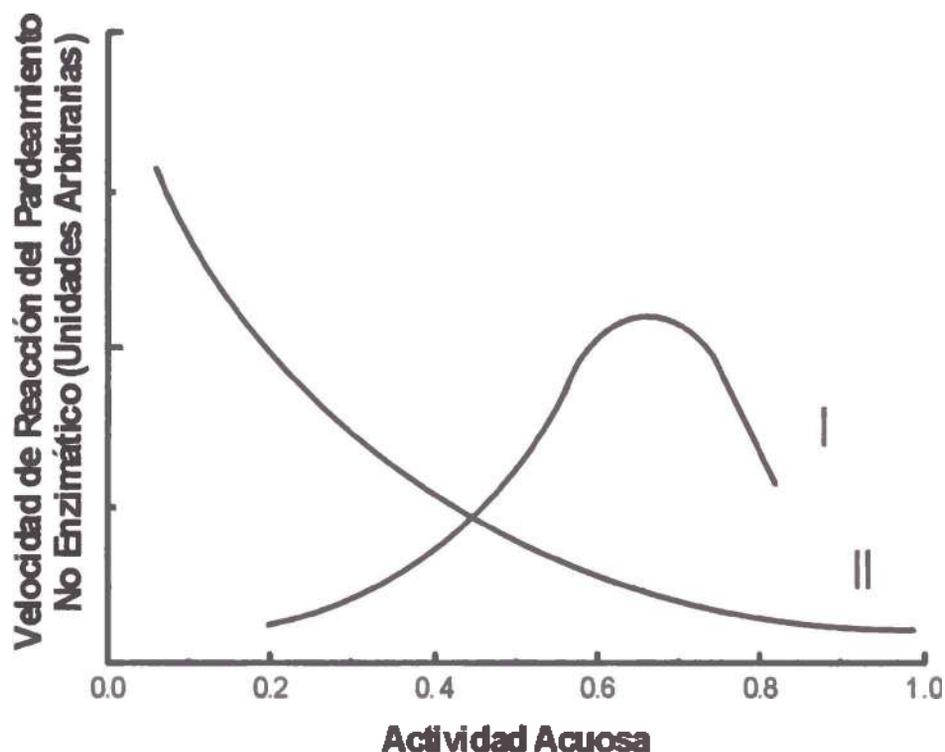


Figura 5: La curva I corresponde a alimentos y sistemas sólidos (Labuza y Saltmarch, 1981), en tanto que la curva II lo corresponde a alimentos y sistemas líquidos (Loncin y col., 1965).

Los aminoácidos se destruyen en la reacción de Maillard, por lo tanto la pérdida de nitrógeno amídico y la disminución de su concentración fueron muy utilizadas para seguir esta descomposición (Ellis, 1959). Actualmente se prefiere determinar la disponibilidad de aminoácidos esenciales, en especial lisina, en forma química o biológica, y conocer así la pérdida de valor nutritivo experimentado por el alimento (Mauron, 1981).

Otro enfoque, más reciente, propone la medición de ciertos compuestos formados durante la reacción como indicativos de los cambios sufridos por el alimento. Estos compuestos deben ser de fácil análisis y relativamente estables una vez formados. Luego su concentración puede correlacionarse con el deterioro experimentado por el alimento, y por consiguiente su calidad, un

ejemplo de esto es el nivel de 5-hidroximetilfurfural (HMF) usado en el deshidratado de manzanas, el cual se correlaciona bien con densidad, desintegración, color y rehidratación, pudiendo ser usado para predecir las condiciones de operación óptimas (Sullivan, 1981).

♦ **Modificaciones del espectro visible:** Los métodos espectrofotométricos han sido extensamente empleados. Así mientras que los cambios en el espectro visible son representativos de la formación de pigmentos, aquellos en la región UV se corresponden con la formación de furfurales y otros compuestos carbonílicos capaces de absorber en dicha zona. Los pigmentos pardos producidos por las reacciones de pardeamiento se caracterizan por absorber radiación electromagnética en la zona del visible del espectro, sin presentar máximos ni mínimos característicos, sino un gradual aumento de la absorbancia a medida que disminuye la longitud de onda (Clark y Tannenbaum, 1970). Los métodos más usados para estudiar la coloración resultante de las reacciones de pardeamiento no enzimático han sido el aislamiento de los pigmentos y su posterior análisis colorimétrico.

Los métodos habitualmente utilizados en la separación de los pigmentos constan de tres etapas principales (Meydav y col., 1977), y comienzan con una extracción de las sustancias coloreadas solubles en los alimentos sólidos, clarificación del extracto resultante (en los alimentos líquidos se hace la clarificación directamente) y una etapa final que comprende la colorimetría del extracto clarificado. Usualmente se trabaja entre 400-500 nm y en un rango de dilución que permita tener una respuesta lineal entre la absorbancia y la cantidad de pigmento de acuerdo a la ley de Beer (Maier y Schiller, 1959). Esta metodología implica considerar que los pigmentos formados en todo el transcurso de la reacción son similares (al menos en sus características espectrales), lo que no es necesariamente cierto ya que, en las reacciones de pardeamiento el pigmento se forma en múltiples reacciones de adición, eliminación y deshidratación, etapas que son altamente dependientes de las condiciones de reacción. Otras fuentes de error pueden atribuirse a la complejidad misma del alimento, a la insuficiente extracción o extracción de otros pigmentos (siendo una técnica altamente dependiente de la metodología y solventes usados) y por el hecho que la absorbancia del extracto no proporciona una idea correcta del aspecto visual del alimento pardeado, como si lo es la medida del color.

De lo dicho se infiere que la simple medición de la absorbancia de un extracto a una única longitud de onda dista de ser una técnica perfecta, aunque aporta información a otros ensayos como la colorimetría directa del alimento pardeado, color que es frecuentemente producido no

solo por el pardeamiento, sino de la degradación de otros pigmentos eventualmente presentes como clorofila y carotenoides.

♦ **Modificaciones del espectro ultravioleta:** Así como los cambios en el espectro visible son representativos de la formación de pigmentos, aquellos en la región ultravioleta se corresponden con la formación de furfurales y otros compuestos carbonílicos capaces de absorber en dicha zona. Es característica la existencia de un máximo en el rango de 280-300 nm, tanto en alimentos (Haas y col., 1948; Clegg, 1964) como en sistemas modelo (Friedman y Kline, 1950). Aunque menos empleada que la medición en el visible la absorbancia a una longitud de onda dada en el rango del espectro ultravioleta ha sido considerado indicativa de la reacción de pardeamiento no enzimático en sistemas modelo de alimentos, por ejemplo manzana deshidratada (Resnik y Chirife, 1979), sacarosa liofilizada (Flink, 1983).

Los pigmentos y melanoidinas absorben en el ultravioleta sin rasgos notables (Clark y Tannenbaum, 1970; Feather y Nelson, 1984) atribuyéndose la existencia del máximo de absorbancia a la presencia de furfurales, en particular en sistemas que contienen hexosas, del 5-hidroximetilfurfural (HMF) (Wolfrom y col., 1948; Hodge, 1953; Hodge y Osman, 1976; Resnik y Chirife, 1979; Feather y Nelson, 1984). El espectro de absorción ultravioleta del HMF en solución acuosa posee un máximo a 285 nm con coeficiente de extinción molar $\epsilon = 16500$ y un segundo máximo de menor importancia, a 228 nm, $\epsilon = 3620$, situándose el mínimo de absorbancia a 245 nm (Wolfrom y col., 1948).

1.8 Transición vítrea

En la Figura 6 se esquematizan las formas de obtención de un sólido amorfo. En la solución inicial, las moléculas de agua (solvente) y las de soluto (por ejemplo un azúcar) coexisten en un estado desordenado al azar. Dependiendo de la velocidad de remoción del agua, podrá formarse un sólido amorfo o uno cristalino. Un sólido amorfo, dependiendo de la temperatura y de su contenido de agua, puede encontrarse en estado vítreo o en estado gomoso. (White y Cakebread, 1966; Levine y Slade, 1992; Roos y Karel 1992).



Figura 6: Formación de un sólido amorfo o uno cristalino a partir de una solución (adaptado de Karmas, 1994).

El sólido cristalino se obtiene cuando la remoción del agua es lenta, dando a las moléculas de soluto el tiempo necesario para que puedan ordenarse en una estructura cristalina, en la cual prevalece la interacción con otras moléculas de soluto. El cristal resultante se encuentra en un estado termodinámicamente estable, caracterizado por una movilidad molecular relativamente baja y muy poco espacio entre las moléculas. Por otra parte los sólidos amorfos se obtienen cuando las moléculas del soluto son inmovilizadas mediante un rápido congelamiento o una rápida deshidratación como sucede en el proceso de liofilización o de secado por spray. Como consecuencia de estos procedimientos, el sistema experimenta un rápido incremento de la viscosidad y por ende una importante disminución en la movilidad molecular. Las moléculas de soluto no pueden alcanzar configuraciones de equilibrio y por lo tanto no pueden organizarse para

formar un cristal, sino que permanecen en forma desordenada o amorfa. En el secado convencional de sistemas heterogéneos (tejidos multicomponentes), gran parte del material permanece amorfo, por impedimentos en la movilidad de las sustancias cristalizables.

Determinación de la Tg

La temperatura de transición vítrea (Tg) puede ser detectada y estudiada por distintos métodos, uno de ellos es la dilatometría, que aprovecha el hecho de que el volumen específico cambia con la temperatura. La pendiente del cambio del volumen específico en función de la temperatura es el coeficiente de expansión térmica, coeficiente que cambia abruptamente a la temperatura de transición vítrea. Las relaciones entre la viscosidad y la temperatura también han sido utilizadas para identificar la transición vítrea (normalmente la viscosidad decrece con la temperatura), pero este cambio se hace drástico en las cercanías de la Tg. Otros métodos que detectan la Tg se basan en los cambios en las propiedades mecánicas, dieléctricas, térmicas en la vecindad de la transición vítrea, o detectan aspectos relacionados con la movilidad molecular y la difusividad. Algunos métodos utilizados en el estudio de alimentos basados en los cambios en las propiedades térmicas y mecánicas son la calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis termomecánico (TMA), espectroscopia mecánica y reología dinámica. El método de calorimetría diferencial de barrido es el más utilizado, y es capaz de detectar la transición vítrea sobre la base del cambio en el calor específico, siendo el calor específico una de las propiedades que cambian en las cercanías de la transición vítrea.

Para el caso de dos fases que tengan la misma energía de Gibbs y se encuentren a la misma temperatura como un sólido y un líquido o un líquido y una fase gaseosa tendrán diferentes entalpías y por lo tanto diferentes entropías, más aún se puede demostrar que dos fases que tienen diferentes entalpías tendrán diferentes volúmenes. En este principio es que se basan las técnicas comúnmente usadas para determinar este tipo de transiciones como los estudios por DSC o dilatometría que mide cambios en la entalpía o el volumen específico respectivamente.

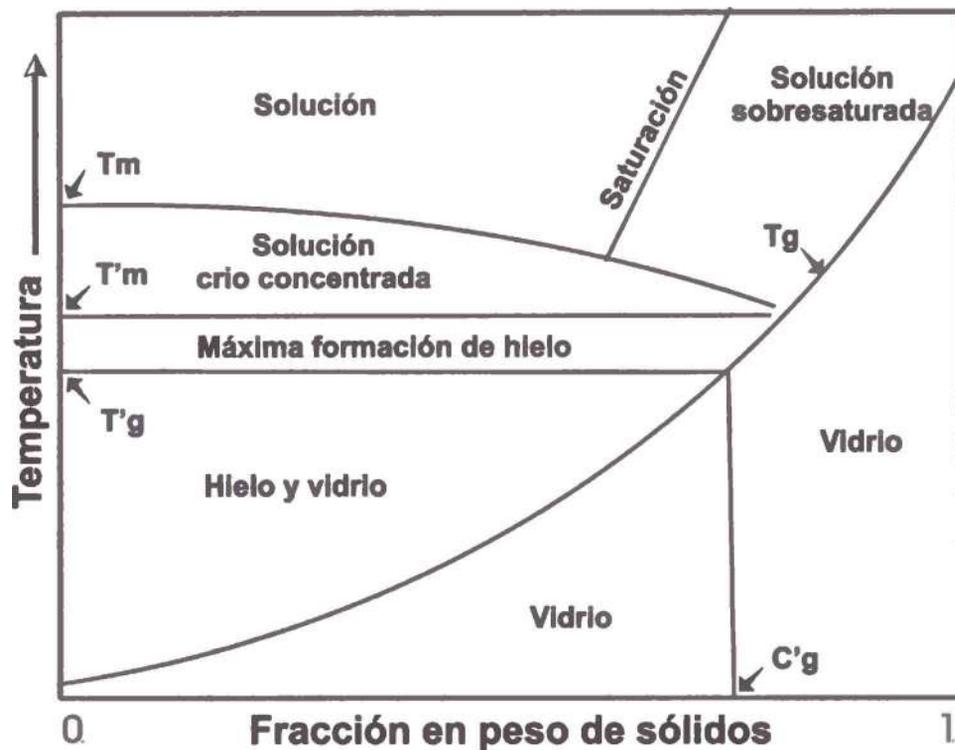


Figura 7: Diagrama de estado, adaptado de Roos, 1995; en este esquema generalizado de fases, la composición (expresadas en fracciones en peso) de un sólido se representa en función de la temperatura. Los valores de fracción en peso varían desde cero (agua pura) hasta uno (sólido puro anhidro).

Las transiciones de 1^{er} orden son las que se verifican en los cambios de estado sólido-líquido; líquido-vapor y sólido-vapor. En estas transiciones como la energía de Gibbs para ambas fases a la temperatura de transición es la misma, la derivada primera representa un cambio en la entalpía, entropía o volumen específico lo que se observa como un escalón o salto. Por otra parte la 2^{da} derivada de la energía de Gibbs que representa la capacidad calorífica adopta un valor de infinito a estas temperaturas de transición de 1^{er} orden. Las transiciones de 2^{do} orden (según la clasificación de Ehrenfest, 1933) son aquellas en las cuales la 2^{da} derivada del potencial químico o energía de Gibbs muestra un salto o discontinuidad. En este tipo de transiciones a diferencia de las anteriores la entalpía, entropía y volumen específico para ambas fases es el mismo, por lo tanto no hay un calor latente de cambio de fase pero sí una discontinuidad o salto en capacidad

calorífica, que es lo que puede observarse en un diagrama de DSC cuando la muestra esta en condiciones de muy baja humedad.

En la Figura 7 la curva que representa los valores de Tg (indicada como Tg en la figura) se incrementan en la medida que disminuye el contenido de agua. Por lo tanto en todo el rango de posibles fracciones de sólidos tendremos estado vítreo cuando nos encontremos por debajo de esta curva. A su vez, los diferentes equilibrios representados por los puntos comprendidos dentro del área ubicada debajo de la curva de Tg puede subdividirse en dos regiones limitadas por el valor C'g. De esta manera si el sistema se ubica a la derecha de C'g presentará un estado vítreo con presencia de agua no congelable (por el alto contenido de sólidos presentes), mientras que si se encuentra a la izquierda de C'g el agua si podrá congelarse. En el caso del suero de soja liofilizado, el mismo estará ubicado a la derecha de C'g, y muy cercano al valor unitario, debido a que casi no hay agua por los procesos de liofilización y conservación en P₂O₅ es decir en un estado vítreo pero con presencia de cantidades variables de agua que no congela.

El valor de C'g se puede obtener por diferencia entre el agua total y la cantidad de hielo contenidos en la muestra, en tanto la cantidad de agua no congelada puede ser estimada determinando el calor latente de fusión del hielo en muestras con diferentes contenidos de agua, de esta forma se grafica el cociente entre el calor latente de fusión del hielo y el peso de sólido en la muestra en función de contenido inicial de agua, lo que da una recta y se extrapola a valores de calor latente cero, lo que estima la cantidad de agua no congelada (Simatos y col., 1975; Blond, 1989; Roos, 1992-a). Otros estudios realizados (Ablett y col., 1992) muestran que el verdadero valor de C'g puede ser obtenido por DSC solo cuando la temperatura depende del calor latente o se considera la fusión junto con una adecuada corrección usando la capacidad calorífica de las muestras. Sin embargo los valores más exactos hasta el momento provienen de los diagramas de estados realizados a partir de valores de Tg experimentales para soluciones de diferentes concentraciones (Roos y Karel, 1991-a).

Se halló que las soluciones máximamente concentradas por congelación son matrices que rondan el 80% (p/p) para la mayoría de los componentes alimenticios (Ablett y col., 1992; Roos, 1993). Un esquema típico (obtenido por DSC) es el que se muestra en la Figura 8 de un azúcar liofilizado que muestra sus transiciones de fase y cambios de estado (Ross, 1992-b).

En estos ensayos la muestra se calienta a una velocidad constante en una cápsula sellada, y generalmente se utiliza una cápsula vacía como referencia, en estas condiciones se monitorea el

flujo diferencial de calor durante el calentamiento de la muestra y de la referencia. El cambio en el calor específico del sólido que ocurre a la temperatura de transición vítrea de la muestra, se evidencia como un cambio en la línea de base del termograma desde una temperatura inicial menor que T_g hasta temperaturas mayores. A temperaturas más altas que T_g , el azúcar se transforma en un material “gomoso” mismo que puede considerarse como un líquido sobreenfriado. A medida que la temperatura y la movilidad aumentan, y la viscosidad disminuye, las moléculas de azúcar pueden reorientarse hasta alcanzar un estado termodinámicamente más estable como lo es, la estructura cristalina, proceso que se manifiesta como un pico exotérmico en el termograma. Al incrementar aún más la temperatura, el azúcar funde produciendo un pico endotérmico; un termograma como el descrito, demuestra el efecto de la temperatura sobre el estado físico de un alimento liofilizado que contiene azúcares.

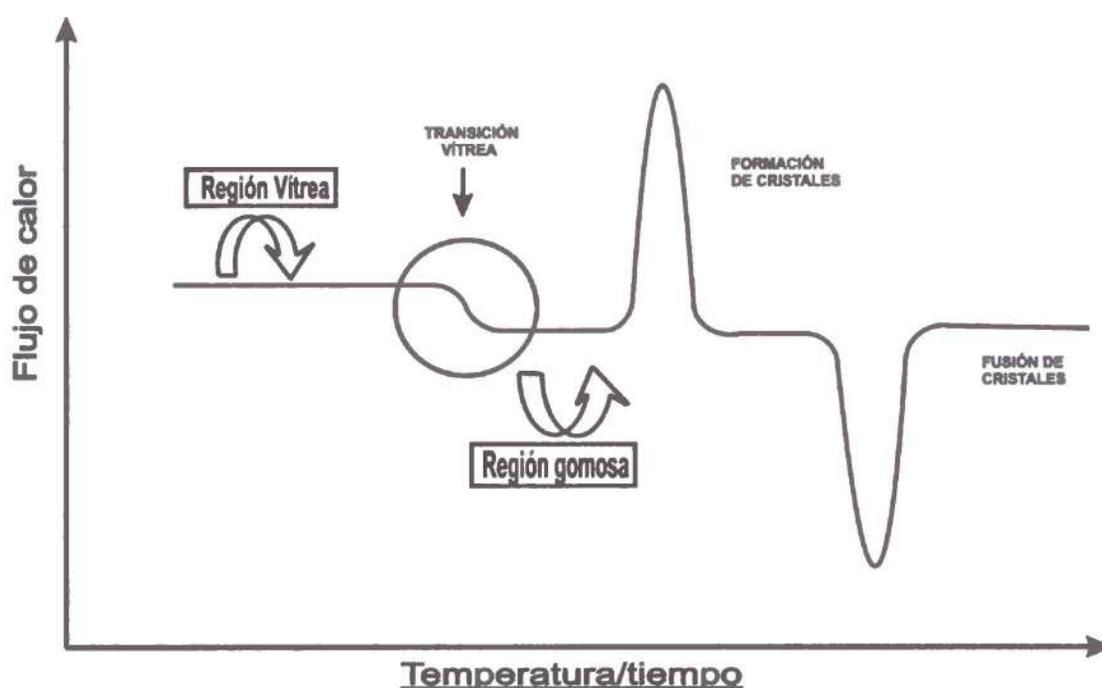


Figura 8: Termograma típico de un azúcar liofilizado (Adaptado de Roos, 1992-b).

Factores que afectan la Tg

♦ **Plastificación:** La movilidad de un sistema puede ser afectada por la adición de un agente plastificante. Un agente plastificante es una sustancia que al ser agregada a un material, aumenta su flexibilidad y extensibilidad. Para que un compuesto sea plastificante debe ser compatible y miscible con el material al que se incorpora. En los sistemas biológicos el plastificante más importante es el agua. El agregado de un plastificante produce un aumento en el volumen libre, y por lo tanto, tiene el efecto de reducir la Tg del sistema y de incrementar la posibilidad de que este cristalice. Otros plastificantes son moléculas de baja masa molecular como los azúcares, polialcoholes y aminoácidos

♦ **Masa molecular:** Flox y Flory (1950) al trabajar con poliestireno de distintas masas moleculares, observaron que el valor de la Tg aumentaba rápidamente al aumentar la masa molecular, obteniendo una relación lineal al graficar Tg en función de la inversa de la masa molecular. Roos y Karel (1991-b), determinaron las temperaturas de transición vítrea de maltosa y de una variedad de maltodextrinas en un rango amplio de valores de a_w . Observaron que al aumentar la humedad relativa, las temperaturas de transición vítrea de estos sistemas disminuyeron, ya que el aumento de la humedad plastificó los sistemas; también se observó un aumento en la Tg al aumentar la masa molecular para una dada humedad relativa, y pudieron relacionar las temperaturas de transición vítrea con la masa molecular.

Ross (1993) analizó el comportamiento de distintos azúcares (pentosas, hexosas y disacáridos) con respecto a la Tg, y observó la misma tendencia general, las pentosas tuvieron menor Tg que las hexosas, que a su vez tuvieron menor Tg que los disacáridos. De esta manera la Tg aumenta con el agregado de polímeros (almidón, celulosa, y macromoléculas como proteínas).

♦ **Transición vítrea de mezclas:** La ecuación 1 (Gordon y Taylor, 1952) es otra relación útil para predecir la Tg de un sistema. Esta ecuación relaciona la Tg de mezclas de polímeros con la fracción en peso y la Tg de los componentes individuales, la misma se aplica a sistemas modelo formados por mezclas anhidras de dos componentes distintos y también a sistemas que contienen un componente sólido y diferente contenido de agua. En general, la ecuación se cumplió y sirvió para calcular la Tg resultante de mezclas de polímeros con diluyentes.

$$Tg_{mezcla} = \frac{w_1 Tg_1 + w_2 Tg_2}{w_1 + kw_2} \quad (1)$$

Donde = Tg_{mezcla} = Tg observado para una mezcla binaria.

w_1 y w_2 = Fracción de concentración de componentes puros.

Tg_1 y Tg_2 = Tg de los componentes puros.

k = constante.

Roos y Karel (1991-b) determinaron las Tgs de mezclas de maltodextrinas y sacarosa; las muestras utilizadas estaban formadas por maltodextrinas de distintas masas moleculares y sacarosa en distintas concentraciones. La adición de hidratos de carbono inertes de alta masa molecular a alimentos o componentes de los mismos, se puede usar para alterar la Tg y retrasar los cambios físicos, de esta manera los sistemas que son susceptibles a cambios tales como cristalización, colapso y pegajosidad, ya sea durante el procesamiento o el almacenamiento, pueden ser estabilizados por la adición de sustancias de alta masa molecular en la formulación del producto. Se vio que los alimentos que contienen grandes cantidades de azúcares, retienen su calidad en un amplio rango de temperaturas y humedades, cuando se les adicionan macromoléculas. En numerosos productos se logró retrasar la cristalización de azúcares (Berlin y col., 1973; Iglesias y Chirife, 1978) y el colapso del sistema (Tsourouflis y col., 1976; Gerschenson y col., 1981).

1.9 Liofilización

El objetivo primario de la liofilización es la preservación de materiales biológicos, sin deteriorarlos, por medio de la congelación del agua contenida en estos, seguida de la posterior sublimación del hielo. Por tanto esta técnica combina las ventajas de la congelación y la desecación a fin de obtener un estado de preservación más propicio. Para ello se vuelve necesario hallar formas y métodos que confieran al material una estructura sólida que no permita la permanencia de fluidos concentrados intersticiales, de manera que la estructura se mantenga

sólida durante el proceso completo, permitiendo que la deshidratación se realice desde el estado sólido evitándose que el hielo funda antes de sublimarse.

Los pasos que deben seguirse para un proceso de liofilización involucran una congelación por medio de enfriamiento a baja temperatura., una deshidratación por sublimación directa del solvente congelado, generalmente a presiones subatmosféricas, y una etapa final de almacenamiento en estado deshidratado en condiciones controladas, en general las condiciones involucran el uso de recipientes herméticos (de baja o nula permeabilidad a los gases), pudiéndose emplear atmósfera inerte, libres de oxígeno y vapor de agua.

Congelación

La correcta congelación es indispensable para poder liofilizar adecuadamente un determinado material, esto es así porque, cualquier cambio de fase en un material complejo afecta su estructura y puede inducir alteraciones severas si no se realiza adecuadamente. Se considera que esta etapa es crítica pues el material deshidratado nunca será mejor que el congelado, de modo que un congelado inadecuado irá en detrimento del producto liofilizado. Los parámetros más importantes a considerar son:

- *Temperatura mínima de fusión incipiente.
- *Temperatura máxima de solidificación completa.
- *Velocidad de congelación óptima.
- *Conocer si existen equilibrios inestables o meta estables que deberán ser eliminados por medio de tratamientos térmicos adecuados.

Se sabe que en los alimentos aún a temperaturas tan bajas como -30°C parte del agua queda sin congelarse, y que el proceso de congelación es complejo y sus características dependen tanto de la rapidez de la congelación como de las características del material a congelar. Los contenidos de agua son diferentes según el alimento del que se trate; a su vez la forma en que el agua se congela aún en alimentos con idénticas cantidades de agua depende de las características particulares que presenta cada alimento como a_w y compartimentación entre otros. Un listado de alimentos junto con sus contenidos de agua y su comportamiento durante la congelación puede verse en la Tabla 8; podemos decir que en general los procesos de congelación lentos conducen a la formación de cristales grandes y viceversa, sin embargo el tamaño del cristal también depende del tiempo así como las de condiciones de almacenamiento posteriores al congelado.

Tabla 8: En esta tabla se detallan para una serie de alimentos frescos las cantidades de agua presentes en los mismos expresadas en forma porcentual; de igual forma se indican los porcentajes de agua que congelan, así como las cantidades de agua que no congelan para diferentes temperaturas.

Alimento	% total de agua	% de agua congelada respecto del agua congelable a distintas T(°C)					Agua no congelable kg/kg de sólidos
		-5	-10	-15	-20	-30	
Carne magra	74,0	83	93	97	99	100	0,35
Pescado	83,5	87	94	97	98	100	0,39
Huevo integral	74,0	90	95	98	99	100	0,20
Yema de huevo	50,0	89	94	97	98	100	0,40
Clara de huevo	86,5	93	96	98	99	100	0,40
Jugo de frutas	88,0	75	87	93	96	100	0,20
Pan blanco	46,0	50	87	97	99	100	0,30
Arvejas	78,0	68	86	92	96	100	0,20-0,30
Porotos	89,0	84	92	96	98	100	0,20-0,30
Espinaca	93,0	95	97	98	99	100	0,20

En vista que la estructura de la masa congelada dependerá tanto de la manera en que el material ha sido enfriado como de la temperatura que ha alcanzado, los ciclos de enfriamiento deben ajustarse "a medida" para cada caso individual. A menudo se requerirán de ciclos de congelación muy precisos, compuestos de una sucesión de periodos de enfriamiento y aumento de temperatura, llamados tratamientos térmicos a fines de obtener los cambios estructurales requeridos como:

- Ruptura de estructuras vítreas con cristalización de materiales meta estables.
- Tamaño de cristal adecuado dando un color, porosidad y separación de aceites y aromas adecuados.

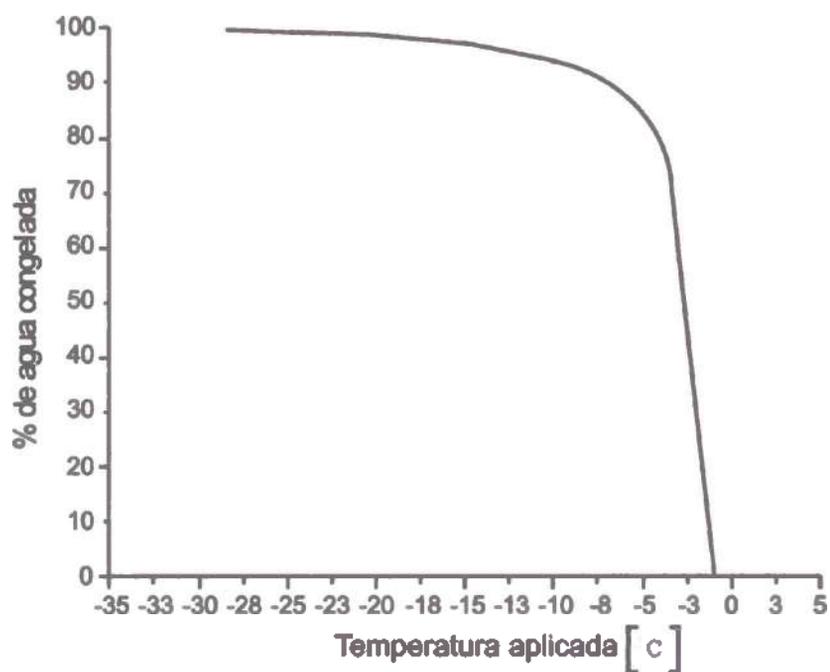


Figura 9: Representación gráfica del porcentaje de agua sin congelar con relación al agua “congelable” para diferentes temperaturas. Para este caso particular la muestra en cuestión es clara de huevo.

Sublimación del hielo

La liofilización se basa en la sublimación del hielo, el hielo tiene su presión de vapor, y los valores de presión de saturación sólido vapor del hielo (P_{sh}) son bastante bajos, por ejemplo a 0°C apenas supera los 4,5 mm de Hg. En consecuencia, tan baja presión de vapor sólo se consigue con aire con muy bajo contenido de humedad o en condiciones de vacío, siendo esta última la práctica más usual, pues la presión parcial del vapor del aire, depende directamente de la presión total, además en condiciones de vacío, se evita la oxidación de los lípidos presentes.

En la Figura 10 se muestra el gráfico más generalizado de presión en función de la temperatura para el agua, donde pueden verse las zonas y las transiciones de sólido-vapor (sublimación), sólido-líquido (fusión) y líquido-vapor (vaporización).

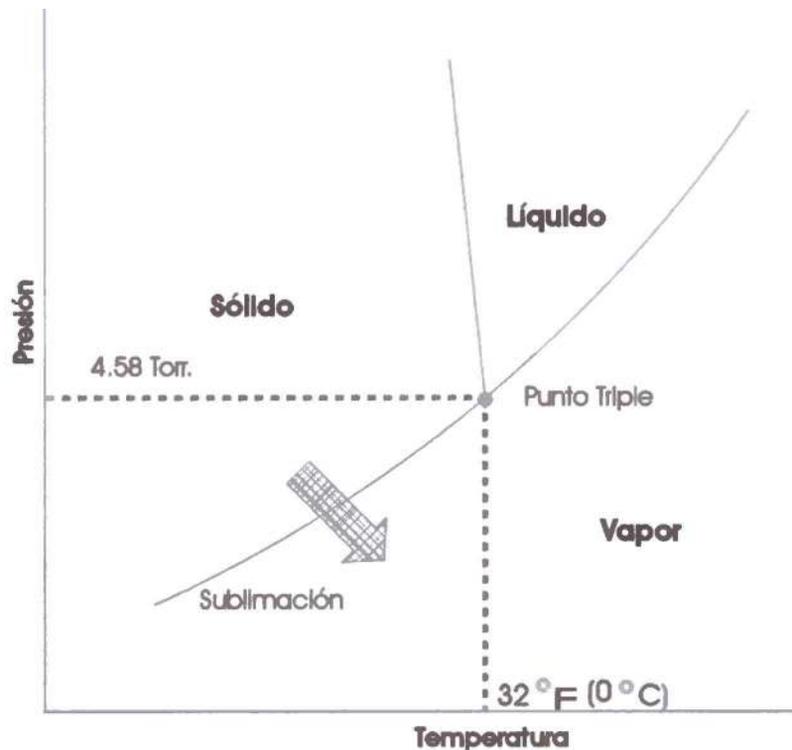


Figura 10: Diagrama de estado del agua pura con relación a la presión y temperatura, en ella puede verse las regiones en que están presentes los estados sólido, líquido y vapor. Para el caso del agua pura, el punto triple (condiciones en la que coexisten los tres estados en forma simultánea), se encuentra a 0°C y una presión de 4,58 Torr. En este gráfico puede verse que el pasaje directo del agua congelada al estado vapor o sublimación realizada en la liofilización se llevara a cabo en condiciones que estén por debajo de este punto.

De esta manera en la etapa de liofilización propiamente dicha el hielo es “destilado” por sublimación directa desde el estado sólido a presión reducida y sólo se requiere que la presión de saturación sólido-vapor (P_{sh}) del hielo sea mayor que la presión parcial del vapor en el aire P_{va} .

El pasaje del hielo presente en sólidos congelados al estado de vapor es un proceso fuertemente endotérmico, que demanda en consecuencia gran cantidad de energía, en el caso de agua pura los valores son:

- * Calor de Sublimación, L_s de 670 Kcal/kg.
- * Calor de Vaporización, L_w de 550 Kcal/kg.
- * Calor de Fusión, L_f de 80 Kcal/kg.

Esta energía puede llegar a través de la capa congelada, siendo el caso típico el de liofilizadores de bandejas en donde la transferencia del calor se verifica por conducción, existiendo la posibilidad de fusión del hielo intersticial o por radiación a través de la capa deshidratada en formación, en el caso de materiales granulados o particulados, existiendo la posibilidad de alterar térmicamente la estructura de la capa seca, fenómeno conocido como “scorching”. Por otra parte el suministro de energía se vuelve dificultoso en condiciones de presión reducida y durante la liofilización el “frente de deshidratación” no es una superficie estable sino que retrocede durante el proceso de sublimación.

Las temperaturas de sublimación pueden ser cercanas e incluso superiores a las de fusión incipiente, por tanto la deshidratación puede ocurrir no solamente por sublimación sino también por evaporación del agua no congelada ocluida en la estructura (recordar que no toda el agua de estructuras biológicas se congela); esta es extraída por difusión lenta a través de la “red” de sólidos que rodean a los cristales de hielo, y puede causar una forma de derrumbamiento o “colapso” de la estructura que se vuelve gomosa y pegajosa. Este fenómeno puede aumentar la densidad del producto, inducir la aparición de color oscuro en el producto terminado, y tener un importante efecto en la retención de aromas y agua adsorbida, un esquema de estos fenómenos de colapso se puede visualizar en el Figura 11.

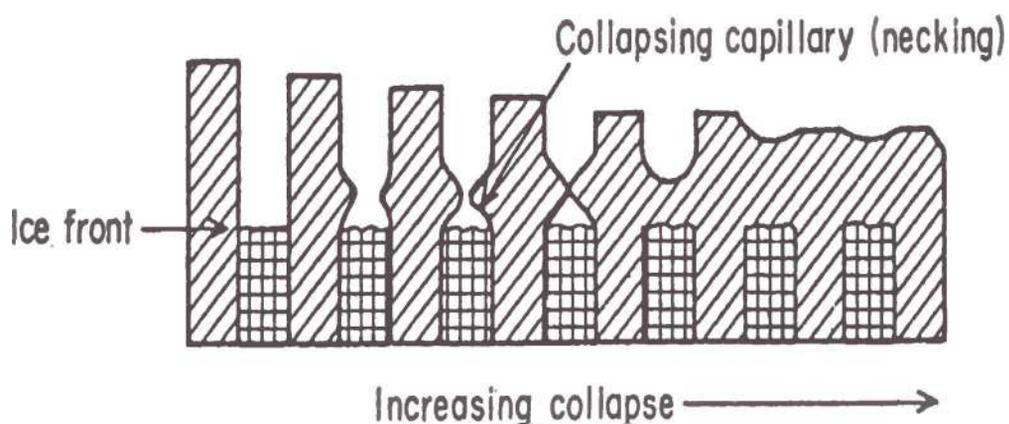


Figura 11: Durante la liofilización, el agua es retirada del material por sublimación del hielo a presión reducida desde un “frente del hielo”. Esto ocasiona un retroceso en el frente de hielo el cual queda cada vez mas “hundido” en el material ya liofilizado. Bajo ciertas condiciones, puede ocurrir el colapso estructural; generalmente este proceso comienza con la formación de unos angostamientos o cuellos que limitan la sublimación, formados por migración de soluto, finalmente estos cuellos se unen generando el colapso estructural.

El colapso estructural durante la liofilización ocurre a temperaturas críticas en las cuales la viscosidad es suficiente para permitir el flujo de solutos amorfos concentrados durante la congelación (Bellows y King, 1973). Esto ocurre debido al descenso de la viscosidad en las cercanías del comienzo de la temperatura de fusión del hielo por encima de T_g (Levine y Slade, 1986, 1988; Pikal y Shah, 1990; Franks, 1990; Roos y Karel, 1991-a; Slade y Levine, 1991).

Como se desprende del posible fenómeno de colapso, la retención del agua adsorbida es el problema más difícil de resolver, siendo relativamente fácil sublimar el hielo, a diferencia de la desorción del agua no congelable, siendo éste el verdadero “cuello de botella” de la liofilización. Debido a esto, una etapa de “secado secundario” mejora la eficiencia del proceso con tiempos largos a bajas presiones.

Estudios comparativos realizados en tejidos vegetales liofilizados a temperaturas menores y mayores a T_g mostraron grandes diferencias en la porosidad obtenida según las condiciones empleadas (Karel y col., 1993). Los valores estimados para T_g para muestras de manzanas, apio y papa fue de -46°C . Los resultados mostraron que la fusión del hielo durante el secado a presión más alta tiene un efecto plastificante tanto en la matriz no congelada (concentrada durante la congelación) como en los sólidos deshidratados, lo que resulta en una pérdida parcial de estructura.

Entre los efectos benéficos de la liofilización está la retención de componentes volátiles en comparación con la cantidad de agua retirada del sistema. El coeficiente de difusión de los componentes volátiles, para el caso de las maltodextrinas depende tanto del contenido de agua como al tamaño del componente que difunde (Menting y col., 1970). Los mismos investigadores estudiaron la retención de componentes volátiles en alimentos líquidos.

Los resultados sugieren que cuando el contenido de agua es elevado, la pérdida de componentes volátiles está definido por su volatilidad, en tanto que cuando el contenido de agua es bajo es el coeficiente de difusión el que gobierna el proceso.

Almacenamiento en estado deshidratado en condiciones controladas.

Dada la estructura porosa de los materiales liofilizados, estos presentan una alta superficie específica, que permite una rápida adsorción del vapor, por lo que los materiales liofilizados

resultan altamente higroscópicos debiendo el envase evitar el paso del vapor. Los recipientes metálicos, de vidrio o aquellos protegidos con láminas de aluminio cubiertas por una película plástica ofrecen soluciones para resolver este problema.

El oxígeno es posiblemente más activo que el vapor de agua, especialmente a humedades residuales bajas del producto, ya que en este tipo de matrices el oxígeno difunde fácilmente y alcanza sitios activos libres donde puede causar la formación de radicales peróxido, lo cual puede reducir la vida útil del producto. Se inician de esta forma lentos procesos de alteración que conducen a la formación de aromas rancios y extraños, coloración por oxidación de polifenoles, pérdida de actividad biológica si la hubiere y deterioro de propiedades físicas tales como solubilidad.

Cabe aclarar que no todos los productos son sensibles a la acción del oxígeno, pudiendo ser almacenados por un tiempo prolongado en atmósfera de aire seco, en general estos son los productos libres de lípidos o con baja proporción de estos. También debe considerarse el efecto de la luz particularmente en productos pigmentados, ya que se blanquearían rápidamente en condiciones diurnas. Los carotenoides, clorofilas y otros pigmentos se convierten en leuco-derivados, deteriorando seriamente la calidad del producto.

***HIPÓTESIS DE TRABAJO**

***OBJETIVOS**

***METODOLOGÍA**

HIPÓTESIS DE TRABAJO

1)-El suero de soja es un subproducto generado en grandes cantidades como resultado de varios procesos industriales como la producción de aislados en forma tradicional o la fabricación del tofu (queso de leche de soja). Estos sueros son potencialmente valiosos debido a la presencia de oligosacáridos, isoflavonas, proteínas, péptidos de elevado valor biológico y otras moléculas de interés.

2)-La presencia de factores antinutricionales (factores antitripticos, hemaglutinina) dificultan su utilización en forma directa en la industria alimenticia, mientras que las cantidades producidas durante estas operaciones junto a la carga orgánica representan un problema ambiental.

3)-Los volúmenes generados y el grado de dilución hacen del tratamiento térmico directo una operación económicamente poco atractiva. Una estrategia orientada al aprovechamiento de estos sueros, que disminuya el impacto ambiental y que inactive los factores nutricionalmente indeseables debe incluir una etapa de concentración/secado seguido de un tratamiento térmico.

4)-Estos procesos obedecen tanto a razones económicas como operativas; la primera se fundamenta en el alto costo energético (bombeo, calefacción etc.) que conlleva el tratamiento térmico de un producto diluido; las razones operativas se relacionan con las ventajas de trabajar con productos concentrados que simplifican los procesos de manipulación, transporte y almacenamiento.

5)-Hasta el momento se desconoce el comportamiento de este subproducto frente al secado o el tratamiento térmico. Como consecuencia de esta concentración se analizará el rendimiento y la existencia de cambios en la composición como una aproximación a los cambios que probablemente ocurrirán en un proceso de secado a escala industrial.

6)-Se espera que un tratamiento térmico aplicado sobre el suero de soja deshidratado provoque una parcial o total desnaturalización de los factores nutricionalmente indeseables presentes que impiden su aprovechamiento en forma directa. Asimismo se supone que, como consecuencia del estado deshidratado las temperaturas necesarias para lograr una inactivación adecuada de los factores antinutricionales deberá ser elevada.

7)-La existencia en forma simultánea de proteínas y oligosacáridos permite suponer que durante el tratamiento térmico pueden producirse reacciones de pardeamiento con formación de

glicoproteínas de interés funcional y la cristalización de oligosacáridos luego del enfriamiento. Se espera que el producto generado pueda ser utilizado en la industria, aprovechando este subproducto disminuyendo de esta forma el impacto ambiental

8)-A partir del suero de soja se obtendrán las proteínas utilizando métodos propios de laboratorio y otros del ámbito industrial comparándose los rendimientos y se realizará un almacenamiento del suero liofilizado en diferentes condiciones para determinar los cambios ocurridos según las condiciones de almacenamiento.

9)-El estudio de estos cambios permitirá conocer tanto la composición como las propiedades térmicas de este nuevo producto; brindando el marco necesario para proponer alternativas de uso y procesos para el aprovechamiento tecnológico del suero de soja.

OBJETIVO GENERAL:

Desarrollo de suero de soja liofilizado inactivado como un producto de interés para la industria alimenticia en donde los factores nutricionalmente indeseables hayan sido inactivados, o modificados de modo que ya no representen un obstáculo para su utilización como un ingrediente en la formulación de alimentos.

Objetivos particulares:

*Contribuir al conocimiento del suero de soja con relación a su secado, composición y estabilidad térmica.

*Estudiar el comportamiento térmico (DSC) de suero de soja liofilizado.

*Evaluar la estabilidad del mismo en distintas condiciones con relación a su tendencia a la cristalización, desnaturalización y reacciones de glicosilación.

*Aislar las proteínas de suero de soja con el objeto de analizar su grado de desnaturalización y composición en función del tratamiento térmico del suero.

Metodología

a)-Obtención del suero de soja desde harina desgrasada; análisis del efecto del almacenamiento a 4°C.

b)-Obtención de las proteínas presentes en el suero de soja; análisis de ventajas y rendimientos.

c)-Secado por liofilización del suero de soja y almacenamiento a -80°C para estudiar los cambios producidos en el mismo.

d)-Estudio comparativo de la composición en macrocomponentes del suero líquido y del deshidratado.

e)-Identificación de las fracciones proteicas presentes en suero deshidratado por SDS-PAGE, cuantificación de la disminución de glúcidos debido al tratamiento térmico (glicosilación)

f)-Análisis por DSC del comportamiento térmico del suero deshidratado y en dispersiones acuosas con diferentes tiempos de almacenamiento identificando las principales transiciones y discutiendo el efecto de la presencia o ausencia de agua.

g)-Tratamiento térmico del suero liofilizado hasta diferentes temperaturas finales en condiciones controladas para analizar:

*Desnaturalización térmica de las diferentes fracciones proteicas previamente identificadas por SDS-PAGE con especial atención a las condiciones requeridas para la desnaturalización de los factores nutricionalmente indeseables.

*Determinación del grado de inactivación a través de medidas de actividad enzimática.

*Estudio del efecto del tratamiento térmico sobre la glicosilación; en dicho caso identificar las proteínas glicosiladas (ensayos SDS-PAGE revelados con coloración específica).

*Determinación del grado de avance del pardeamiento no enzimático luego de un dado tratamiento térmico detectando los productos típicamente generados por medio de espectros UV-Visible y cuantificando la disminución de azúcares libres por TLC.

*Obtención de las proteínas desde suero deshidratado con diferentes tratamientos térmicos para su estudio SDS-PAGE y DSC. Determinar el grado de glicosilación de las proteínas aisladas y correlacionar con el tratamiento térmico y la masa de proteína recuperada.

*Estudio de la microestructura y grados de cristalización de oligosacáridos por microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) de suero deshidratado con y sin tratamiento térmico hasta temperaturas claves previamente determinadas.

MATERIALES

Y

MÉTODOS

2.1 Obtención del suero de soja

El material de partida usado en este estudio fue harina de soja, desgrasada y desolventizada, no tratada térmicamente, preparada bajo condiciones controladas, provista por la firma Santista S.A., Brasil. La harina fue mezclada y agitada con ayuda de varilla de vidrio en agua destilada (empleando una relación agua: harina de 10: 1) y posteriormente con agitador magnético por espacio de 2 hs. a temperatura ambiente. Finalizada esta etapa se llevó el pH a 8,0 y manteniendo las condiciones de agitación y temperatura se mantuvo el pH en 8,0 con NaOH 0.5 N a fin de optimizar la extracción de las proteínas de la harina. Finalizada la extracción esta mezcla fue centrifugada a 8.000 rpm (rotor GSA, centrifuga refrigerada Sorvall RC 5B) durante 20 min. a 4°C.

El sobrenadante obtenido fue llevado a pH 4,5 usando HCl 1N y se dejó a 4°C por espacio de 24 hs, para optimizar la precipitación de las globulinas de reserva, las cuales fueron separadas por centrifugación (8.000 rpm, 20 min, 4°C). Las globulinas de reserva (7S y 11S) separadas en el precipitado no fueron usadas en este trabajo, en tanto que el sobrenadante obtenido es lo que se conoce como “*suero de soja*” (Sorgentini y Wagner, 1999).

2.2 Tratamiento y fraccionamiento del suero de soja obtenido

Partiendo de 700 g de harina desgrasada se obtuvieron aproximadamente 5200 ml de suero de soja. Esta cantidad fue dividida en dos alícuotas, una de 1600 ml destinada a ser liofilizada para lo cual fue inmediatamente vertida en bandejas plásticas, hasta una altura de llenado de 5 mm aproximadamente, envuelta con película de poliestireno y posteriormente congelada a -20°C para ser luego liofilizada.

A los 3600 ml restantes se les agregó azida sódica (concentración final 0,02%) y se almacenó en cámara de 4°C, durante 1 semana para asegurarse la precipitación adicional de globulinas de reserva. Luego de este período se llevó el pH a 8,0 usando NaOH 2M y agitador magnético y se dejó a temperatura ambiente por 2 horas, ajustándose nuevamente el pH a 8,0 con NaOH 0,5 N. Posteriormente se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C, recuperándose una pequeña fracción de proteína insoluble a pH 8,0, la cual fue liofilizada para su posterior análisis por SDS-PAGE.

A continuación el suero de soja a pH 8,0 se separó en tres fracciones de 1 litro cada una, las que fueron usadas para obtener proteínas de suero de soja de dos maneras diferentes: por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 90% y con acetona al 50% en frío. La fracción remanente de 600 ml aproximadamente se usó para diferentes ensayos entre ellos los de determinación de composición y extracto seco. Todas las fracciones de suero de soja se conservaron en botellas plásticas tapadas en cámara de 4°C.

2.2.1 Liofilización

La liofilización se llevó a cabo en un equipo HETO FD4 con una bomba de vacío *Rotary Vane Vacuum Pump RZ5*. A fin de mejorar los resultados, previo a la liofilización, las bandejas conteniendo el suero de soja congelado a -20°C fueron pasadas al freezer de -80°C donde permanecieron por un mínimo de 72 hs. Finalizada esta etapa la película de poliestireno fue reemplazada por una envoltura de papel de aluminio perforado a fin de permitir la sublimación del solvente y se tomó nota del peso de las mismas. El tiempo promedio de liofilización de cada bandeja fue de unas 30 hs. En los casos en que la operación se realizó en más de una etapa, la muestra fue retirada del equipo, cubierta inmediatamente con una nueva película de poliestireno para evitar su hidratación y colocada a -80°C , hasta continuar con el proceso. El fin del proceso se determinó cuando no había más diferencias entre las pesadas. Finalizada la liofilización, el suero de soja secado resultó una trama seca que se desprendía de las paredes de la bandeja plástica con relativa facilidad. Este producto liofilizado fue trasvasado a un “recipiente de molienda”, que consistía un frasco de vidrio opacado al paso de la luz con papel de aluminio con una tapa perforada que permitía en forma ajustada el paso de una varilla de vidrio usada para hacer la molienda del suero liofilizado, minimizando de esta forma el contacto del producto liofilizado con el ambiente, a fin de evitar su hidratación y deterioro.

Finalmente, el producto liofilizado y molido era pasado a un contenedor opaco con tapa a rosca y baja permeabilidad, el cual se envolvió con papel y película de poliestireno, para ser conservado en freezer de -80°C . Estos pasos se repitieron hasta completar la liofilización de los 1600 ml de suero de soja. De esta forma la totalidad del suero de soja molido se conservó en frasco herméticamente sellado colocado en freezer de -80°C .

2.2.2 Cinética de hidratación

Desde el comienzo se notó que el liofilizado era altamente higroscópico. Para cuantificar cuan rápida era la hidratación del mismo y optimizar las condiciones de almacenamiento y manipulación en condiciones de temperatura ambiente, se realizó una cinética de hidratación a una humedad relativa del 75%, por representar las condiciones ambientales usualmente halladas en el laboratorio.

Se conoce por bibliografía (Rockland y Nishi, 1980) que el NaCl en soluciones saturadas establece en un ambiente cerrado un equilibrio con una humedad relativa (HRE) de 75,5% si la temperatura se encuentra entre 15 y 25°C. En el ensayo se usó un desecador en el que se colocaron 400 g de NaCl con agua destilada suficiente para cubrirla y lograr una solución saturada de sal, las juntas de unión del mismo fueron selladas con "Parafilm" y se lo dejó por 24 hs. para que se establezca el equilibrio antes de introducir las muestras del suero de soja liofilizado, el cual se encontraba conservado en condiciones anhidras (P_2O_5). La cantidad de liofilizado finalmente empleado en el ensayo dependió tanto de los datos preliminares con que se contaba (el suero de soja liofilizado tomaba aproximadamente un 10% de su peso en agua en los primeros 30 min), información obtenida simplemente por pesadas sucesivas a diferentes tiempos cuando el suero liofilizado se encontraba fuera del desecante), así como del uso de un diagrama psicrométrico.

Del análisis de este último se determinó que el aire a 20°C y con una HRE de 75%, es capaz de contener 11 g de vapor de agua/kg de aire seco. Si se conoce el volumen de aire contenido en el desecador (10,0 l), aproximando el aire como un gas ideal y el PM (peso molecular del aire) de 29 g/mol, entonces es posible calcular la masa de aire dentro del desecador (12,056 g); aire que puede contener 132,62 mg de agua. Para que las condiciones de equilibrio se mantengan la cantidad de muestra no debe alterar las condiciones impuestas por la sal saturada. Por ejemplo, se calculó para este sistema que, si de los 132,62 mg de agua que contiene el ambiente se ceden al liofilizado 9 mg de vapor de agua en forma instantánea, la humedad relativa caería al 70%, si la temperatura se mantiene en 20°C. Esta consideración vale al comienzo, ya que si se le da suficiente tiempo al sistema, esta cristalizará y se reestablecerá el equilibrio. Por lo dicho, las masas elegidas de liofilizado fueron lo suficientemente bajas para no variar la HRE establecida por el equilibrio con la sal, pero suficientes como para minimizar los errores relativos en las

pesadas; los resultados de esta experiencia se muestran en la Tabla 9 y están representados en la Figura 12.

Tabla 9: Datos correspondientes a la hidratación de una muestra de suero de soja liofilizada colocada en una atmósfera de humedad relativa del 75,5%.

Tiempo (hs)	Masa de Liofilizado (g)	Incremento en masa %	masa de agua tomada (mg)
0	0,01179	0	0
0,5	0,01286	9,08	1,07
1,15	0,01341	13,74	1,62
2,0	0,01424	20,78	2,45
2,5	0,01456	23,49	2,77
7,5	0,01582	34,18	4,03
31,2	0,01678	42,32	4,99
54,4	0,01685	42,92	5,06
75,1	0,01685	42,92	5,06

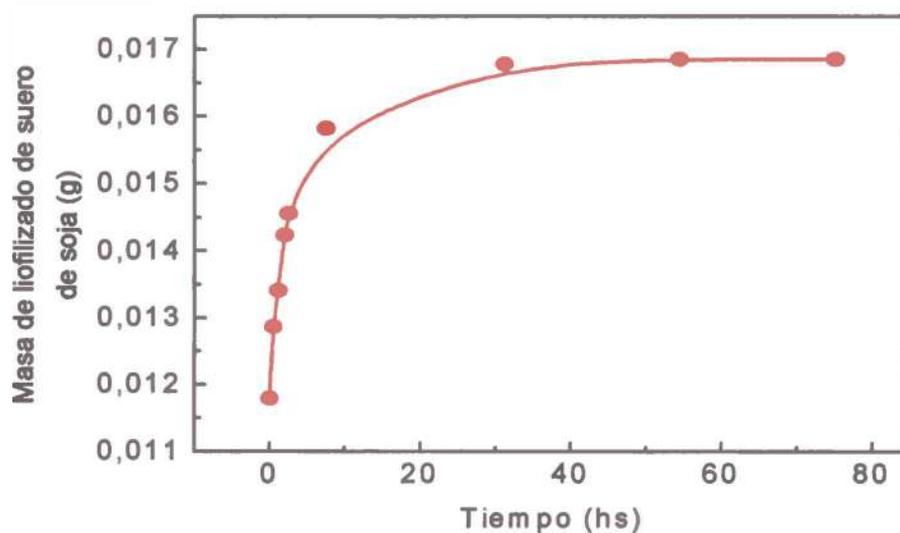


Figura 12: Representación gráfica del aumento de masa experimentado por el suero de soja liofilizado cuando se hidrata en una atmósfera con un humedad relativa (HRE) del 75%.

2.2.3 Manipulación del suero de soja liofilizado

En la medida en que se requería de muestra para los diferentes ensayos, esta era tomada del freezer de -80°C y colocada en un recipiente “a” de menor tamaño el que contaba dos clases de

tapas; una cerrada para la manipulación en el laboratorio y una segunda perforada, la que se colocaba justo antes de introducir el recipiente "a" en un recipiente "b" de mayor tamaño conteniendo P_2O_5 (pentóxido de fósforo), el cual es un desecante químico irreversible que se pone en equilibrio con una humedad relativa cero. Este recipiente "b" se lo cubría con papel de aluminio (protección contra la luz) y película de poliestireno (protección contra la humedad), lo cual aumenta la vida útil del P_2O_5 .

Durante el trabajo, se estudiarán los efectos del almacenaje a $-80^\circ C$, considerándose como día 1 el momento en que el suero terminó de ser liofilizado y se colocó a $-80^\circ C$. A fin de tener resultados comparables al analizar los cambios entre diferentes tiempos de almacenamiento a $-80^\circ C$ y partiendo de la suposición que el suero liofilizado almacenado en P_2O_5 a T_{amb} se deteriora mucho más rápido que a $-80^\circ C$, se adoptó la conducta de no utilizar muestra que haya estado a temperatura ambiente por más de 7 días. Esta conducta no fue seguida únicamente para los ensayos en lo que se estudió la variación en la T_g (temperatura de transición vítrea) con la deshidratación extra obtenida con el empleo de P_2O_5 como desecante el cual es capaz de retirar agua no eliminada en el proceso de liofilización. En estos ensayos el almacenamiento en P_2O_5 a T_{amb} se prolongó por más de 30 días.

2.2.4 Tratamiento térmico del suero de soja liofilizado

El liofilizado de suero de soja fue sometido a tratamientos térmicos (rampa de calentamiento de $5^\circ C/min.$) hasta las siguientes temperaturas 90, 120, 130, 140, 150, 180 y $210^\circ C$ siguiendo el procedimiento descrito en 2.7.3.

2.3 Obtención de las proteínas de suero de soja

2.3.1 Por precipitación con $(NH_4)_2SO_4$ al 90%

Se precipitó 1 litro de suero de soja usando $(NH_4)_2SO_4$ (marca Anedra, $PM=132,14$ g/mol) en concentración del 90% según el procedimiento de Iwabuchi y Yamauchi (1987). Estos autores hallaron que bajo estas condiciones las proteínas de suero de soja eran precipitadas en forma efectiva. Partiendo de la base que 100% de saturación con $(NH_4)_2SO_4$ equivale a agregar 70,6 g de la

sal a 100 ml de la solución a precipitar, en el ensayo se usó 635,4 g de la sal agregados en forma progresiva en un periodo de 30 min. a 1000 ml de suero de soja en condiciones de agitación. Se dejó luego la solución a temperatura ambiente por 2 hs. para favorecer la precipitación de las proteínas de suero; la separación se realizó mediante centrifugación (10.000 rpm, 20 min. a 4°C).

Posteriormente las proteínas fueron desaladas colocando los precipitados dentro de una membrana de diálisis (Sigma) WT 12000, previamente hidratada con agua destilada. La diálisis se realizó contra agua destilada con 0,02% de azida sódica, empleando un recipiente plástico de 4 l, a 4°C, usando agitación magnética, durante tres días. Los cambios del agua de diálisis se hicieron cada 8 hs aproximadamente enjuagándose en cada caso con agua destilada las paredes del recipiente y la bolsa de diálisis a fin de eliminar los restos de sales. Finalizado el proceso, se abrió la membrana para extraer las proteínas de suero de soja libre de sales, arrastrándose con agua destilada la proteína pegada a la membrana; este producto fue congelado y se siguió el protocolo para su posterior liofilización (ítem 2.2.1).

2.3.2 Por precipitación con acetona al 50%

Los lineamientos y cuidados tenidos en esta precipitación incluyen partir de un suero con una concentración de proteínas comprendida entre 5-50 mg/ml, realizar un enfriamiento previo al ensayo tanto del suero de soja como de la acetona a 0°C, trabajarse en todo momento en condiciones que permitan la eliminación del calor generado, ya que la adición del solvente orgánico con el correspondiente cambio en la constante dieléctrica es un fenómeno exotérmico y por lo tanto con posible acción desnaturalizante. La concentración de acetona empleada debe ser $\leq 50\%$ v/v y el agregado debe completarse en un lapso de 10-15 min, homogeneizando con cuidado la solución conteniendo las proteínas evitando en todo momento la formación de espuma e interfases que pudieran desnaturalizar las proteínas. El agregado de acetona se realiza agregando la misma por goteo sobre la solución conteniendo las proteínas buscadas. Siguiendo este protocolo no es necesario hacer una espera de toda la noche, ya que este proceso no conduce a una precipitación adicional en las proteínas buscadas. Sin embargo, el sobrenadante obtenido se conservó para ver los efectos del almacenamiento a 4°C. Se realizó un “ensayo previo” con 10 ml de suero de soja con el fin de estimar la cantidad de proteínas que se obtendrían luego al partir de 1 l de suero. El agregado de la acetona se realizó con pipeta automática y trabajando en baño

agua-hielo separándose el precipitado por centrifugación a 10.000 rpm por 15 min a 4°C, conservando el sobrenadante para ver los efectos de almacenamiento sobre este y liofilizándose el precipitado.

Para la precipitación de las proteínas contenidas en 1 litro de suero de soja se enfriaron 1,2 litros de acetona p.a. (ACS Baker) a temperatura de -20°C, mientras que el resto del material empleado en la precipitación, incluyendo una ampolla de decantación de 200 ml (desde donde se dejó gotear la acetona), se lo dejó en la cámara de 4°C por espacio de 24 hs. La precipitación se realizó dentro de la cámara de 4°C en fracciones de 160 ml de suero de soja en vaso de 500 ml en condiciones de agitación magnética, dejando gotear igual volumen de acetona desde la ampolla de decantación previamente ajustada de modo de completar el agregado en 15 min. Completado el proceso, la mezcla se pasó directamente a tubos de centrifuga de 500 ml de capacidad, los que se dejaron en la misma cámara hasta completar todas las fracciones. Al término de esto se los dejó por espacio de 60 min. adicionales en la cámara de 4°C para dar lugar a una mejor separación.

La centrifugación se hizo en las condiciones mencionadas en el “ensayo previo”, haciendo funcionar previamente la centrifuga a 4°C con el rotor a 500 rpm pero sin las muestras para minimizar los problemas de desnaturalización térmica. Finalizada la centrifugación, los sobrenadantes fueron inmediatamente separados de los precipitados para evitar su redisolución y almacenados a 4°C en botellas plásticas para evaluar el efecto del almacenamiento. Los tubos conteniendo los precipitados fueron dejados en heladera y sacados de a uno por vez, a fin de obtener los precipitados, empleando mezcla suero-acetona para lograr el arrastre; los precipitados fueron congelados y liofilizados.

Luego de 11 días de almacenamiento del sobrenadante, se observó la aparición de una opalescencia, por lo que se volvió a centrifugar, todo el volumen (casi 2 litros de mezcla suero-acetona), pero usando solo dos tubos de centrifuga de 500 ml. Finalizada esta operación se separaron los precipitados como se describió anteriormente y se siguieron los pasos para su posterior liofilización. Esta nueva fracción se la conservó por separado en tubo Eppendorf a -80°C, por presentar un aspecto diferente al obtenido primariamente.

2.4 Determinación del porcentaje de proteínas

2.4.1 Método de Kjeldahl

Este método que data de 1883, se basa en medida del nitrógeno total presente en una muestra, por lo que también mide el proveniente de otras fuentes como ácido nucleicos. El factor de conversión usado fue 6,25 a falta de mayor información.

Este método fue aplicado en dos formas: “tradicional” y usando un equipo BÜCHI. En el primer procedimiento se colocó la muestra, el ácido, el catalizador y las sales en balones Kjeldahl, haciendo la digestión calentando con mechero bajo campana, diluyendo con agua, alcalinizando con NaOH al 40% y destilando el NH₃ formado recogiendo sobre H₃BO₃ al 4% v/v y valorando con ácido por retorno. En este caso las masas usadas de suero de soja liofilizado estuvieron comprendidas entre 0,1-0,4 g correspondientes a porcentajes de proteínas entre el 10 al 40% p/p. Usando el Digestor BÜCHI 425 y la unidad destiladora BÜCHI 320 que realizan este proceso en forma semiautomática, se usaron cantidades de suero de soja del orden de 0,2 g y 5 ml para el suero liofilizado y no liofilizado respectivamente. En el 1er caso se recogió sobre 40 ml de H₃BO₃ al 4% v/v con 15gotas de indicador de Mortimer, en tanto que en el 2^{do} se lo hizo sobre 60 ml de HCl 0,0128 N con 400 µl del indicador. Todos los ensayos fueron hechos al menos por duplicado y se realizaron 3 blancos de reactivos.

2.4.2. Método de Lowry

Este método consta de dos etapas: en la primera, los iones Cu²⁺, en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos dando un color azul claro. Además se produce el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos de tirosina que participan en la segunda etapa de la reacción. En la segunda etapa, el cobre cataliza de la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu, por parte de los grupos fenólicos de los residuos de tirosina.. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los fenoles da lugar a un complejo de color azul intenso.

Fue utilizado para la determinación de proteína real; para ello se realizó la precipitación con ácido tricloroacético (TCA) de las proteínas de suero de soja como paso previo a la determinación de proteínas por el método de Lowry. Debido a que el liofilizado contiene en su

composición hidratos de carbono, algunos de ellos reductores, los que pueden ocasionar interferencia en la determinación de proteínas, es necesario la eliminación de los mismos. Además es necesario la cuantificación de la acidez incorporada junto con el TCA que permanece con el precipitado luego de su precipitación y posterior centrifugación, debido a que los resultados obtenidos por este método son muy dependientes del pH y la reacción debe realizarse en condiciones precisas de pH.

Para determinar esto último se hicieron dos ensayos previos; pesándose masas casi idénticas de suero de soja liofilizado, disolviéndolo en agua destilada (dilución 1:10) y agregándose una cantidad de TCA al 40% p/v necesaria para tener una concentración del 12% p/v en el volumen final a fin de precipitar las proteínas presentes. En el primero de estos ensayos se valoró con NaOH 0,1N usando fenoftaleína como indicador de modo de valorar todo el ácido presente, ya sea que esta provenga del TCA agregado o esté presente en el liofilizado de suero de soja. En el segundo ensayo se repite el mismo proceso separándose las proteínas precipitadas por centrifugación (15 min, 10.000 rpm, 20°C) y valorando el ácido que queda en el sobrenadante; la diferencia permite conocer la cantidad de ácido que queda retenido en el precipitado y por ende la cantidad de base a agregar para disolver el precipitado y alcanzar las condiciones requeridas por el método. La masa de liofilizado de suero de soja finalmente usada en la precipitación surge de considerar que a la muestra se le precipitarán las proteínas con TCA al 12% para su medida por Lowry y que su sobrenadante será usado para determinar glúcidos por los métodos de Dubois y Antrona.

La precipitación de las proteínas se realizó como se describió obteniéndose un sobrenadante (sobrenadante 1) y un precipitado al que se practicaron sucesivos lavados con solución acuosa de TCA al 12% p/p, para eliminar restos de azúcares separando por centrifugación cada vez (condiciones vistas) Estos sobrenadantes de lavado generados en cada operación se reúnen con el sobrenadante 1, se les midió el volumen y fueron usados para las medidas de glúcidos por métodos de Dubois y Antrona. La precipitación fue realizada varias veces, aumentándose la cantidad de lavados con TCA al 12% realizados para investigar su efecto sobre la reacción de Lowry, y a cada uno de los precipitados se les midió proteínas al menos por duplicado.

2.4.3. Método de Bradford

Este método se basa en el cambio diferencial de color de un colorante en respuesta a la concentración de proteínas. El colorante utilizado es el azul brillante Coomassie G250 en solución ácida, y tiene un máximo de absorbancia a 465 nm, este máximo cambia a 595 nm cuando se une a la proteína. Para la preparación del colorante se utilizó la siguiente proporción de reactivos: 25 mg Coomassie Brilliant Blue G: 25 ml. H_3PO_4 al 85%: 12,5 ml. Etanol al 95%; el reactivo obtenido fue filtrado para que la absorbancia a 590 nm esté por debajo de 0,4; la reacción requieren de NaOH 1M en proporción de 50 μ l por cada 1000 μ l de reactivo de Bradford. La sensibilidad del método 0,2-20 μ g de proteína en tubo de reacción. En todos los casos se mezcló 20 μ l de muestra a medir con 1ml de reactivo, se mezcló, esperó 5 min. y se leyó a 590 nm. Al igual que el método de Lowry es necesario la comparación con patrones, de manera que debe construirse una recta de calibración en simultáneo empleando albúmina bobina (Sigma)

2.5 Determinación de hidratos de carbono

2.5.1. Método de Antrona

La reacción entre el reactivo de Antrona (9,10 dihidro-9-oxoantraceno) con los glúcidos presentes en medio fuertemente ácido dado por el H_2SO_4 , produce un complejo coloreado que se mide a 620 nm, siendo la sensibilidad del método de 50-300 μ g/ml.

Por ser una reacción de condensación las condiciones de calentamiento y enfriamiento deben estar muy bien estandarizadas. Deben procesarse los tubos con las muestras y los de la recta de calibración en forma simultáneamente de modo que tengan el mismo tratamiento térmico, y hacer una recta de calibración con un estándar, en este caso se usó glucosa (Sigma). Entre las precauciones hay que considerar que como la mayoría de los carbohidratos reaccionan en alguna medida en las condiciones descriptas, es indispensable tener cuidado con las contaminaciones, particularmente con celulosa o fibras (papel, *carilina*), es necesario trabajar con reactivos de alta calidad y en ocasiones recristalizar la antrona para tener blancos aceptables. Un esquema de las reacciones se muestra en la Figura 13.

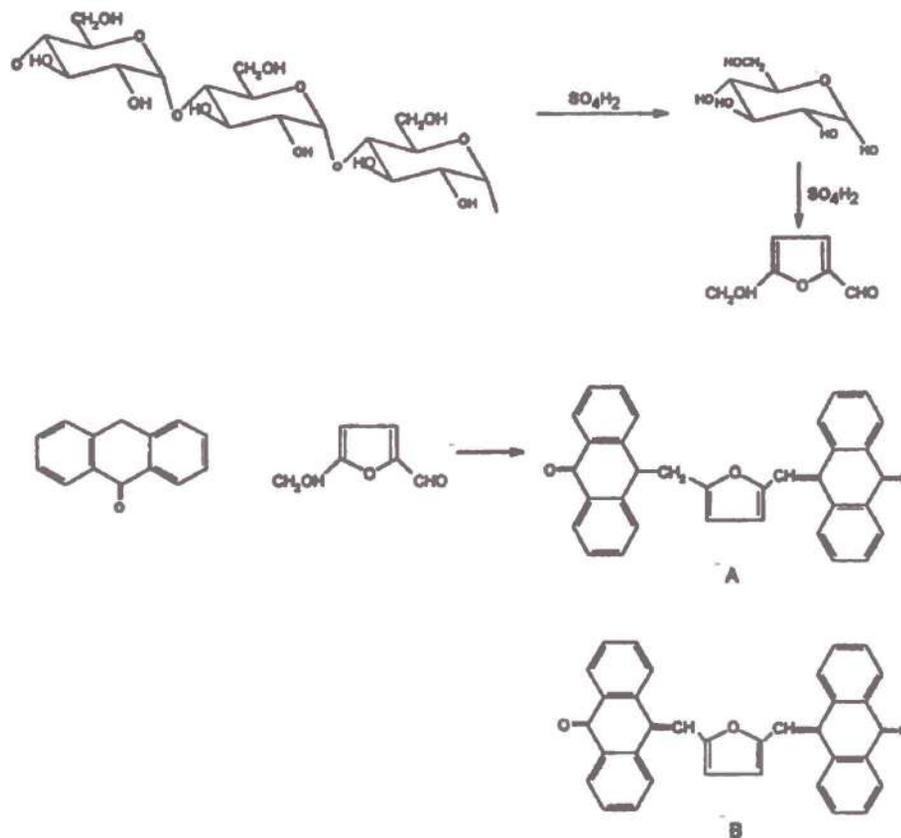


Figura 13: Secuencia de reacciones en el Método de Antrona; en la primera parte el H_2SO_4 hidroliza a monómeros los oligosacáridos de mayor tamaño, los cuales generan HMF (hidroximetil furfural) por deshidratación. Este último reacciona con el reactivo de antrona para dar una serie de compuestos coloreados. Se han identificaron al menos 9 compuestos de los derivados coloreados de la reacción de la antrona con los derivados furánicos provenientes de la oxidación de la glucosa, dos de ellos han sido aislados (Hoermann y Siddiqui, 1968) y caracterizados, proponiéndose al compuesto B como el mayor contribuyente al color de la reacción de la antrona con las hexosas.

2.5.2. Método de Dubois

Este método determina azúcares simples, oligosacáridos y polisacáridos, así como sus derivados incluidos los metil-eter con grupos reducibles libres o potencialmente reducibles dando una coloración amarillo-anaranjada cuando se los trata con fenol y H_2SO_4 concentrado. El rango de linealidad abarca de 10 a 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las absorbancias de las pentosas y hexosas tienen diferentes

máximos que, aunque cercanos, puede diferenciarse; hallándose el máximo de absorbancia de las pentosas en 480 nm., en tanto que el de las hexosas lo hace a 490 nm.

Variantes del método

Para determinar las condiciones que finalmente fueron usadas tanto en la curva de calibración como en las medidas realizadas; se analizaron previamente diferentes condiciones y metodologías.

*** Tratamiento térmico de los tubos**

En la publicación original (Dubois y col., 1956) las condiciones de incubación empleadas para el desarrollo del color eran 10 min. a temperatura ambiente, seguido de 20 min. en baño termostático a 30°C, sin embargo modificaciones posteriores indican que un calentamiento a Baño María aumenta la sensibilidad por un mayor desarrollo del color. Para determinar las condiciones que optimizaban la sensibilidad, se prepararon con glucosa patrón diluciones comprendidas dentro del límite de linealidad y se realizó la colorimetría variando solamente el tratamiento térmico aplicado a los tubos de reacción, tratando algunos según las condiciones publicadas en 1956 y sometiendo a otros a diferentes tiempos de calentamiento a Baño María a 100°C registrándose luego las DO a 480 y 490 nm. Todas las diluciones se realizaron al menos por duplicado y se tomaron 3 lecturas de cada una para minimizar errores, los resultados pueden verse en la Tabla 10.

Los resultados indican que el tratamiento térmico de los tubos no mejora significativamente la sensibilidad de la reacción logrando mayor color; de hecho según el tiempo de calentamiento considerado puede inclusive disminuir la intensidad lograda con relación a las obtenidas usando condiciones similares a las publicadas en 1956. Por ejemplo, para [azúcar]=20 µg/ml. la DO (480 nm.) promedio obtenida en condiciones similares al trabajo de 1956 fue de 0,2177 mientras que si caliente a Baño María por 15 min. se obtiene 0,2124; en idénticas condiciones pero a 490 nm los valores obtenidos son 0,2347 y 0,2322, respectivamente. Además el tratamiento térmico adicional aplicado a los tubos tiende a aumentar la dispersión de los resultados obtenidos a partir de soluciones preparadas de manera que tengan idéntica concentración; este incremento en la

incerteza y consecuentemente la baja reproducibilidad de los resultados, en particular a bajas concentraciones, motivó el uso de condiciones muy cercanas a las publicadas en 1956, proceso que aunque es más lento y requiere de uso de un baño termostático entrega resultados más confiables y reproducibles.

Tabla 10. Ensayos de Dubois en los que se ensayan diferentes tiempos de calentamiento a Baño María y se miden en las dos λ en que se determinan hexosas y pentosas empleando dos concentraciones de glucosa ubicadas en los límites del método. DS: Desviación estándar porcentual; BM: Baño María a 100°C.

Tratamiento	[glucosa]							
	20 $\mu\text{g/ml}$.				70 $\mu\text{g/ml}$.			
	DO 480	DS	DO 490	DS	DO 480	DS	DO 490	DS
	nm.	%	nm.	%	nm.	%	nm.	%
Condiciones	0,2241	0,64	0,2398 (*)	0,51	0,7983	1,39	0,8767 (*)	1,61
Dubois y col. (1956)	0,2113		0,2297 (*)		0,8262		0,9090 (*)	
BM; 2,5 min	0,2701	2,52	0,2885	2,83	0,7908	0,48	0,8642	0,46
	0,2197		0,2319		0,8004		0,8733	
BM; 5 min.	0,2335	1,31	0,2521	1,38	0,7696	1,48	0,8406	0,18
	0,2073		0,2244		0,7992		0,8841	
BM; 15 min.	0,2254	1,30	0,2473	1,51	0,8123	2,08	0,8867	2,51
	0,1994		0,2172		0,7706		0,8365	

* Estabilidad del color

Para verificar la afirmación “el color producido es permanente y es innecesario prestar especial atención al control de las condiciones o el tiempo en que son medidas en espectrofotómetro” (Dubois y col., 1956) se conservaron a 4°C los tubos tapados conteniendo las soluciones de glucosa patrón (destacadas con “*” en la Tabla 10) junto con los blancos de reactivos durante 11 días repitiendo las medidas para ver las diferencias; los datos de estas medidas se hallan resumidas en Tabla 11. El análisis de los datos permite determinar que si bien

es cierto que hay una intensificación debido al almacenamiento, el color realmente es estable una vez desarrollado y no es necesario medirlo en forma inmediata; la mayor variación corresponde a la concentración más alta y la variación en la concentración corresponde a un incremento del orden del 1% por cada día de almacenaje en las condiciones mencionadas, suponiendo linealidad del incremento del color, demostrando la robustez del método a las variaciones experimentales cotidianas, pudiendo en principio hacer las colorimetrías en un dado momento y realizar las medidas con posterioridad.

Reactivos y metodología seguida:

Colocar en un tubo de ensayo las cantidades y en el orden que se indican:

♦800 µl de azúcar de concentración a medir.

♦400 µl de Solución de Fenol al 5% p/v, agitar para permitir el correcto mezclado.

♦2 ml de H₂SO₄ concentrado (densidad 1.84 g/ml), usar siempre la misma pipeta de simple aforo.

Tabla 11. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el color desarrollado en reacciones de Dubois. Δ 1-11 %: diferencia porcentual entre las concentraciones resultantes a un día y a 11 días de desarrollo de color.

[glucosa]= 20 µg/ml					[glucosa]= 70 ug/ml				
Día 1		Día 11		Δ 1-11 %	Día 1		Día 11		Δ 1-11 %
DO 490 nm	[azúcar] calculada	DO 490nm	[azúcar] calculada		DO 490 nm	[azúcar] calculada	DO 490nm	[azúcar] calculada	
0,2297	20,19	0,2445	21,37	5,84	0,8767	71,71	0,9836	80,22	11,87
0,2398	21,00	0,2576	22,42	6,76	0,9090	74,28	1,0255	83,55	12,48

La reacción es exotérmica y es crítica para los resultados la velocidad y la forma en que debe agregarse el H₂SO₄. El ácido se agregó directamente sobre la superficie del líquido (no por las paredes) en unos 10 segundos de manera de lograr un rápido contacto del ácido, logrando una considerable elevación de la temperatura de la mezcla de reacción, lo que determina en gran medida la sensibilidad lograda. Al igual que con el método de Antrona se debe evitar toda contaminación, siendo las más comunes las provenientes de fibras de papel ya que las mismas dan interferencias. Se emplearon tubos de 14 mm de diámetro interno ya que permiten un rápido

mezclado evitando una rápida disipación del calor (lo que aumenta la sensibilidad) y son los que más se aproximan a los 16-20 mm usado en la publicación original. Finalizado el agregado del ácido se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, y luego 20 min. en baño termostático (30°C). Para minimizar errores todas las medidas se preparan al menos por duplicado y cada una se las mide 3 veces en espectrofotómetro, en tanto para la curva de calibración cada dilución fue hecha por triplicado, midiéndose cada una 3 veces para tener 9 valores experimentales por punto.

Curva de calibración

Tabla 12: Curva de calibración para el método de Dubois realizada con soluciones de glucosa y xilosa patrón. Los valores de $DO_{(1/2)}$ corresponden a la densidad óptica promedio obtenida de los 9 valores experimentales (se preparan 3 diluciones para cada punto y se toman 3 lecturas por dilución para minimizar errores), así mismo los DS% corresponden a los desvíos estándar porcentuales obtenidos entre los 9 valores.

[glucosa] $\mu\text{g/ml}$	$DO_{(1/2)}$ @ 490 nm	DS%	[xilosa] $\mu\text{g/ml}$	$DO_{(1/2)}$ @ 480 nm	DS%
10	0,1219	0,9	10	0,2492	0,5
20	0,2193	5,1	20	0,4641	2,1
30	0,3534	0,9	30	0,7188	1,7
40	0,4554	0,2	40	0,9112	1,1
50	0,6098	0,8	50	1,1271	0,9
60	0,7463	3,8	60	1,2619	1,1
70	0,8547	3,2	70	1,5317	2,1

Para la construcción de las rectas de calibración se emplearon monosacáridos calidad HPLC; se utilizó glucosa (representante de las hexosas) y xilosa (representante de las pentosas, las cuales se encuentran en los productos derivados de las leguminosas); los datos de las rectas de calibración se hallan contenidos en la Tabla 12. A partir de los datos las rectas fueron calculados por regresión de mínimos cuadrados, resultando las ecuaciones siguientes:

$$\text{DO a 490 nm} = 0,0125 * \text{glu } \mu\text{g/ml} - 0,0211 \quad r=0,998$$

$$\text{DO a 480 nm} = 0,0207 * \text{xil } \mu\text{g/ml} + 0,0640 \quad r=0,998$$

Este método fue usado para medir glúcidos en el sobrenadante resultante de la precipitación de las proteínas con TCA al 12% en muestras de suero de soja liofilizado disuelto en agua destilada y directamente en suero de soja no liofilizado.

2.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las electroforesis que se presentan en este trabajo se llevaron a cabo en mini placas con el equipo BioRad, modelo Mini Protean II.

2.6.1 Reactivos utilizados:

Buffer de corrida: Tris (Hidroximetil aminometano)-HCl (Tris-HCl) 0,025M, glicina 0,192M (pH 8,3 con o sin dodecilsulfato de sodio (SDS) 0,1% p/v.

Buffer de gel separador: Tris-HCl 0,375M (pH 8,8), TEMED 0,1% (p/v) con o sin SDS 0,1% (p/v).

Buffer de gel apilador: Tris-HCl 0,125M (pH 6,8) con o sin SDS al 0,1% p/v.

Buffer de muestra para electroforesis disociante: Tris-HCl 0,125M (pH 6,8), glicerol 20% (v/v), azul de bromofenol 0,05% (p/v) con o sin 2-mercaptoetanol (2-ME) 5% v/v.

Solución de acrilamida-bisacrilamida (30% p/v) y bisacrilamida 0,8% p/v.

Se utilizaron geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y el sistema de buffer de Laemmli (1970), que se encuentran listados en el ítem anterior.

Los geles preparados fueron de 1 mm de espesor, y un tamaño aproximado de 8 X 8 cm, de 10 calles en una concentración del 12% (p/v) de la solución de acrilamida-bisacrilamida, usándose TEMED al 0,1% (v/v) y persulfato de amonio al 10% en una proporción del 0,36%(v/v). Las electroforesis se realizaron a voltaje constante (220 V) y una intensidad de corriente de 30 mili amperes por cada placa, por un período de unos 40 minutos. Se usó en todos los casos un gel apilador al 5% (p/v) de la solución de acrilamida-bisacrilamida.

Las muestras fueron preparadas de manera tal que contengan de 20-40 μg de proteína en el volumen de siembra recomendado para los geles preparados (10 calles; 1 mm de espesor) el cual es ≤ 15 μl /calle. Dicha cantidad está de acuerdo tanto con los lineamientos dados para electroforesis realizados en mini-geles empleando el método de Laemmli (1970) en los cuales la correcta identificación de las bandas requiere de 1 μg de proteína por cada banda aislada cuando se colorea con Coomassie Blue R-250 (Abelson y Melvin, 1990) y a las cantidades previamente empleadas en otros ensayos similares (Sorgentini-Wagner, 1999).

2.6.2 Preparación de las muestras

Las muestras analizadas fueron de liofilizado de suero de soja previamente tratado térmicamente (rampa de calentamiento de $5^{\circ}\text{C}/\text{min.}$) hasta las siguientes temperaturas 90, 120, 130, 140, 150 y 180°C y suero liofilizado sin tratamiento térmico alguno. Así como las proteínas obtenidas por precipitación con acetona en frío desde soluciones acuosas de suero de soja liofilizado tratado térmicamente en las condiciones recién mencionadas y sin tratamiento térmico.

Las mismas se las disolvía en buffer de muestra el que podía contener 2-ME 5% v/v (condiciones reductoras), o no tenerlo; calentadas durante (10 min., 100°C en Baño María) y posteriormente centrifugadas (10.000 RPM, 10 min. $T_{\text{amb.}}$), se sembraron de 5 a 15 μl de los sobrenadantes. La cantidad de proteína sembrada dependió de la coloración usada; entre 20 y 40 μg de proteína por calle en el caso de colorear con Coomassie R, mientras que cuando se usó la tinción para glicoproteínas, las cantidades sembradas fueron más altas. El método de coloración empleado para detectar glicoproteínas fue el método de PAS (*periodic acid-Schiff*), empleando un kit comercial *Glycoprotein Detection.Sigma*, el cual contiene los reactivos de oxidación, reducción, reactivo de Schiff y un control peroxidasa positivo. Para el cálculo de los pesos moleculares que se informan en este trabajo se utilizaron proteínas patrón de masa molecular provistas por Pharmacia, el cual se compone de una serie de proteínas de peso molecular conocido; para este trabajo se usaron los patrones de proteínas de baja masa molecular LMW (*Low Molecular Weight*) que contiene: Fosforilasa b (94 kDa); Albúmina Bobina (67,0 kDa); Ovoalbúmina (43,0 kDa); Anhidrasa Carbónica (30,0 kDa); Inhibidor de la Tripsina de soja (20,1 kDa) y α -lactoalbúmina (14,4 kDa). Los pesos moleculares informados corresponden al cálculo de al menos 2 geles.

2.6.3 Coloración de los geles

La mayor parte de los geles fueron teñidos con Coomassie R 250 al 0,2% p/v en una mezcla etanol: agua: ácido acético en relación de volúmenes (4: 4: 1,6) durante 12 hs, empleando bandeja agitadora para procurar un color parejo y minimizar la sedimentación del colorante. La decoloración se realizó con mezcla agua: etanol: ácido acético con la siguiente relación de volúmenes (6,5: 2,5: 1). Completada la decoloración los geles se guardaron en agua ligeramente acidulada con ácido acético.

Los geles fueron fotografiados y almacenado en formato TIFF no comprimido con una resolución de 640X480 pixeles, ajustándose luego las imágenes a un tamaño y resolución adecuada usando el programa Corel Photo-Paint 8, el que también se usó para hacer ajustes de brillo, contraste, efectos de perfilado (*sharpening*), suavizado (*smoothing*) y remoción de efectos de fondo (*background*) y analizadas usando el software especial (Scion Image, 1998; URL:<http://www.scioncorp.com>) para la medida automática de la intensidad de las bandas proteicas en el gel.

Este tipo de programas permite medir variaciones monodimensionales en alguna señal específica como las bandas proteicas presentes en los geles de electroforesis, dónde la imagen consiste en una serie de líneas cuyas posiciones y densidades son de interés. Estas densidades son convertidas a partir del brillo de los pixeles en gráficos de intensidades relativas en función de pixeles para cada banda dentro de un gel. Estas gráficas obtenidas son procesadas luego usando el programa *Origin 6.0 Professional*, con el que se convierte la escala de pixeles a mm recorridos; el procedimiento requiere de la presencia de estándares o patrones dentro de cada gel, lo que se usa para establecer una correlación entre la distancia migrada por cada banda y el peso molecular. Con este programa también es posible medir el área total y si la resolución lo permite estimar los porcentajes presentes de cada fracción.

2.7 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica en la cual se mide la diferencia en la energía suministrada a una sustancia y un material de referencia, en función de la temperatura

mientras ambos son sometidos a un programa controlado de temperatura; permite conocer las temperaturas a las cuales ocurren los procesos químicos o físicos que sufre la muestra en estudio y el calor o la entalpía que se pone en juego en estos procesos. Se utilizó un calorímetro diferencial de barrido: *Polymer Laboratories (Rheometrics Scientific)*, y los datos fueron analizados mediante el software *Rheometric Scientific Plus V* versión 5.41. Los ensayos DSC se efectuaron con dos objetivos, por un lado analizar el comportamiento térmico del suero de soja y sus proteínas aisladas, y por otro realizar tratamientos térmicos sobre el suero liofilizado para ser utilizado en otros ensayos.

2.7.1 Calibración

La calibración de la temperatura, así como el flujo de calor en el equipo fue llevada a cabo de acuerdo a la norma ASTM E968-83 (1984) en las que se registra las endotermas de fusión de un material de alta pureza (>99,9%) utilizado como patrón, del que se conoce su calor de fusión. Puede integrarse el pico obtenido en el tiempo, obteniéndose un área que es proporcional a la entalpía de fusión, del material de referencia, que se conoce, por tanto a partir de la curva obtenida con este patrón se calcula el coeficiente de calibración de la celda con la que se puede determinar la entalpía de transición de una muestra desconocida. Para poder determinar las temperaturas a las que ocurren las transiciones de la muestra es necesario calibrar la escala de temperaturas también usando la fusión de una sustancia de alta pureza (ASTM E967-83), utilizándose indio, ácido láurico y ácido esteárico como patrones.

En este equipo la celda posee un disco de constantan que cumple una doble función: Sus dos zonas elevadas forman el receptáculo doble donde se apoyan las cápsulas que contienen la muestra y la referencia y además es uno de los elementos de la unión termoelectrónica para medir la temperatura.

El calor se transfiere desde el disco hasta la muestra a través de la cápsula. El flujo diferencial de calor es monitoreado por una termocupla de cromel-alumel a través de alambre unidos a la parte inferior de las dos zonas elevadas del disco de constantan de la celda que allí se encuentra recubierto por una delgada capa de cromel. Es una condición necesaria que la referencia sea de un material inerte para que en las condiciones de corridas no sufra ningún proceso de intercambio de calor

2.7.2 Condiciones usadas en el trabajo y muestras analizadas por DSC

Los termogramas mostrados en este trabajo se realizaron a una velocidad de 5 °C/min, debido a que de esta manera se consigue una mejor resolución de las transiciones que a 10°C/min (velocidad más usualmente empleada); las referencias usadas fueron una cápsula vacía formada por la unión de una base con una tapa (0,06183 g) para el caso de muestras anhidras y una formada por 2 bases y 2 tapas (0,11323 g) para el caso de muestras en dispersiones al 30% en agua. Las muestra colocadas en las cápsulas fueron las siguientes:

-Liofilizado de suero de soja, almacenado en condiciones diferentes.

-Liofilizado de suero de soja, dispersado al 30% p/p en agua.

-Liofilizado de suero de soja, dispersado al 30% p/p en agua previamente tratado térmicamente.

-Proteínas precipitadas con acetona en frío desde soluciones de liofilizado de suero de soja con y sin tratamiento térmico.

Para las medidas en DSC, se emplearon cápsulas herméticas de aluminio provistas por *TA instruments*; las cápsulas vacías eran debidamente pesadas e identificadas. En el caso de analizar el suero liofilizado, este se agregaba con ayuda de un pequeño embudo con soporte el cual puede verse en la Figura 14.



Figura 14: Embudo empleado para introducir el suero liofilizado en las cápsulas de DSC, el mismo tiene la ventaja de contar con una boquilla de salida de diámetro similar a la base de la cápsula, lo que permite ubicar la muestra en dicho lugar, reduciéndose de esta forma los problemas de sellado, agilizando la carga de las muestras y minimizando los problemas de hidratación.

Hecho esto, las cápsulas eran dejadas un mínimo de 3 días en P_2O_5 cargadas con la muestra pero abiertas con el fin de eliminar posibles restos de humedad incorporada durante el llenado de las cápsulas. Finalizado este lapso todas las cápsulas a ser medidas eran sacadas, selladas y pesadas.

2.7.3 Tratamiento térmico del liofilizado de suero de soja

Los tratamientos térmicos del suero de soja liofilizado fueron realizados en cápsulas comerciales selladas herméticamente (≈ 20 mg/cápsula) empleando el calorímetro mencionado en 2.7 y las condiciones detalladas en 2.7.2 hasta distintas temperaturas finales (90-210°C); estas muestras fueron utilizados para los siguientes ensayos:

- Análisis por microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM).
- Preparación de dispersiones al 30% p/p en agua, para su análisis por DSC.
- Determinación de actividad antitriptica por el método de Gonzalez y Carrillo (1987).
- Estudio de los espectros UV-Visible.
- Estudios de los glúcidos presentes por TLC.

Finalizado el calentamiento la cápsula conteniendo la muestra era retirada del calorímetro y enfriada (hielo, 30 min.); posteriormente el liofilizado era recuperado abriendo la cápsula sobre una caja de petri, utilizando guantes para evitar problemas de contaminación y cortando la misma con pinzas y alicates de acero inoxidable. El porcentaje de recuperación obtenido de suero liofilizado calentado dependió de tratamiento térmico aplicado; con relación a las precauciones tendientes a evitar la hidratación se siguieron los pasos detallados en el apartado 2.2.3.

2.7.4 Aislamiento de las proteínas desde suero de soja liofilizado tratado térmicamente

La precipitación se realizó siguiendo los procedimientos detallados en 2.3.2, a partir de una solución acuosa de liofilizado calentado (relación agua destilada: liofilizado calentado 10: 1) empleando una relación acetona: solución acuosa 1: 1. Para ello se realizaron los tratamientos térmicos necesario para obtener 150 mg de liofilizado calentado a cada temperatura, el cual fue molido e hidratado en agua a 4°C durante 24 hs, antes de centrifugar (10.000 rpm, 15 min, 4°C). A partir de estas soluciones clarificadas se realizó la precipitación de las proteínas empleando acetona a 0°C, las cuales fueron liofilizadas. Se determinó la masa recuperada de proteína liofilizada para cada temperatura. El grado de glicosilación fue calculado determinado la proteína soluble por Lowry y la cantidad de HC por Dubois.

2.7.5 Determinación del grado de glicosilación de las proteínas aisladas desde suero de soja liofilizado tratado térmicamente

El grado de glicosilación de las proteínas aisladas desde suero liofilizado con y sin tratamiento térmico fue determinado sobre soluciones acuosas (10 mg/ml) de las proteínas liofilizadas, determinando el contenido de HC totales y proteína empleando los métodos de Dubois y Lowry respectivamente. Estos ensayos se realizaron sobre las soluciones enteras y centrifugadas (10.000 rpm, 15 min)

2.8 Determinación de cenizas

Se realizó al menos por duplicado la calcinación de una cápsula de porcelana (700°C, 30 min.) para asegurar la eliminación de residuos. Evitando su hidratación se pesó el suero liofilizado (masas comprendidas entre 1.2 y 1.4 g) y se comenzó la calcinación bajo campana 1^{era} usando mechero en triángulo de pipas hasta residuo carbonoso y luego en horno eléctrico computarizado modelo 331 (marca INDEF), el que se programó con una rampa de calentamiento hasta 550°C en 30 min; luego una estadía por 90 min. a 550°C para evitar la pérdida de haluros en especial los cloruros, luego de esto se dejó enfriar y se peso nuevamente. En todos los casos no se llegó en una 1^{era} etapa a cenizas totalmente blancas, por lo que fue necesario agregar unas gotas

de agua bidestilada, y repetir la operación de calcinación hasta obtener cenizas totalmente blancas.

2.9 Microscopía electrónica de barrido ambiental

Se realizó en el CITEFA (Centro de Investigaciones Científicas y Técnicas de las Fuerzas Armadas), el que cuenta con un microscopio ELECTROSCAN 2010 *environmental Scanning Electrón Microscope-ESEM*. Este se caracteriza y diferencia de otros microscopios electrónicos en que su cámara trabaja a un rango de 0-20 Torr., y dentro de la cámara hay vapor de agua y condiciones que permiten variaciones de presión, temperatura y humedad para la observación de muestras no conductoras, las que no requieren de preparación previa.

Las muestras observadas fueron liofilizado de suero de soja calentado en cápsula de DSC a diferentes temperaturas, mismas que fueron enfriadas en hielo por 30 minutos luego del ensayo, secadas, abiertas y colocadas en desecante; transcurrido un lapso de 6 días se tomó una alícuota y se las observó con el equipo mencionado, la observación fue repetida 29 días después, lo que nos da un tiempo de almacenaje de 35 días para la 2^{da} observación.

2.10 Cromatografía en capa fina de azúcares (TLC)

Para una estimación del tipo de azúcares presentes se realizó una TLC (*Thin-Layer Chromatography*) usando placas cuadradas de sílica gel de 20 cm de lado (Sigma) con soporte de aluminio, una placa fue cortada a la mitad para poder aprovechar toda la longitud de la misma maximizando la resolución y además poder hacer 2 siembras de la muestra con diferentes azúcares para realizar comparaciones, la placa fue activada por 60 min. a una temperatura de 105°C en estufa.

Se prepararon soluciones al 0,5 % (p/v) usando azúcares patrones provenientes de un kit de HPLC quedando representados los monosacáridos de 5 carbonos por la xilosa y arabinosa, en tanto que para los de 6 carbonos se empleó galactosa y sorbosa; los disacáridos empleados fueron sacarosa y lactosa, los cuales fueron manipulados con más cuidado ya que son más fácilmente hidrolizables que los monosacáridos. La muestra sembrada fue una solución de liofilizado al 1% ya que aproximadamente el 50% del mismo son azúcares. En todos los casos se sembró 5 µl de

cada una de estas soluciones (sobre una línea previamente marcada a 2 cm del borde) en la placa previamente activada. La placa activada y sembrada se fijó a un soporte el cual esta unido a una varilla que atraviesa la tapa. De esta manera es posible mantener suspendida la placa sembrada dentro de cuba de TLC cerrada de modo que no toque el solvente de saturación, solvente que consistente en una mezcla de n-propanol-acetato de etilo-agua destilada en una relación de volúmenes (70: 20: 10).



Figura 15: Cuba cromatográfica empleada para TLC. La tapa posee un orificio por el que pasa en forma ajustada una varilla la cual termina en un soporte desde donde se sujeta la placa. Esto permite colocar el conjunto tapa-varilla-soporte al que esta sujeta la placa TLC previamente

activada y sembrada, de modo que no toque el solvente. Se garantiza un buen sellado y consecuentemente una buena saturación con el uso de silicona tanto en la fijación de la tapa como en el orificio. Esto logró una buena saturación y mejores resultados. Finalizada la saturación la corrida da comienzo cuando se desliza la varilla de modo de poner en contacto la placa con el solvente de saturación/corrida. Se muestra una placa ya revelada.

En estas condiciones se lo dejó saturar con la tapa colocada y sellada con silicona por espacio de 24 horas. Finalizada la saturación, se da comienzo a la corrida desplazando la varilla que atraviesa la tapa y sujeta la placa de TLC de modo de poner en contacto el borde inferior de la placa con el solvente de corrida. La cuba empleada para los ensayos de TLC puede verse en la Figura 15. La corrida se realizó dejando avanzar el frente del solvente hasta unos 5 mm del borde superior, momento en que se abrió la cuba de TLC, se retiró la placa y marcó el frente del solvente con lápiz antes que el mismo se evaporara. El tiempo de corrida fue de unas 2,5 hs. y el revelado se hizo rociando la placa con una mezcla de etanol, H₂SO₄ y fenol al 5% p/v en una relación de volúmenes de 180: 10: 1 y colocando la placa por 15 min. en estufa a temperatura de 105°C.

Las placas fueron escaneadas en un equipos HP Scanjet 3200 C usando la máxima resolución disponible siendo almacenado los archivos en formato TIFF no comprimido. Posteriormente las imágenes fueron procesadas como se describió para los geles de electroforesis, empleándose el *Software Scion Image, 1998* para la medida automática de la intensidad de las manchas reveladas en la placa, obteniéndose gráficos de intensidades relativas en función de pixeles para cada “calle” dentro de las placas. Posteriormente, estas gráficas obtenidas son procesadas usando el programa *Origin 6.0 Professional*, con el que se convierte la escala de pixeles a mm recorridos; de esta manera se puede ubicar la posición de cada una de las manchas a fin de calcular los R_f.

2.11 Determinación de la actividad antitriptica

Los inhibidores de las proteasas son sustancias que tienen la habilidad de inhibir la actividad proteolítica de ciertas enzimas y están asociados a la baja digestibilidad de algunas proteínas de origen vegetal entre ellas las provenientes de la soja. Estos inhibidores son

rutinariamente inactivados durante el procesamiento de los alimentos destinados al consumo humano, valiéndose de tratamientos térmicos u otras tecnologías. Debido al efecto negativo de su presencia en la calidad nutricional en los alimentos que lo contienen; idealmente los niveles hallados en los alimentos adecuadamente procesados deberían ser nulos o detectarse en cantidades residuales. Uno de los métodos más comúnmente utilizado para determinar la actividad antitriptica residual es el método de Gonzalez y Carrillo (1987) que basa su ensayo en la disminución de la actividad de una proteasa patrón debido al agregado de un extracto del alimento el cual se sospecha contiene los inhibidores; este método utiliza hemoglobina desnaturizada como sustrato y patrón de tripsina como enzima proteolítica.

Proteasa + Sustrato → Péptidos + aminoácidos
(tripsina) (hemoglobina)

Proteasa + Sustrato + Inhibidor → Proteasa—Inhibidor + Sustrato

El reactivo de Folin reacciona con los residuos de tirosina, triptofano y en menor grado con los de cisteína e histidina de las proteínas dando un complejo color azulado. La adición de TCA (ácido tricloroacético) al producto de la reacción enzimática precipita los péptidos de gran tamaño que no han sido hidrolizados dejando en la solución los péptidos menores y los aminoácidos, que luego serán determinados en forma espectrofotométrica utilizando el reactivo de Folin. De esta manera cuanto mayor sea la inhibición de la tripsina patrón colocada en el medio por parte del producto vegetal que estamos evaluando tanto menor será la coloración obtenida.

Preparación de la muestra: El protocolo de trabajo requiere el uso de soluciones con un pH de 8,0 (pH óptimo de la tripsina) y una concentración de 7,2 mg proteína/ml de extracto a ensayar.

La muestra analizada en este estudio fue suero de soja liofilizada con y sin tratamientos térmicos utilizando una rampa de calentamiento de 5°C/min hasta las siguientes temperaturas máximas 90, 120, 130, 140, 150 y 180°C. Debido al contenido de proteínas de la muestra, esto se traduce en soluciones de 41 mg de suero liofilizado/ml de buffer fosfato pH 8,0.

Preparación del sustrato: Disolver 2 g de hemoglobina liofilizada en 16 ml de NaOH 0,5N añadiendo luego con agitación 64 ml de agua destilada y 36 g de urea (agente caotrópico que

despliega la molécula de hemoglobina para mejorar el ataque enzimático). Se deja en reposo durante 1 hora para permitir la disipación de la espuma. Se agregan 4 g, más de urea y ajustar el pH a 8,0 con H_3PO_4 para disolver la espuma. Se deja reposar nuevamente y se repite una vez más el último paso asegurándose que el pH final sea de 8,0. Esta solución se guardará en heladera para evitar su deterioro.

Preparación del buffer fosfato (pH=8,0): Se utiliza un sistema buffer con la siguiente relación de cada sal para 1000 ml: 10,45 g de HNa_2PO_4 (fosfato dibásico) y 0,88 g H_2NaPO_4 (fosfato monobásico); ajustándose el pH a 8,0 con NaOH o H_3PO_4 en caso de ser necesario.

Reactivo de Folin: Se preparará utilizando la siguiente relación de volúmenes entre reactivo de Folin ya preparado y agua destilada 1: 2. Se conservará en frasco color caramelo en heladera.

Preparación de la enzima: Se utilizará en extracto con una concentración de 10 mg/ml de tripsina liofilizada (Sigma) en agua bidestilada. Se conservará en heladera.

Otros reactivos utilizados: El TCA al 5% p/v en el caso del blanco tiene la función de impedir que la enzima ataque la hemoglobina, mientras que en los casos en que se deja actuar durante la incubación a 37°C interrumpe la reacción y permite la precipitación de los péptidos de bajo PM que no llegaron a ser atacados durante la incubación. También se requiere de NaOH 1N el cual dará el medio alcalino necesario para la reacción del Rvo. de Folin y de H_3PO_4 1M para los ajustes de pH.

Protocolo utilizado: Se parte de hemoglobina (substrato) termostata a 37°C durante 10 min. Los reactivos serán agregados en el orden y en las cantidades especificadas en la Tabla 13.

Las lecturas se toman a 650 nm; a todos los valores se les descuenta el blanco dando los valores corregidos. El valor de la DO del control corresponde al 100% de actividad porque se trata del substrato y la enzima sin la presencia de inhibidores. El agregado de una muestra que tenga actividad antitriptica dará valores de DO comprendidos entre el blanco (0% actividad) y el control (100% de actividad). En la muestra de partida (suero de soja liofilizado) es posible la existencia de actividad antitriptica debido a que la harina de soja de partida es desgrasada, desolventizada y no está tratada térmicamente; asimismo es de esperar que los tratamientos térmicos ocasionen una caída de esta actividad antitriptica en la medida que el tratamiento térmico se haga más enérgico. Los ensayos se realizaron sobre muestras de suero de soja liofilizado con y sin tratamientos térmicos, preparando soluciones con 41 mg/ml de manera de

obtener la concentración requerida por el método (7,2 mg proteína/ml). Cada uno de los ensayos se realizó controlando rigurosamente no solo la temperatura del baño termostático sino la temperatura alcanzada por cada tubo, estandarizando todas las variables lo máximo posible; cada ensayo se realizó al menos por triplicado para tener valores confiables por la alta variabilidad propia de los ensayos enzimáticos.

Tabla 13 Protocolo utilizado para la determinación de la actividad antitriptica en muestras de suero liofilizado con y sin tratamiento térmico.

	Blanco	Control	Muestra
ml de hemoglobina	1,0	1,0	1,0
ml de buffer fosfato	0,1	0,1	----
ml de muestra	----	---	0,1
ml de enzima	0,1	0,1	0,1
ml de TCA (5% p/v)	2,0	---	----
		Incubar 20 min. a 37°C	
ml de TCA (5% p/v)		2,0	2,0
		Esperar 10 min. (precipitación)	
		Centrifugación a 5000 rpm; 10 min.; 20°C	
ml de sobrenadante tomados	1,0	1,0	1,0
ml de NaOH (1N) agregados	2,0	2,0	2,0
ml de Rvo. Folin agregados	0,6	0,6	0,6
		Permitir el desarrollo del color durante 30 min a T _{amb.}	

El % inhibición de la tripsina se calculó según las siguientes expresiones:

$$DO \text{ control} - DO \text{ blanco} = 100\% \text{ actividad} \quad (1)$$

$$DO \text{ muestra} - DO \text{ blanco} = X\% \text{ actividad} \quad (2)$$

$$100 - X = \% \text{ inhibición} \quad (3)$$

La actividad antitriptica relativa (%) se estimó como el % inhibición tomando como referencia al del SSL no calentado, según la expresión: *Actividad antitriptica relativa (%) = 100 x I/I₀*; donde: I e I₀ son los % de inhibición de las muestras de SSLC y SSL, respectivamente.

RESULTADOS

Y

DISCUSION

3. COMPOSICIÓN DEL SUERO DE SOJA

Como se detalló en Materiales y Métodos (2.2) de los 5,2 l de suero de soja obtenidos, 1,6 l fueron congelados y posteriormente liofilizados mientras que el resto fue conservado con 0,04% azida sódica en heladera para estudiar los efectos del almacenamiento. La información bibliográfica presentada en la introducción nos orienta sobre los componentes que, según sus características químicas y propiedades físicas, como la solubilidad podrían estar presentes en el suero de soja, líquido como liofilizado. Entre esos componentes podemos mencionar:

- Factor inhibidor de la tripsina de Kunitz, de 20 kDa con 2S-S (Koide e Ikenaka., 1973), factor del cual se sabe que es muy estable y tolera rangos de pH comprendidos entre 3,0-10,0; posee una relativamente alta estabilidad térmica en condiciones de baja humedad (Koshiyama y col., 1981), que serán las condiciones predominantes en un suero de soja que está liofilizado.
- Aglutinina de soja, conocida también como hemaglutinina o lectina, tetrámero de 120 kDa, formado por 4 subunidades idénticas de 30 kDa cada una, con pocos S-S y un Pi de 5,81 (Lotan y col., 1974), se sabe que forma complejos estables con glúcidos, en especial con D-manosa y la N-acetil-D-glucosamina, representando del 1 al 3% de las proteínas presentes en harina.
- Inhibidor de la tripsina de Bowman Birk; de bajo PM (8 kDa) y 7 puentes S-S (Odani y col., 1972), los cuales le otorgan alta estabilidad térmica (Dipietro y Liener, 1989a).
- β -amilasa (PM 57 kDa; Pi 5,85), sin puentes disulfuro (Morita y col., 1976).
- Lipooxigenasa (PM 100 kDa; Pi 6,58), responsable de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, dando un *flavor* característico, factor que es inactivado por calor (Wolf y Corvan, 1975; Esquin y col., 1977 e Iwabuchi y Yamauchi, 1987).
- Ureasa, enzima que se usa como una medida de la inactivación térmica de los factores antitripticos anteriormente mencionados.
- Hidratos de carbono solubles: sacarosa 5,7%, estaquiosa 4,5% y rafinosa 4,1% (expresados en base seca en el poroto) y trazas de glucosa, verbascosa, y melibiosa entre otros.
- Componentes minoritarios como citocromo C, antivitaminas del complejo B, fitatos, lipasas, proteasas. Se encuentran presentes además, componentes con actividad endócrina como goitrógenos y fitoestrógenos. Entre los minerales provenientes del poroto los más abundantes

son Fe, Ca, Cu, P y Zn. Debemos considerar también los minerales agregados durante todos los procesos de extracción, separación y demás operaciones realizadas siendo las más significativas las siguientes: ajuste del pH a 8,0 con NaOH para la extracción de la harina, acidificación con HCl hasta pH 4,5 para la precipitación de las proteínas de reserva y el ajuste final de pH con NaOH para elevar nuevamente el pH desde 4,5 a 8,0. Por lo tanto es esperable un aumento en el contenido de NaCl en el suero respecto a la cantidad que se encuentra en el poroto originalmente.

3.1 Contenido de sólidos totales y cenizas en el suero de soja

La densidad del suero de soja líquido fue de 1,02 g/ml (DS=0,005) y su extracto seco de 32,77 g/l (3,28 % p/v; DS=1,82), valor que cuantifica el grado de dilución y permite determinar que es un suero con un contenido de agua superior el 96%.

La medida de cenizas proporcionó una idea de los minerales presentes. Se realizó sobre suero de soja liofilizado, arrojando un resultado de 13,4 % p/p (DS=0,30) luego de la segunda calcinación (peso constante). Esto corresponde a un valor de cenizas de 0,44 %.p/p en el suero de soja líquido.

3.2 Contenido de proteínas en el suero de soja

3.2.1 Sobre muestra de suero líquido

En una primera aproximación se realizaron medidas directas sobre el suero tal cual empleando distintos métodos, obteniéndose los siguientes valores:

- ◆Bradford → 6,48 mg proteína/ml suero (DS = 1,62)
- ◆Lowry → 4,69 mg proteína/ml suero (DS = 0,47)
- ◆Kjeldahl → 5,28 mg proteína/ml suero (DS = 0,06)

Los valores obtenidos por Bradford se tomaron solo como orientativos dado que presentaron la mayor dispersión, y un valor superior al dado por Kjeldahl, esto posiblemente debido a que el

colorante Coomassie G250 interactúa con las proteínas del suero de un modo diferente que con la proteína empleada para la curva patrón (albúmina bovina). Los resultados obtenidos con Lowry fueron más reproducibles y pese a la presencia de azúcares reductores dieron valores cercanos ($\approx 90\%$) a los hallados por Kjeldahl. El alto grado de dilución del suero pareciera reducir la interferencia dada por los azúcares.

3.2.2 Sobre muestra de suero liofilizado

El contenido de proteína bruta se determinó empleando el método de Kjeldahl, mientras que la proteína real fue determinada por Lowry en los precipitados libres de azúcares obtenidos con TCA al 12%, siguiendo los procedimientos detallados en 2.4.1 y 2.4.2, respectivamente.

3.2.2 a) Medidas con el método de Kjeldahl

Las medidas de componentes nitrogenados que incluyen las proteínas más el nitrógeno no proteico, se realizaron en forma “manual” y en forma semiautomática usando los equipos de digestión y destilación marca BÜCHI obteniéndose los siguientes resultados:

◆Kjeldahl (manual) = 17,73 % p/p DS=0,18 = 177,3 mg proteína/g suero liofilizado

◆Kjeldahl (semiautomático) = 17,60 % p/p DS=0,03 = 176,0 mg proteína/g suero liofilizado.

El valor promedio resulta de $17,66 \pm 0,10$ % p/p.

3.2.2 b) Medidas con el método de Lowry

Las proteínas fueron precipitadas por medio del agregado de TCA al 40% p/v; 12% de concentración final, con posteriores lavados del precipitado para evitar interferencias del propio ácido y de azúcares reductores. Se realizó una estimación de la cantidad de TCA retenida en el precipitado proteico separado por centrifugación a fin de agregar la cantidad de base necesaria para lograr el pH requerido por el método de Lowry. Se halló que al menos el 5% (4,58%) de la acidez agregada con el TCA para la precipitación de las proteínas queda retenido en el precipitado centrifugado.

El número de lavados necesarios para la total eliminación de azúcares se determinó incrementando el número de lavados realizados en precipitaciones independientes y midiendo la proteína por Lowry. Los resultados se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14: Dependencia entre el número de lavados realizados a la proteína precipitada con TCA 12% y el valor determinado empleando el método de Lowry. La proteína fue precipitada desde soluciones acuosas (relación agua: liofilizado, 10: 1) agregando TCA al 40%, 12% p/v en el volumen final, separando por centrifugación.

Ensayo	N ^o lavados con TCA	mg proteína/gr suero liofilizado	Valores medios
1	2	91,01	
2	2	100,31	
3	2	101,76	100,69 ± 7,65
4	2	109,68	
5	3	103,13	
6	3	107,34	107,35 ± 4,23
7	3	111,59	
8	4	108,01	
9	4	107,78	107,27 ± 1,09
10	4	106,01	

El análisis de los datos indica que el número de lavados es importante al momento de obtener resultados repetitivos. La desviación estándar (DS) en los valores del contenido de proteínas obtenidos con dos (2) lavados fue de 7,65, en tanto que para los realizados con cuatro (4) lavados, este desvío se reduce a 1,09; esto se debe al alto contenido de azúcares presentes en el suero de soja liofilizado que, como se verá más adelante, alcanza un 55% en base seca del mismo, siendo algunos reductores.

Los resultados obtenidos por Kjeldahl (N x 6,25) presente en la muestra de suero de soja son significativamente mayores al valor de proteína real obtenido para la misma muestra; una posible explicación para esta diferencia es que en el suero de soja, además de las proteínas, hay presentes compuestos nitrogenados no proteicos (NNP) que no precipitan con TCA y que por lo

tanto no son medidos. No se debe descartar la posibilidad de que el valor de proteínas por Kjeldahl esté sobreestimado por el empleo de un factor superior al adecuado.

Las especies proteicas presentes en el suero de soja serán analizadas cuando se muestren los resultados del efecto del almacenamiento (sección 4.2.3) y del tratamiento térmico del suero de soja liofilizado (sección 5.3)

3.3 Glúcidos en suero de soja liofilizado

3.3.1 Contenido de hidratos de carbono

Las medidas fueron practicadas sobre el sobrenadante resultante de la precipitación de las proteínas con TCA al 12% v/v destinada a la valoración de proteína real por método de Lowry. Se realizaron medidas usando los métodos de Antrona y Dubois.

3.3.1 a) Método de Antrona

Las medidas fueron realizadas empleando dos espectrofotómetros diferentes: a) Spectronic, equipo que mide la absorbancia con tres decimales y con las muestras directamente en los mismos tubos de reacción; y b) espectrofotómetro Beckman DU 650, que lee cuatro decimales y las muestras son medidas en cubetas. Los resultados obtenidos fueron 45,94 % p/p (DS=2,98) y 47,44 % p/p (DS=1,49) para a) y b), respectivamente. Este último valor resulta más confiable por provenir de 6 medidas independientes, tener menor dispersión y haber usado un equipo de mayor precisión.

3.3.1 b) Método de Dubois

Las medidas fueron realizadas como se explicó en el punto 2.5.2 en el sobrenadante resultante de la precipitación de proteínas con TCA en suero liofilizado o directamente sobre el suero liofilizado disuelto en agua. Con esto se evaluó si surgían diferencias por las trazas de TCA presentes aún en las diluciones empleadas comprendidas entre 1/400 a 1/600 v/v. Los resultados obtenidos para la concentración de azúcar en el suero liofilizado en cada caso fueron:

- ◆ Medido en sobrenadante TCA: 53,84 % p/p (DS = 2,38)
- ◆ Medido en liofilizado disuelto en agua destilada 54,57 % p/p (DS = 2,86)

Se ve que las diferencias obtenidas no son significativas dado los valores de desviación estándar de cada medida. De modo que son mayores las diferencias debidas a errores experimentales que a la presencia de TCA remanente, el cual no afectaría al menos en las diluciones y condiciones empleadas. Sin embargo, hay diferencias entre los resultados hallados por el método de Antrona y el de Dubois dosando este último un 15% más; debiéndose esto a que en el primero de los métodos, en particular en las condiciones empleadas, se torna bastante específico para las hexosas, en tanto que el segundo mide además pentosas (que constituyen los oligosacáridos y polisacáridos solubles de la soja) y sus derivados, incluyendo los metil éteres, como puede observarse en la Figura 16.

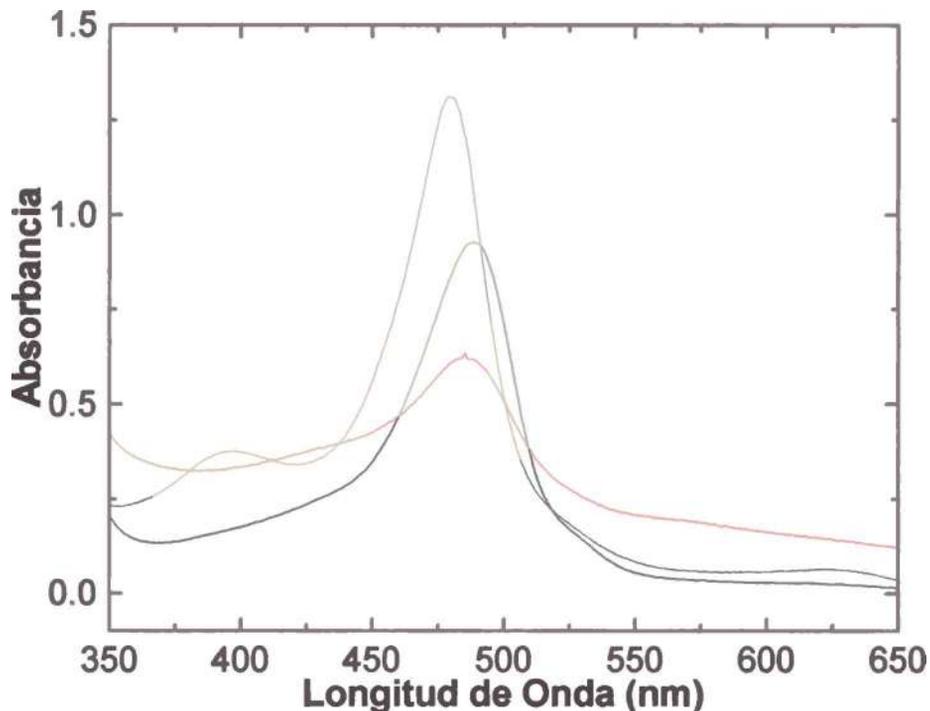


Figura 16: Espectro de absorción en función de longitudes de onda de colorimetría de Dubois para distintos azúcares. (—): Solución acuosa de xilosa patrón (pentosa), 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con su característico máximo a 480 nm; (—): Solución acuosa de glucosa patrón (hexosa), 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con su característico máximo a 490 nm; (—) Dilución 1/400 del sobrenadante TCA del suero de soja, como se detalló en 2.4.2, el cual tiene una concentración de azúcares medida por

Dubois de 18,23 mg/ml (DS=1,21) y de 16,61 mg/ml (DS=0,52) por Antrona. En esta curva el máximo está ubicado a 485 nm, eso sumado a la forma de “campana ensanchada” es indicativo que la curva es una contribución de hexosas y pentosas presentes en la muestra y da cuenta de las diferencias halladas entre Dubois y Antrona.

3.3.2 Cromatografía de azúcares presentes en el suero de soja liofilizado

Este estudio se llevó a cabo como se detalló en la sección 2.10 de Materiales y Métodos; empleando como referencia soluciones acuosas de los patrones de azúcares disponibles incluyendo sacarosa así como representantes de monosacáridos de cinco y seis carbonos. No fueron incluidos los oligosacáridos típicos de soja como patrones debido a la dificultad en adquirirlos por su elevado costo.

La composición típica en hidratos de carbono presente en harinas y pellets de soja en % en base seca (Tabla 3) revela que el 50% de los HC son insolubles (celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina, y otros hidratos de carbono complejos), en tanto que entre los solubles típicamente hallados en la soja que serán los que se espera encontrar en el suero preparado podemos mencionar:

- ◆ Sacarosa (5,7% base seca), disacárido (glu-fru).
- ◆ Melibiosa, disacárido (glu-gal).
- ◆ Rafinosa (4,1% base seca) trisacárido (gal-glu-fru).
- ◆ Estaquiosa (4,5% base seca) tetrasacárido (gal-gal-glu-fru).
- ◆ Verbascosa (trazas) pentasacárido (gal-gal-gal-glu-fru).
- ◆ Glucosa (trazas).

Las placas de TLC reveladas son las mostradas en las Figuras 17 y 18. Las muestras sembradas en la placa de TLC1 corresponden de izquierda a derecha a: glucosa, sacarosa, liofilizado, galactosa, xilosa y arabinosa. En tanto que para la TLC2, siguiendo el mismo orden las muestras sembradas fueron: glucosa, sacarosa, liofilizado, lactosa, sorbosa y xilosa.



Figura 17 (TLC 1)



Figura 18 (TLC 2)

En ambas placas se sembró sacarosa por se el azúcar soluble más abundante y glucosa porque si bien es cierto que solo esta presente en forma de trazas puede generarse por hidrólisis de los otros azúcares presentes. El análisis densitográfico de las placas de TLC generaron los gráficos mostrados en las Figuras 19 y 20; en éstos se puede notar un pequeño pico indicado como (*) que corresponde el frente del solvente.

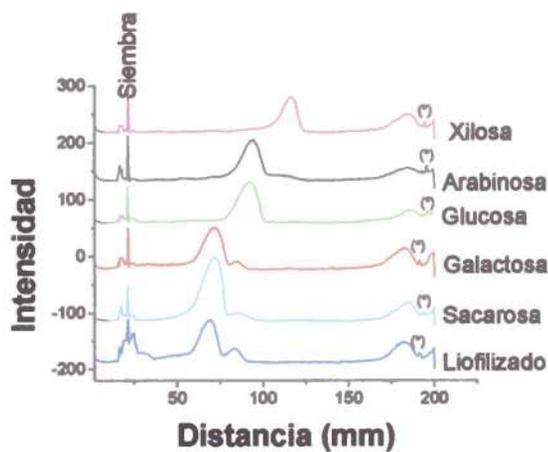


Figura 19 (TLC 1)

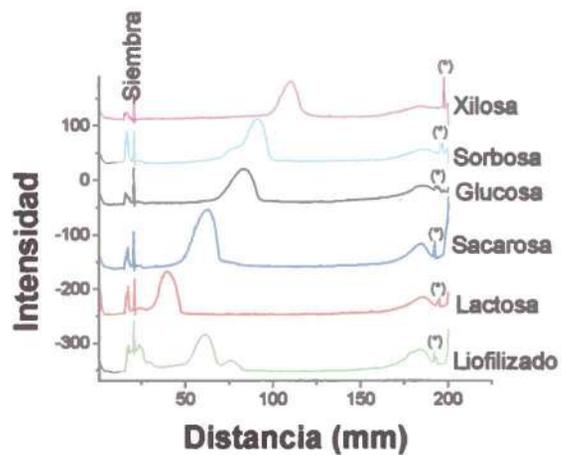


Figura 20 (TLC 2)

Los pares de Figuras 17-18 y 19-20 corresponden a las imágenes de las TLC reveladas y los densitogramas obtenidos respectivamente. Las soluciones sembradas tienen una concentración de 0,5% p/v para los azúcares patrones y 1% para SSL. El análisis de las TLC reveló los azúcares contenidos en la muestra problema fueron lo que menos distancia migraron, seguido en orden creciente de distancia recorrida por glucosa (hexosa) y luego por la xilosa (pentosa).

El suero de soja liofilizado se resuelve en dos manchas que tienen una relación de intensidad de 6:1. En la Tabla 15 se puede ver que la primera fracción más abundante es la fracción glucídica con Rf de $37,3 \pm 2,1$, la cual podría corresponder a la sacarosa presente, en tanto que los oligosacáridos rafinosa y estaquiosa serían los que probablemente migran juntos y se ubican en una banda minoritaria con Rf de $46,4 \pm 2,4$.

Tabla 15: Resultados obtenidos a partir de los densitogramas de TLC. El frente del solvente al final del ensayo tuvo mínimas diferencias (entre 3 y 7 mm en los 200 mm correspondientes a lo largo de la placa), que fueron consideradas para los cálculos de los Rf.

Elemento considerado	Distancia migrada (mm)							
	TLC-1				TLC-2			
Frente del solvente	170-175		Rf*100		171-175		Rf*100	
Glucosa	90		51,4		82		46,9	
Sacarosa	70		40,5		62		36,2	
Liofilizado	67	83	39,4	48,8	60	75	35,1	43,9
Xilosa	115		65,7		107		60,4	
Galactosa	70		41,2		---		---	
Arabinosa	93		53,1		---		---	
Lactosa	---		---		40		22,9	
Sorbosa	---		---		89		50,9	

3.4 Conjunto de resultados obtenidos en el suero de soja líquido y liofilizado

Los resultados del análisis de la composición de suero de soja líquido y liofilizado se muestran en la Tabla 16. Un análisis comparativo entre ambos reveló una composición

equivalente si se expresa en peso seco, lo que indica, como es esperable, la ausencia de modificaciones en el contenido relativo de los componentes del suero de soja durante el proceso de liofilización.

Ya hemos determinado que el producto liofilizado es 34 veces más concentrado que el producto líquido y que se mantiene el contenido relativo de los componentes en el producto líquido y deshidratado. Como resultado experimental, a partir de aproximadamente 1,6 l de suero de soja se obtuvieron alrededor de 40 g de liofilizado.

Tabla 16: Composición de sueros de soja líquido (SS) y suero de soja liofilizado (SSL). Los resultados están expresados en % p/p. H: hexosas; GT: glúcidos totales, hexosas y pentosas.

	Proteínas		Glúcidos		Cenizas	Extracto seco
	Real	Total	H	GT		
SSL	10,73 ± 0,09	17,60 ± 0,03	47,44 ± 1,49	54,57 ± 2,86	13,4 ± 0,30	100
SS	0,47 ± 0,05	0,53 ± 0,01	---	1,60 ± 0,09	---	3,28 ± 0,18

En base a los datos de la Tabla 16 se debió haber obtenido entre 47 y 48 g de SSL considerando los glúcidos totales o la proteína total, respectivamente. Esto indica que el rendimiento global de la operación fue cercano al 85%. Si se considera que la liofilización de 1600 ml fue realizada en 19 bandejas plásticas en espesores no mayores a 5 mm, esta diferencia se corresponde a una pérdida de materia inferior a 0,4 g/bandeja.

Por otra parte, puede verse que el extracto seco del producto líquido fue 32,77 mg/ml, de los cuales 16,01 mg/ml corresponden a HC y 5,28 mg/ml a proteínas medidos por los métodos de Dubois y Kjeldahl, respectivamente. La diferencia, 11,48 mg/ml, corresponden a los minerales, sales y demás compuestos provenientes de la harina desgrasada o agregados para su obtención.

4. COMPORTAMIENTO TÉRMICO DE SUERO DE SOJA LIOFILIZADO. ESTUDIO POR CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

Empleando las técnicas y cuidados descritos en la sección 2.2.3, necesarias para minimizar la hidratación del SSL, se llevó a cabo el estudio por DSC de muestras de suero de soja liofilizado. El análisis de los correspondientes termogramas permite identificar diferentes regiones, las cuales se correlacionan con los cambios sufridos por la muestra durante el calentamiento. Estos estudios fueron realizados con muestras de suero liofilizado fresco y sometidas a diferentes tiempos de almacenamiento a una temperatura de -80°C , cuyos resultados pueden verse en la Figura 21.

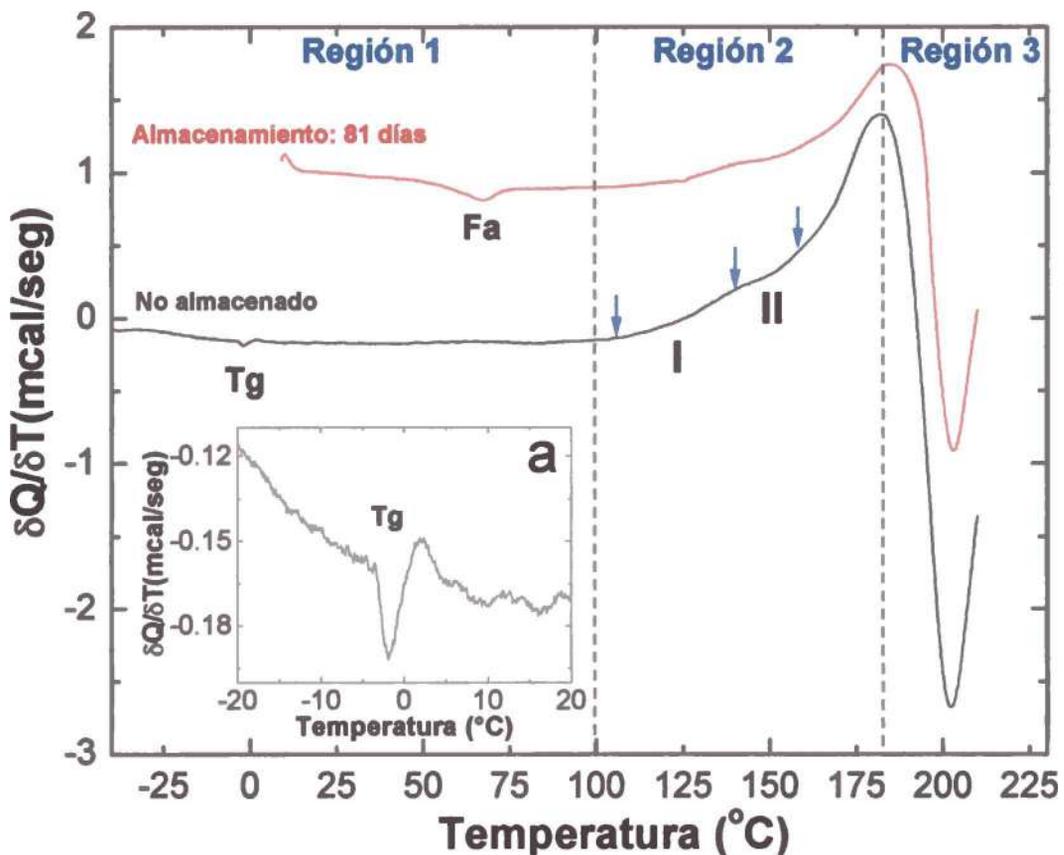


Figura 21: Termogramas DSC de SSL en condiciones anhidras. Se utilizó una velocidad de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y una cápsula cerrada vacía como referencia. (—): SSL no almacenado (9,42 mg SSL/cápsula); el estudio desde temperaturas más bajas permite visualizar la temperatura de transición vítrea (T_g), la cual se observa mejor en el inserto “a”. Las flechas indican el inicio y finalización de las subtransiciones (I) y (II) correspondientes a desnaturalización proteica. (—)

SSL almacenado 81 días a -80°C ($m=7,62$ mg/cápsula), se evidencia la aparición de una transición (Fa) correspondiente a la fusión de cristales de azúcares.

Los termogramas obtenidos pueden ser divididos en regiones delimitadas por intervalos de temperatura, de esta forma tendremos tres regiones: *de baja temperatura* ($T < 100^{\circ}\text{C}$), *de temperatura intermedia* ($100 < T < 180^{\circ}\text{C}$) y *de alta temperatura* ($T > 180^{\circ}\text{C}$). En la región de baja temperatura hallamos una transición de 2^{do} orden correspondiente a la transición vítrea (T_g) cercana a 0°C ; transición que se observa mejor en la Figura 21a que amplifica la zona cercana a 0°C . En el termograma de SSL almacenado a -80°C se registró una transición endotérmica (denominada Fa) a 66°C correspondiente a la fusión de azúcares cristalizados durante el almacenamiento. Esta transición comienza a aparecer a 54 días de almacenamiento a -80°C , y evoluciona incrementando tanto su entalpía como su T_p (temperatura de pico) en la medida que el almacenamiento y consecuentemente la cristalización (y recristalización) de azúcares se prolonga.

En la región de *temperatura intermedia* se hallaron inflexiones con T_p de 124 y 148°C , correspondientes a la desnaturalización de las principales fracciones proteicas presentes en el SSL; dichas transiciones corresponden a lectina y factor antitriptico de Kunitz respectivamente. Estas inflexiones están presentes tanto en termogramas de SSL con y sin almacenamiento y se ubican a temperaturas inusualmente altas (en comparación con los valores normalmente hallados en literatura para la desnaturalización de estas proteínas, $70-90^{\circ}\text{C}$). Esta diferencia se debe al hecho que la calorimetría se realiza sobre muestra en estado liofilizado ($HR \approx 0$, ambiente P_2O_5), lo que ocasiona un corrimiento de las transiciones hacia mayores temperaturas. Simultáneamente, hay un ascenso sostenido del calor liberado (pico exotérmico) entre 100 y 180°C que correspondería a procesos de glicosilación de las proteínas con los azúcares presentes; reacción que es esperable debido a la composición del suero de soja liofilizado (Tabla 16, $17,60\%$ p/p de proteínas y $54,57\%$ p/p de glúcidos) y de las condiciones térmicas empleadas. Finalmente, en la región de *alta temperatura* ($T > 180^{\circ}\text{C}$) se producen fenómenos de descomposición y carbonización.

4.1 Factores que pueden afectar la cristalización y fusión de azúcares en el suero liofilizado

Los estudios del SSL por TLC (sección 3.3.2) revelaron la presencia de sacarosa y glucosa; la primera es el azúcar soluble más abundante en la harina y puede provenir de una posible hidrólisis de estaquiosa y rafinosa, segunda y tercera en abundancia (Tabla 3) y aún de la hidrólisis de trazas de verbascosa; la glucosa si bien es cierto que está presente en trazas en harinas y *pellets* de soja, también puede provenir de la hidrólisis de los sacáridos mencionados, por los diferentes tratamientos practicados luego de la extracción. De estos dos azúcares, la glucosa es reductora, igual que los oligosacáridos estaquiosa y la rafinosa, los cuales están disponibles para interaccionar con las proteínas presentes, en particular durante los tratamientos térmicos. La sacarosa no siendo reductora, igualmente puede reaccionar, dado que a altas temperaturas puede sufrir hidrólisis rindiendo azúcar invertido (glucosa + fructosa). La fusión en los azúcares ocurre cuando éstos son calentados por encima de su temperatura de fusión (T_f), sin embargo en algunos azúcares la fusión se acompaña del fenómeno de caramelización con formación de pigmentos que le dan coloración. La caramelización ocurre especialmente en azúcares con T_f por encima de los 150°C; mientras que tenderán a descomponerse antes de fundir en el caso que la temperatura de fusión esté por encima de los 200°C, y en mayor grado en los reductores.

Estas descomposiciones se observan en el ensayo de DSC (Figura 21) como curvas que sugieren cambios químicos en rangos de temperatura comprendidos entre 200-400°C (Pavlath y Gregorski, 1985). Esto se corresponde con la *región de alta temperatura* ($T > 180^\circ\text{C}$).

Otros factores a considerar son el contenido de agua, que disminuye significativamente las T_f y calores de fusión (ΔH_f) para el caso de los hidratos. Por otra parte las T_f generalmente crecen con el PM siguiendo el orden: Monosacáridos < disacáridos < oligosacáridos. Como ejemplo de las tendencias mencionadas tomemos los valores obtenidos en ensayos de DSC para azúcares puros (Roos, 1993); en ellos la T_f de glucosa (monosacárido) es de 158°C < T_f de sacarosa (disacárido) de 190°C. Mientras que el efecto del agua puede verse en la rafinosa.5H₂O (trisacárido) con una T_f de sólo 80°C. Estas consideraciones son válidas para azúcares puros, cristalizados en una dada forma cristalina, generalmente la forma más común y estable y midiendo cada uno por separado.

En nuestro caso para la obtención del SSL es necesario una congelación previa del SS. En esta etapa la temperatura desciende rápidamente, y con ella la solubilidad de los componentes presentes; en la medida en que se congela el agua, va quedando una solución cada vez más

crioconcentrada lo que favorece la nucleación de azúcares en sus formas hidratadas. Posterior a la congelación la sublimación del hielo elimina casi la totalidad del agua, aunque permanece el agua de monocapa fuertemente ligada a iones, macromoléculas o formando parte de los cristales como en el caso de la rafinosa.5H₂O.

Las formas cristalinas finalmente adoptadas estarán influenciadas no solo por la composición, integrada por una mezcla de componentes (azúcares, proteínas, péptidos y demás componentes mencionados en la sección 3) junto a otros como las sales (propias de la harina más las introducidas en las diferentes etapas de extracción, purificación y ajustes de pH), sino también por su particular historia térmica (congelación, liofilización y almacenamiento) y la presencia de trazas de agua. Estos hechos convierten al SSL en un sistema complejo, de características particulares, y difícil de pronosticar en los cambios que se producirán durante el almacenamiento y el calentamiento. Además de las reacciones de cristalización y fusión de azúcares, se producen reacciones de pardeamiento no enzimático (Maillard, caramelización, con sus características degradaciones, descomposiciones, y etapas de polimerización).

4.2 Efectos del almacenamiento del suero de soja liofilizado sobre su comportamiento térmico

En las experiencias en las que están involucrados tiempos de almacenamiento, el tiempo se comenzó a contar desde el momento en que la muestra pasó a estar liofilizada; la conservación de la misma se realizó a -80°C, retirando según sea necesario las alícuotas correspondientes las cuales fueron conservadas por breves períodos a temperatura ambiente en P₂O₅. Dentro de la región de baja temperatura (T<100°C), hallamos dos transiciones de interés; la T_g y la transición correspondiente a la fusión de azúcares.

4.2.1 Transición vítrea

Dentro de la *región de baja temperatura*, la T_g (en este sistema) se ubica por debajo de 0°C, y corresponde a una transición de 2^{do} orden en la cual la 2^{da} derivada del potencial químico o energía de Gibbs exhibe discontinuidad y puede observarse en un diagrama de DSC en

condiciones de muy baja humedad. No hay un calor latente de cambio de fase pero si una discontinuidad o salto en capacidad calorífica.

El valor de Tg es influenciado, entre otros factores, por el contenido de humedad; en nuestro caso el contenido de humedad de partida fue constante ya que se partió desde un producto liofilizado, sin embargo el almacenamiento en un desecante energético como el P₂O₅ que se pone en equilibrio con una HR cero permite la eliminación de cantidades trazas adicionales de agua. Una serie de estos termogramas pueden verse en la Figura 22 y sus datos correspondientes en la Tabla 17.

Tabla 17: Evolución de la Tg del sistema causada por la eliminación progresiva del agua constitucional (de monocapa) en un almacenamiento a T_{amb.} en P₂O₅ en muestras de SSL

Masa de SSL Dentro de las cápsulas (mg)	Tiempo de almacenamiento a T _{amb.} en P ₂ O ₅ (días)	Tg (sistema) (°C)
5,62	1	- 3,31
16,48	9	- 3,28
10,92	17	- 2,85
18,96	36	- 2,68

Son varios los factores que afectan la Tg; entre ellos podemos mencionar: El peso molecular, que para el caso de azúcares anhidros varía desde valores muy bajos como los que presentan los alditoles (Xilitol; Tg de -23°C) hasta valores altos como los mostrados por los polisacáridos; en general la Tg crece con el PM siguiendo el orden: monosacáridos < disacáridos < oligosacáridos (Slade y Levine, 1991 y 1995; Roos, 1993); como ejemplo la glucosa tiene una Tg de 36°C, mientras que la Tg de sacarosa es de 67°C, en condiciones anhidras medidas por DSC (Roos, 1993). Las diferencias entre los valores reportados para idénticos azúcares pueden atribuirse a diferencias en la pureza de las muestras, presencia de trazas de humedad y metodología empleada para su determinación.

Por lo dicho, la presencia de polímeros como el almidón o la celulosa, así como las proteínas de alta masa molecular, en general tenderán a elevar el valor de la Tg. Otro factor a considerar es el contenido de humedad, sobretodo cuando el sistema presenta una cantidad apreciable de azúcar y la estructura cristalina de la misma es amorfa; teniendo el agua un efecto

plastificante que disminuye el valor de la Tg. Finalmente la composición también afecta el valor de la Tg (los HC constituyen $\approx 55\%$ p/p del SSL); una aproximación a este sistema son los estudios de mezclas binarias de azúcares y sus efectos sobre la Tg (Finegold y col., 1989) que mostraron que la Tg es función de la composición, y que en el caso de tener mezclas binarias de azúcares, la de menor valor de Tg hace bajar la Tg de la mezcla y actúa como un agente plastificante del sistema.

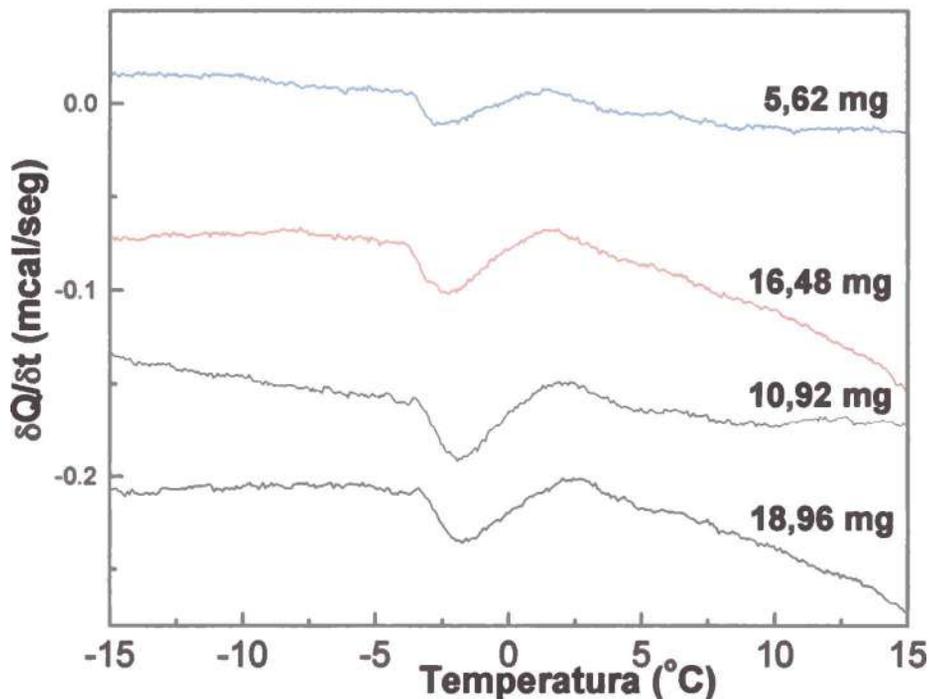


Figura 22: Termogramas de SSL almacenado en P_2O_5 a $T_{amb.}$. Los termogramas están dispuestos de forma tal que el tiempo de almacenamiento aumenta desde la curva superior hacia la inferior; junto a cada curva se indica la masa seca de SSL empleada en cada ensayo. (—): 1 día; (—): 9 días; (—): 17 días y (—): 36 días.

Algunos valores de Tgs hallados en bibliografía (Roos, 1993) determinados por DSC para muestras de azúcares anhidras presentes en suero liofilizado son: Sacarosa (62 y 67°C), Rafinosa (70 y 77°C), Melibiosa (85 y 91°C) y Glucosa (31 y 36°C); la primera y segunda temperatura indicada entre paréntesis corresponden a las temperaturas de *Onset* y *Midpoint* respectivamente. La Tg del SSL se encuentra ubicado un poco por debajo de 0°C; este valor es el resultado tanto de la composición global del sistema como del estado de hidratación.

Ya se determinó (Tabla 16) que el SSL posee en su composición moléculas de bajo PM que pueden contribuir al descenso del valor de la Tg, como sales, aminoácidos y péptidos. La presencia de estos últimos quedó demostrada por el material nitrogenado de bajo PM no precipitable con TCA que explica las diferencias entre proteína total o bruta y proteína real y también las diferencias entre los valores obtenidos por Kjeldahl y las proteínas efectivamente precipitadas y recuperadas empleando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y acetona en frío.

Con relación al estado de hidratación, sabemos que del SSL aún puede eliminarse humedad, esto se comprueba al llenar las cápsulas de DSC pesarlas destapadas y repetir la pesada luego de 5 días en una atmósfera de P_2O_5 ; período luego del cual también se advierte una desaglomeración del liofilizado. Esta eliminación de trazas de humedad con su correspondiente efecto plastificante puede cuantificarse por el incremento en la Tg con el almacenamiento desde $-3,31^\circ\text{C}$ en el día 1 hasta los $-2,68^\circ\text{C}$ hallados luego de 36 días de almacenamiento en desecante. Por esta razón el SSL a T_{amb} . se encontrará por encima del valor de la Tg del sistema, es decir en estado gomoso, por lo que tenderá a desestabilizarse mediante la formación de cristales de azúcares.

4.2.2 Fusión de azúcares

Dentro la *región de baja temperatura* hay otra zona de interés ubicada entre $50\text{-}100^\circ\text{C}$ en donde aparece, como consecuencia del almacenamiento a -80°C , una transición correspondiente a la fusión de cristales de azúcares. Una serie de estos termogramas puede verse en la Figura 23 junto a sus correspondientes datos en la Tabla 18. Como se explicó anteriormente en la Figura 21, esta transición no se manifiesta en SSL no almacenado mientras que luego de 81 días es evidente su presencia; ahora podemos precisar su aparición en torno a los 54 días de almacenamiento y determinar que el almacenamiento produce un incremento en la definición de la transición, aumenta el tamaño del pico y sube su Tp en más de 10°C .

La falta de una transición detectable para tiempos de almacenamientos inferiores a 54 días indican que el fenómeno de cristalización (y posible recristalización) de azúcares se ve frenado tanto por la matriz liofilizada en que se encuentran los componentes que pueden formar cristales como por la baja temperatura de almacenamiento (-80°C), que disminuye la movilidad molecular.

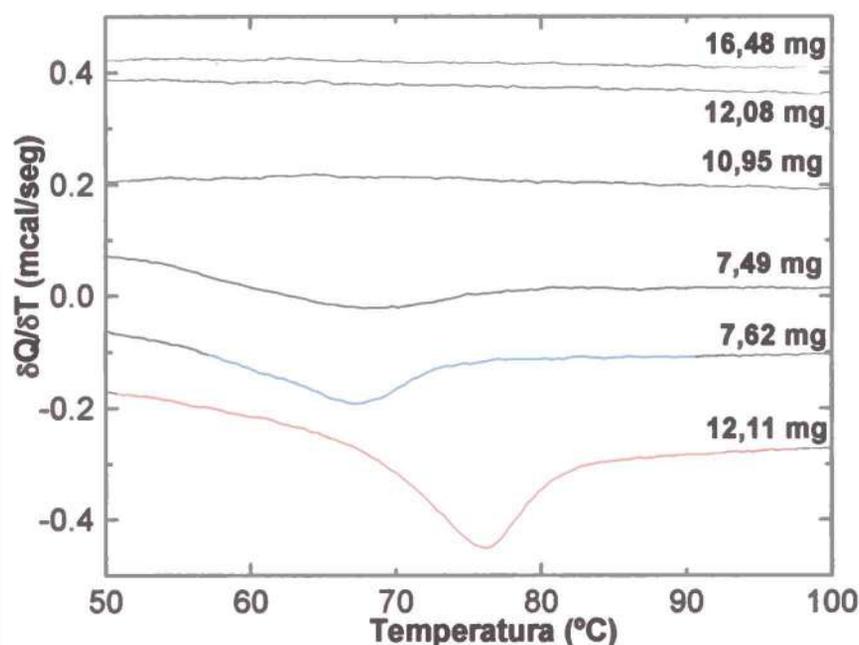


Figura 23: Termogramas de SSL almacenado a -80°C . Los termogramas están dispuestos de forma tal que el tiempo de almacenamiento aumenta desde la curva superior hacia la inferior; junto a cada curva se indica la masa seca de SSL dentro de cada cápsula. (—): 9 días; (---): 22 días; (—): 32 días; (—): 54 días; (—): 81 días y (—): 271 días.

Tabla 18: Datos correspondientes a los termogramas mostrados en la Figura 23.

Identificación De la curva	Tiempo de Almacenaje (días)	Masa de SSL dentro de las cápsulas (mg)	T_p (Midpoint) ($^{\circ}\text{C}$)	Entalpia (J/g de SSL)
(—)	9	16,48	---	---
(---)	22	12,08	---	---
(—)	32	10,95	---	---
(—)	54	7,49	66,66	7,40
(—)	81	7,62	67,11	7,95
(—)	271	12,11	76,85	9,95

Por otra parte, cuando la cristalización ha tenido lugar, el incremento tanto en la T_p como en los valores de entalpia indican un fenómeno de recristalización, en la cual los cristales grandes crecen a expensas de los más pequeños.

Para los principales glúcidos presentes en SSL los valores bibliográficos (Roos, 1993) correspondientes a las T_f (temperaturas de fusión) y ΔH_f (calor latente de fusión) son los siguientes D-glucosa ($143 < T_f < 158^\circ\text{C}$; $\Delta H_f = 179 \text{ J/g}$); sacarosa ($173 < T_f < 190^\circ\text{C}$; $\Delta H_f = 118 \text{ J/g}$); rafinosa.5H₂O ($76 < T_f < 80^\circ\text{C}$; $\Delta H_f = 138 \text{ J/g}$). Para el caso de las T_f el primero valor corresponde a la temperatura de *onset* y la segunda a la *Tpico*.

Ya se determinó (Sección 3.3.2) que en los azúcares del SSL ($\approx 55\%$ p/p) la relación sacarosa a oligosacáridos es de 6:1; de manera similar a lo ocurrido con los valores de la T_g , tanto las T_f como las entalpías (J/g) halladas son menores a las predichas a partir de datos bibliográficos. La entalpía hipotética de una mezcla ideal constituida por un 50% p/p de un material inerte y otro 50% p/p de una mezcla sacarosa a estaquiosa-rafinosa en relación (85:15) sería de unos 60 J/g de mezcla total aproximadamente. Este valor es sensiblemente superior a los 9,95 J/g de liofilizado alcanzado luego de 271 días de almacenamiento. Las diferencias halladas pueden atribuirse a:

*El 50% p/p del liofilizado no sólo está integrado por sacarosa y oligosacáridos típicamente presentes en la soja sino que hay presentes otros azúcares complejos algunos de ellos parcialmente hidrolizados.

*El 50% p/p del liofilizado no es una matriz inerte sino que está compuesta por macromoléculas como las proteínas (algunas con actividad biológica), péptidos, aminoácidos, sales y otros componentes, muchos de ellos en cantidades trazas.

*No todos los azúcares presentes están disponibles para recristalizar sino que muchos de ellos se hallan comprometidos en la formación de compuestos glicosilados, o simplemente porque tienen poca tendencia a cristalizar.

*El liofilizado no está completamente deshidratado, hecho que ya hemos comprobado por el aumento de la T_g , por almacenamiento en P₂O₅, humedad que permanece luego de la liofilización como agua constitucional fuertemente ligada especialmente a iones y macromoléculas y formando parte de los cristales de azúcares como en el caso de la rafinosa.5H₂O.

Los estudios realizados en DSC (Roos, 1993) empleando azúcares muestran que tanto la temperatura de fusión como las entalpías puestas en juego decrecen significativamente con la presencia de agua y que la integración de las endotermas de fusión puede ser usada para obtener

los ΔH_f . De esta manera estas mínimas cantidades de agua constitucional presentes en el liofilizado sumado a la complejidad del sistema son las responsables de los valores hallados.

Los tiempos involucrados, tanto en la aparición de la transición (50 días), como en la posterior definición y aumento en la temperatura de fusión evidencian una pobre tendencia tanto a la formación de cristales como a su posterior recristalización. Entre las posibles explicaciones para este fenómeno puede mencionarse, la alta energía para la formación de los núcleos cristalinos, los que por crecimiento darán los cristales que luego vemos fundirse en el DSC y una baja movilidad molecular por las condiciones de almacenamiento (-80°C) lo que mantiene el estado vítreo ($T < T_g$) y limita en gran medida la recristalización.

Los cambios hallados en los termogramas a lo largo del tiempo nos indican que es lo que sucede con el almacenamiento. El área de una dada transición es proporcional tanto a la masa como a la entalpía o calor puesto en juego en un cambio de estado dado; como las entalpías están expresadas en las mismas unidades (por g de liofilizado) un incremento en la entalpía se corresponde con un aumento en la cantidad de cristales que se están fundiendo. Por otra parte la temperatura en la que ocurre una transición se relaciona con el tipo de proceso analizado, como la transición analizada corresponde a un mismo proceso, un aumento en la temperatura se interpreta como un aumento en la estabilidad de los cristales formados, hecho que se corresponde con el fenómeno de recristalización en donde los cristales grandes crecen a expensas de los más pequeños.

4.2.3 Desnaturalización de proteínas

El SSL fue almacenado a temperaturas de -80°C a fin de minimizar las alteraciones que este pudiera sufrir, retirándose progresivamente las alícuotas necesarias para conducir los diferentes ensayos. Pese a las condiciones de almacenamiento empleadas y demás precauciones tomadas el liofilizado sufre inevitablemente, alteraciones como la recristalización de los azúcares presentes analizada en la sección anterior. Veremos ahora el efecto del almacenamiento sobre las principales fracciones proteicas presentes en el suero.

En trabajos anteriores (Sorgentini y Wagner, 1999), se aislando las proteínas presentes en el suero de soja con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; las fracciones proteicas más importantes identificadas fueron las correspondientes al factor antitriptico de Kunitz y a la lectina. Los estudios en DSC de estas

proteínas en soluciones acuosas al 20% p/p dieron endotermas con valores de T_p de $74,4^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ y $90,4^\circ\text{C} \pm 0,8^\circ\text{C}$, respectivamente, con un valor de ΔH_d total de $10,8 \text{ J/g} \pm 1,2 \text{ J/g}$. Estas transiciones en los termogramas de SSL analizado en condiciones anhidras se evidencian como subtransiciones (denominadas I y II en la Figura 21) dentro de la zona llamada *región de temperatura intermedia* ($100 < T < 180^\circ\text{C}$) en la cual simultáneamente se produce la glicosilación de las proteínas, lo que se expresa como un importante pico exotérmico.

Una serie de estos termogramas con diferentes tiempos de almacenamiento puede verse en la Figura 24 y los datos correspondientes se muestra en la Tabla 19. La realización de ensayos de DSC sobre muestras similares pero almacenadas por diferentes tiempos, se hizo con un doble propósito, por un lado analizar la existencia de variaciones en los termogramas con el almacenamiento, y por otro la de obtener muestra tratada térmicamente para diferentes ensayos.

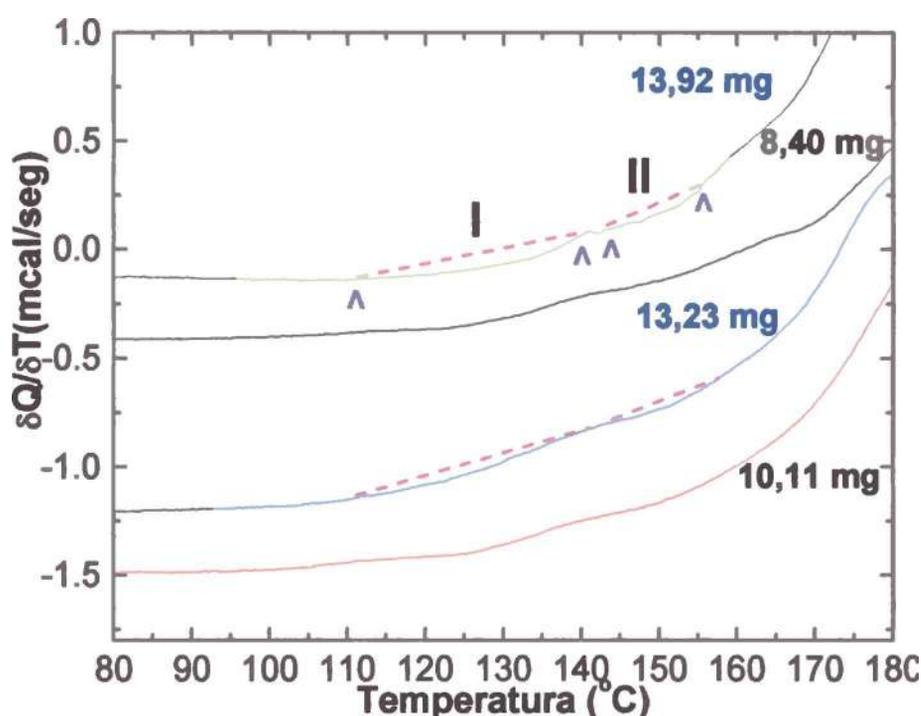


Figura 24: Termogramas de SSL almacenado a -80°C . Los termogramas están dispuestos de forma tal que el tiempo de almacenamiento aumenta desde la curva superior hacia la inferior; junto a cada curva se indica la masa seca de SSL dentro de cada cápsula; los tiempos de almacenamiento son los siguientes: (—): 0-22 días; (—): 66 días; (—): 81 días y (—) 121 días. Para el termograma con menor tiempo de almacenamiento se agregan símbolos “Λ” que

indican los límites de las transiciones y líneas de puntos para facilitar la visualización y comparación de las mismas.

Una comparación visual en la Figura 24 entre los termogramas con 22 y 81 días de almacenamiento (de masas casi idénticas) revela que el almacenamiento suaviza las curvas de los termogramas, reduciendo consecuentemente los valores entálpicos obtenidos. El análisis de los datos de la Tabla 19 indica una disminución en los valores hallados para las entalpías para ambas transiciones cuando el tiempo de almacenamiento se incrementa. Las respectivas T_p son proporcionales a la estabilidad de la fracción que se está desnaturalizando en el ensayo. Las entalpías para tiempos de almacenamiento comprendidos entre 0 y 22 días fueron 1,40 y 0,67 J/g de SSL para las transiciones con T_p de 124,2 (I) y 147,6°C (II) respectivamente.

Tabla 19: Datos correspondientes a SSL almacenado a -80°C analizado en DSC en condiciones anhidras, dando los termogramas mostrados en la Figura 24. El % de desnaturalización fue calculado como $[100 \cdot (\Delta H_0 - \Delta H) / \Delta H_0]$.

Tiempo de almacenamiento -80°C (Días)	Pico	Rango de la transición ($^{\circ}\text{C}$)	T_p (midpoint) ($^{\circ}\text{C}$)	Entalpía (J/g SSL)	Desnaturalización (%)
0-22	I	110,6-137,7	$124,2 \pm 1,3$	$1,40 \pm 0,04$	0
	II	143,5-154,6	$147,6 \pm 0,9$	$0,67 \pm 0,08$	0
66	I	111,2-131,1	$123,9 \pm 0,8$	$1,34 \pm 0,05$	4,3
	II	143,4-155,1	$149,3 \pm 1,4$	$0,64 \pm 0,02$	4,5
81	I	110,6-129,8	$123,0 \pm 1,8$	$1,20 \pm 0,04$	14,3
	II	143,7-155,3	$150,0 \pm 0,6$	$0,58 \pm 0,03$	13,4
121	I	110,5-130,2	$123,0 \pm 1,8$	$1,10 \pm 0,06$	21,4
	II	143,3-155,5	$149,8 \pm 1,1$	$0,55 \pm 0,01$	17,9

Si consideramos que el 17.6% p/p del SSL es proteína la entalpía extrapolada a proteína pura es de 7,95 y 3,81 J/g de proteína pura. La entalpía total del sistema (11,76 J/g de proteína) resulta ligeramente mayor (8,9%) al valor publicado $10,8 \pm 1,2$ J/g de proteínas (Sorgentini y Wagner, 1999). Esta diferencia puede explicarse porque estas proteínas no fueron aisladas y,

como se mencionó la liofilización en presencia de azúcares resulta menos desnaturizante debido al efecto crioprotector de los azúcares presentes en el SSL ($\approx 55\%$ p/p).

Si analizamos el comportamiento de ambas subtransiciones identificadas empleando la relación $[100 * (\Delta H_0 - \Delta H) / \Delta H_0]$ para calcular el % de desnaturización (referencia SSL no almacenado), podemos cuantificar los cambios debido al almacenamiento. Los valores mostrados en la Tabla 19 indican que ambas transiciones se ven afectadas de manera similar con el almacenamiento. Una simple regresión por mínimos cuadrados ($r=0,95$) de los datos indica (asumiendo una relación lineal entre % de desnaturización y almacenamiento) que sería necesario un almacenamiento superior a 515 días para alcanzar un % de desnaturización del 100% para ambas transiciones.

Estos resultados indican que el SSL, conservado a temperaturas de -80°C , y protegido de la luz sufre cambios como la recristalización de azúcares y también la desnaturización de proteínas, ambos fenómenos posiblemente relacionados.

Cabe aclarar que a diferencia de los valores publicados (Sorgentini y Wagner, 1999) correspondientes a proteínas de suero de soja aisladas y analizadas en DSC en dispersiones acuosas al 20% p/p, los datos presentados en este apartado fueron calculadas a partir de termogramas de SSL con un 17,60 % p/p de proteína, analizados en condiciones anhidras, razón por la cual solo obtengo información proveniente de los componentes más abundante. Se vio que los datos obtenidos a partir de termogramas de dispersiones acuosas al 30% p/p de SSL dan valores que se asemejan más a los publicados, son más fáciles de visualizar, y proveen nueva información con relación a la cinética de deterioro y la identidad de los factores más afectados durante el almacenamiento.

Los termogramas de dispersiones acuosas (30% p/p) de SSL se muestran en la Figura 25 y sus datos en la Tabla 20.

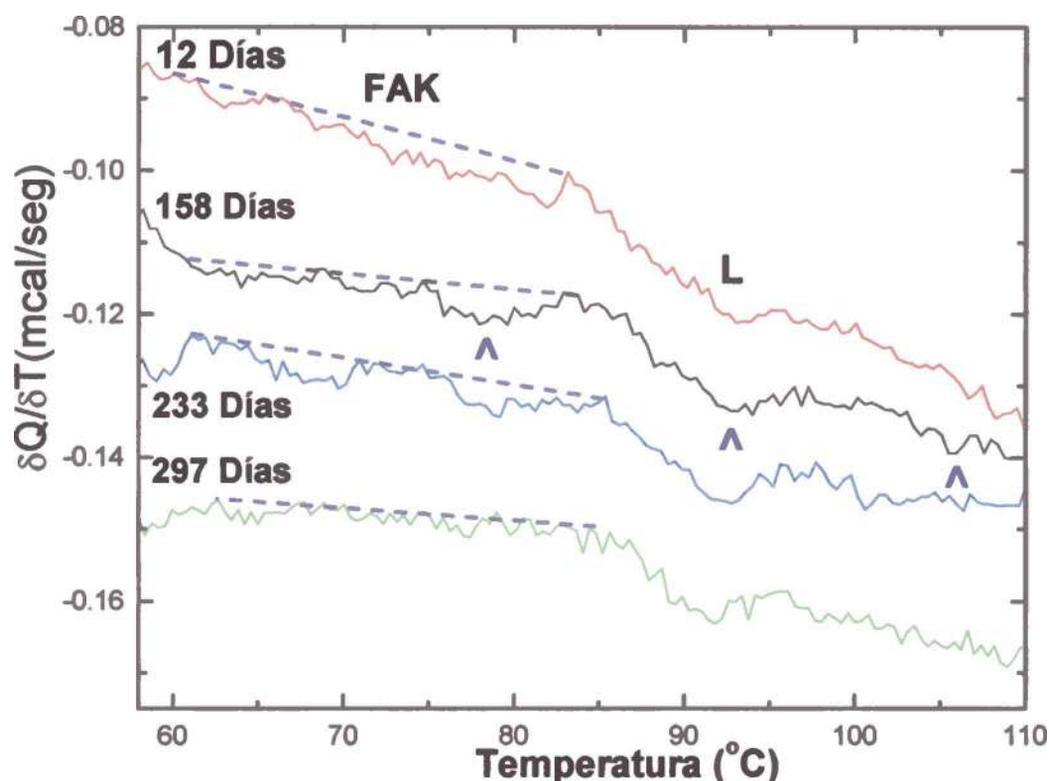


Figura 25: Termogramas de dispersiones acuosas (30% p/p) de SSL almacenado a -80°C por los periodos que se indican antes de realizar la hidratación; los termogramas estar dispuestos de forma tal que el tiempo de almacenamiento aumenta desde la curva superior hacia la inferior FAK: Factor antitriptico de Kunitz; L: subunidades de Lectina. Las masas de SSL dentro de cada capsula son los siguientes: (—): 3,87 mg; (—): 5,21 mg; (—): 4,73 y (—): 4,64.

De manera similar a lo visto en condiciones anhidras, el SSL se resuelve en dos transiciones importantes que corresponderían según los datos bibliográficos, la primer transición con T_p $81,9^{\circ}\text{C} \pm 0,7$ al factor antitriptico de Kunitz (FAK) y la segunda a mayor temperatura (T_p $93,0^{\circ}\text{C} \pm 1,3$) a la lectina (L). Estos valores resultan cercanos a los determinados por otros autores (Sorgentini y Wagner, 1999) por DSC para dispersiones acuosas de proteínas de suero de soja aisladas, T_p (FAK) $74,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y T_p (L) $90,4 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$. El desplazamiento de las transiciones hacia temperaturas mayores en nuestro caso se debe fundamentalmente al alto contenido de glúcidos en SSL ($\approx 55\%$ p/p) y sales que producen una estabilización térmica de las proteínas de suero. La presencia de agua hace posible además identificar transiciones minoritarias con T_p de $108,0 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$ y $122,2 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ que podrían corresponder a la desnaturalización de fracciones de

alta estabilidad térmica presentes en el suero como es el factor antitriptico de Bowman-Birk (FABB), factor que es más estable al calor debido a su bajo PM (8 kDa) y contener en su estructura 7 puentes di sulfuro que lo estabilizan. La T_p obtenida para FABB (Sigma) en dispersiones acuosas (30% p/p) fue $128,8 \pm 1,2^\circ\text{C}$.

Tabla 20: Datos correspondientes a los termogramas mostrados en la Figura 25. Se analiza los efectos ocasionados por el almacenaje a -80°C sobre las principales fracciones proteicas presentes en el SSL analizadas en DSC en dispersiones acuosa al 30% p/p. FAK: Factor antitriptico de Kunitz; L: Lectina. El % de desnaturalización fue calculado como $[100 \cdot (\Delta H_0 - \Delta H) / \Delta H_0]$.

Tiempo de almacenamiento a -80°C (Días)	Pico	Rango de la transición ($^\circ\text{C}$)	$T_p(\text{midpoint})$ ($^\circ\text{C}$)	Entalpía (J/g de proteína)	Desnaturalización (%)
0-12	FAK	58,5-83,2	$81,93 \pm 0,73$	$5,10 \pm 0,11$	0
	L	83,2-105,0	$93,05 \pm 1,26$	$6,31 \pm 0,18$	0
158	FAK	59,9-83,5	$77,31 \pm 0,66$	$3,56 \pm 0,08$	30,2
	L	83,5-106,6	$92,48 \pm 0,28$	$4,44 \pm 0,07$	29,6
233	FAK	58,2-84,5	$79,58 \pm 0,56$	$2,95 \pm 0,16$	42,2
	L	84,5-104,5	$91,51 \pm 0,34$	$4,12 \pm 0,11$	34,7
297	FAK	63,2-84,2	$78,87 \pm 1,43$	$1,46 \pm 0,29$	71,4
	L	84,3-101,9	$91,36 \pm 0,47$	$3,25 \pm 0,01$	48,5

La entalpía total del SSL en presencia de agua (11,41 J/g de proteína seca) produce un valor más cercano al de proteínas aisladas pero que aún es ligeramente superior (5,6 %), a los valores publicados, ratificando una estructura más nativa de las proteínas en el SSL que las mismas en estado aislado. Los procesos de precipitación con sales, el desalado por diálisis y la congelación son manipulaciones que afectan en gran medida a las proteínas de suero de soja. Se han informado grados de desnaturalización superiores al 40% al trabajar en forma simultánea con proteínas de suero y globulinas de almacenamiento (Sorgentini y Wagner, 1999). Nuevamente hay que considerar un posible efecto crioprotector debido a los azúcares del SSL (≈ 55 p/p) durante la liofilización.

El grado de desnaturalización calculado para FAK y L durante el almacenamiento confirman los hallazgos obtenidos al realizar el estudio DSC en condiciones anhidras: a) tiempos de almacenamientos a -80°C inferiores a los 150 días afectan de manera similar a ambas fracciones proteicas, b) el almacenamiento prolongado revela un comportamiento diferencial para FAK y L; a 233 y 297 días la desnaturalización es de 42 y 71% para el FAK y de 35 y 48% para L respectivamente.

Estos resultados indican que el factor más termolábil en presencia de agua también es el más afectado durante el almacenamiento en estado liofilizado. Los termogramas obtenidos en presencia de agua, confirman la estabilidad del SSL en las condiciones de almacenamiento. Las regresiones lineales a partir de estos ensayos indican que se requiere entre 450 y 620 días ($r=0,98$) para una desnaturalización total. La presencia de agua, confirma la estabilidad del SSL almacenado en las condiciones utilizadas, indicando una estabilidad superior; las cinéticas de deterioro del SSL pueden verse en la Figura 26.

Si se comparan los comportamientos térmicos en ausencia (Figura 24; Tabla 19) y presencia de agua (Figura 25; Tabla 20), se nota que para SSL con agua la transición entálpicamente mayor (L) se ubica a mayor temperatura, mientras que en condiciones anhidras lo hace a menor temperatura. Este es un indicio que permite inferir que la transición térmica I en estado liofilizado corresponde a la desnaturalización de lectina. A fin de probar esta inversión en las estabilidades térmicas al pasar del estado anhidro al hidratado y determinar fehacientemente la identidad de las transiciones I (rango $111-138^{\circ}\text{C}$; T_p 124°C) y II ($143-155^{\circ}\text{C}$; T_p 148°C), se realizaron estudios DSC en presencia de agua sobre muestras de SSL antes y después de ser sometidos a calentamientos en estado liofilizado.

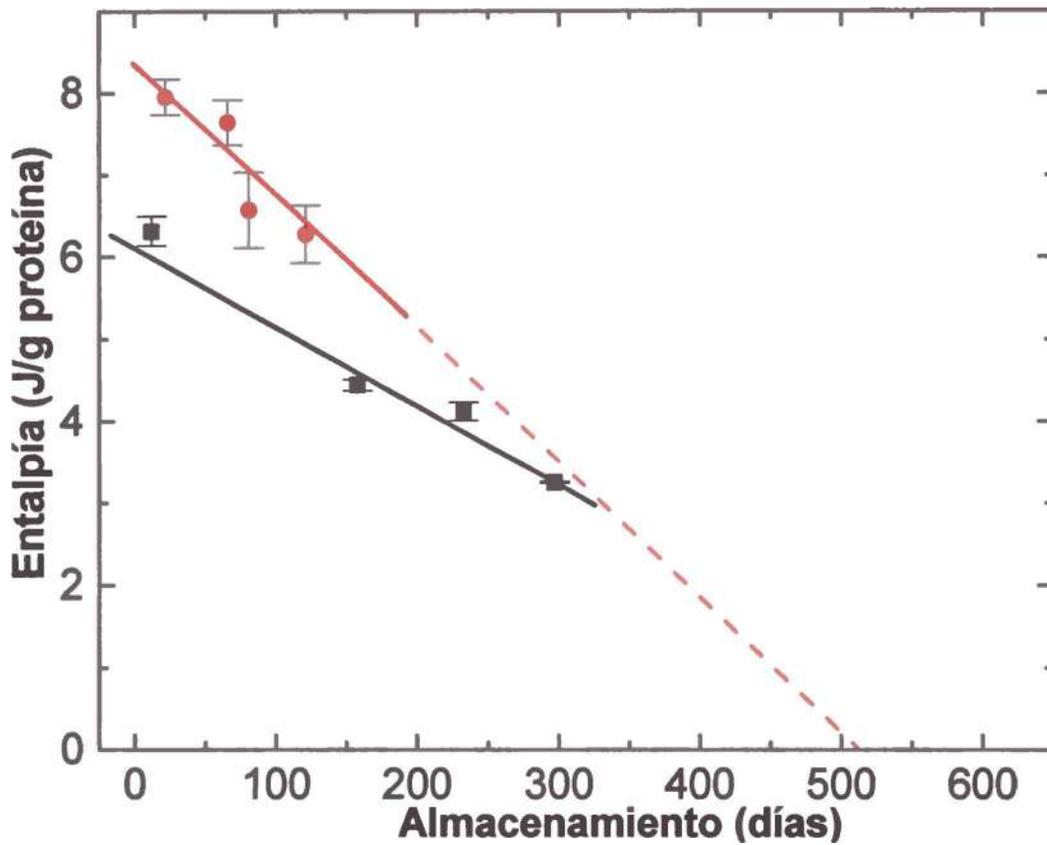


Figura 26: (●): ΔH_d para L (muestra: SSL anhidro, Tabla 19 expresados en J/g de proteína). (■): ΔH_d para L (muestra: dispersión acuosa 30% p/p de SSL, Tabla 20). Los valores experimentales se expresan junto a sus desvíos estándar y las rectas son las calculadas por mínimos cuadrados.

5. SUERO DE SOJA LIOFILIZADO TRATADO TÉRMICAMENTE

El suero de soja liofilizado SSL fue calentado hasta distintas temperaturas finales como fue indicado en Materiales y Métodos (sección 2.7.3). Las temperaturas máximas alcanzadas fueron 90, 120, 130, 140, 150, 180 y 210°C, resultando las muestras SSLC correspondientes (SSLC 90°C a SSLC 210°C).

5.1 Características macroscópicas de SSL y SSLC

El SSL anhidro se presentó como un polvo color arena formado por partículas sueltas. El SSLC tratado térmicamente entre 90-120°C presentó ligera aglomeración e intensificación del color original; entre 130-140°C se formó un caramelo de un color pardo-rojizo que alcanzó su máxima coloración, compactación y pegajosidad entre 150-180°C, temperatura que se corresponde con el máximo de glicosilación; calentamiento superiores a 200°C producen la carbonización del SSL. Simultáneamente el tratamiento térmico disminuyó la solubilidad del SSLC en agua; por esta razón para SSLC con tratamientos térmicos superiores a 150°C se implementó un paso de hidratación *over-night*. Los porcentajes p/p recuperados (referidos a la masa de SSL inicialmente colocada dentro de la cápsula de DSC) fueron cercanos al 90% para tratamientos térmicos por debajo de 140°C, disminuyeron al 80% para 150°C alcanzando el mínimo porcentaje de recuperación para 180°C (máxima de glicosilación y pegajosidad).

5.2 Azúcares en suero de soja liofilizado tratado térmicamente

El análisis de los densitogramas de las TLC de SSLC revela que la cantidad de azúcares libres (\approx área total) disminuye entre 90 y 130°C (Tabla 21). Tratamientos térmicos más intensos (140-150°C) confirman esta disminución en la cantidad de carbohidratos totales, pero además revelan la aparición de una nueva fracción de mayor R_f ($R_f=0,96 \pm 0,01$) la cual puede atribuirse a productos generados por la degradación de Maillard y/o caramelización. Como consecuencia de las reacciones que llevan a la formación de polímeros (agregados proteicos detectados por SDS-PAGE, como se analizará en la sección 5.3), y la generación de productos de degradación los hidratos de carbono originalmente presentes en el SSL disminuyen drásticamente con el

tratamiento térmico (Figura 27). Notar que los productos de degradación, se manifiestan luego de tratamientos térmicos intensos; sin embargo cuando lo hacen involucran el 85,5 y 85,7 % de los carbohidratos detectados por TLC en las muestras de SSL calentado hasta 140 y 150°C, respectivamente.

Tabla 21: Datos obtenidos a partir de los densitogramas de las TLC de suero de soja liofilizado con y sin tratamiento térmico. * corresponde a productos de degradación.

Muestra analizada	R _f especies detectadas	Áreas individuales	Área total
SSL	0,72	16,84	16,84
SSLC (90°C)	0,72	15,60	15,60
SSLC (120°C)	0,71	7,21	7,21
SSLC (130°C)	0,71	3,55	3,55
SSLC (140°C)	0,71 * 0,95	0,41 *2,42	2,83
SSLC (150°C)	0,70 * 0,96	0,14 *0,84	0,98
SSLC (180°C)	---	---	---

Ya hemos analizado que $\approx 55\%$ p/p del SSL esta formado por azúcares; hay presencia de otros componentes (proteínas < 18% p/p) y que estos azúcares son mayoritariamente oligosacáridos. Sin embargo el comportamiento depende de la intensidad del tratamiento térmico aplicado, veremos que luego de tratamientos térmicos a baja temperatura donde se fundieron los cristales presentes, se observa muy poca tendencia a la cristalización, (el SSL calentado hasta 90°C no cristaliza luego del enfriamiento). Sin embargo para tratamientos térmicos más enérgicos ocurren otros fenómenos como la glicosilación de las proteínas presentes; se produce la liberación de agua, hay hidrólisis de oligosacáridos (y polisacáridos solubles presentes en la harina y que fueron extraídos) y descomposición. Esta hidrólisis aumenta la cantidad de azúcares tanto en molaridad como en porcentaje (por cada unión glicosídica rota hay una molécula de agua que se adiciona); finalmente cuando se alcanzan altas temperaturas (140-180°C) hay descomposición.

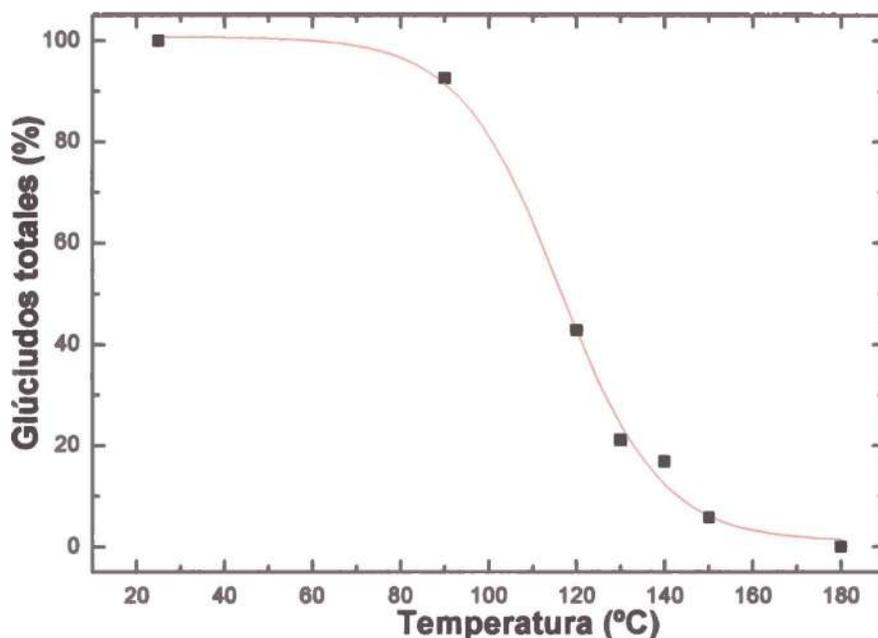


Figura 27: Ajuste a un modelo sigmoideo de la cantidad de azúcares libres (\approx área total) determinados por TLC

5.3 Estado de agregación y glicosilación de las proteínas de SSL y SSLC

En la Figura 28 se puede observar la imagen de un ensayo SDS-PAGE realizado sobre muestras de SSL sin calentamiento y sometido a calentamientos hasta distintas temperaturas finales (90 a 180°C). El suero no calentado presenta dos bandas mayoritarias que corresponden a hemaglutinina (III) y factor antitriptico de Kunitz (IV). Estas especies proteicas disminuyen a partir de un calentamiento a 140°C y a 180°C prácticamente desaparecen como consecuencia de la formación de agregados proteicos de alto PM (bandas que no entran al gel separador).

Para un mejor análisis se realizaron densitogramas de los geles, los cuales se muestran en la Figura 29. Estos estudios permitieron realizar una cuantificación en la disminución de las diferentes bandas (identificadas en SSL no calentado) debido al tratamiento térmico y precisar el orden de las susceptibilidades térmicas de las diferentes especies proteicas al tratamiento térmico.

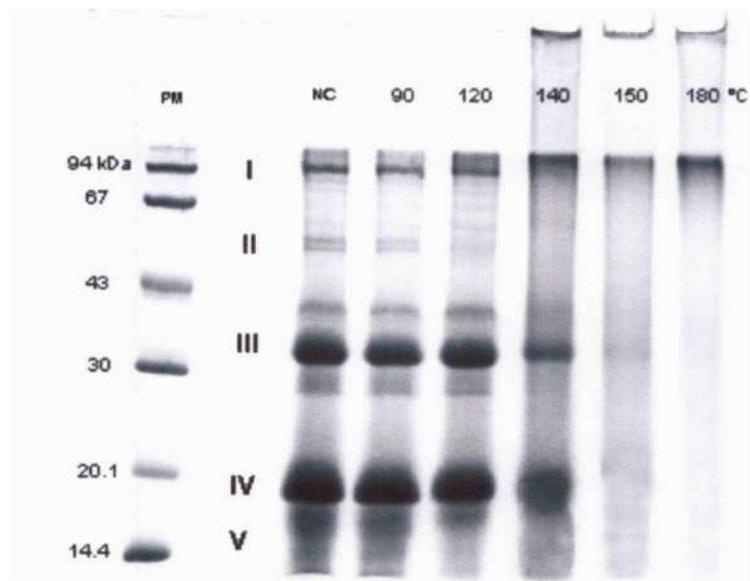


Figura 28: Electroforesis en condiciones disociantes (SDS-PAGE) de muestras de suero de soja liofilizado (SSL) con diferentes calentamientos. NC: suero no calentado. Se indica la temperatura final alcanzada por el SSLC. PM: patrón PM.

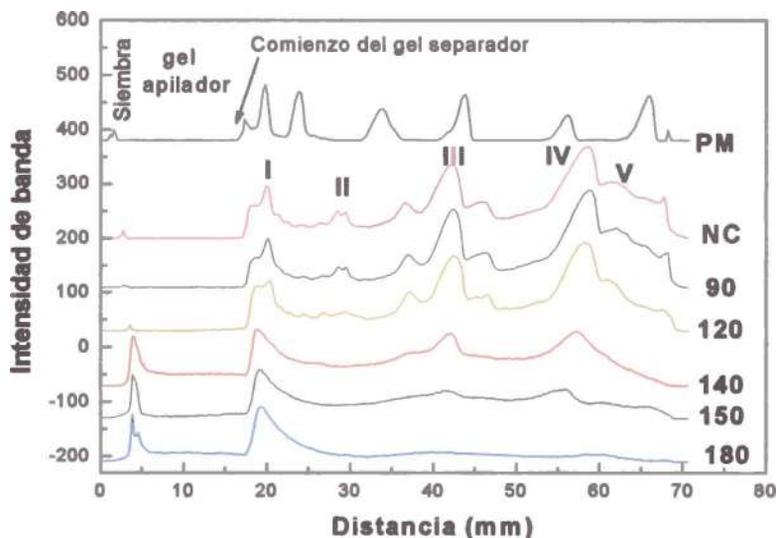


Figura 29: Densitogramas de los perfiles electroforéticos de la Figura 18, en los cuales se grafica la intensidad de las bandas en función de la distancia de migración por las distintas especies proteicas. Las siglas utilizadas tienen los mismos significados que en la Figura 19

Las fracciones halladas en SSL sin tratamiento térmico corresponden a: Una primera transición que en realidad es doble y se forma de una fracción más pesada (manifestada en la

electroforesis como una banda al comienzo del gel separador y en el densitograma correspondiente como un hombro que corre menos), con un PM superior a 86 kDa formada por lipooxigenasa (90-100 kDa), agregados de glicoproteínas presentes en la harina de soja más las formadas por los procesos de manipulación; especialmente los pasos de congelación-crioconcentración-sublimación- evaporación que pueden favorecer el proceso de glicosilación. Esta fracción más pesada tiene un PM que apenas le permite pasar el gel de apilamiento pero le impide desplazarse por el gel de acrilamida al 12% y otra fracción más liviana de unos 80 kDa, la cual si migra un poco por el gel.

El grupo de transición II puede atribuirse a la β amilasa (PM 57 kDa), la cual se resuelve en el gel como dos fracciones de 55,5 y 55,6 kDa respectivamente; la transición III corresponde a las subunidades de lectina de (PM 30-35 kDa), y las transiciones IV y V con PM entre 21000-8000 Da correspondientes a los factores antitripticos de Kunitz y Bowman-Birk respectivamente.

El tratamiento térmico del SSL hasta 90°C no produce mayores cambios. Tomando como referencia las áreas halladas en SSL no calentado podemos cuantificar la susceptibilidad térmica de cada fracción realizando el cociente del área obtenida para una fracción luego de un tratamiento térmico determinado y el valor correspondiente en SSL no calentado. De esta forma para la pequeña transición II, atribuible con base a su PM a la β amilasa, luego de un tratamiento térmico hasta 90°C la relación es de 0,74; luego de un tratamiento hasta 120°C la relación es de 0,57 y luego de 140°C esta relación se reduce a 0,02. Esta reducción puede atribuirse a reacciones de agregación o que la proteína pierde capacidad de ser coloreada por cambios conformacionales. Como la cantidad de proteína sembrada es igual en todas las “calles”, entonces las intensidades y por ende las áreas obtenidas son proporcionales a éstas; por lo tanto estas relaciones resultan ser una estimación de la cantidad remanente de una dada fracción proteica luego de un dado tratamiento térmico.

Un análisis similar para la fracción III (subunidades de lectina) arroja valores de 1,00 (90°C); 0,96 (120°C) y 0,49 cuando el tratamiento térmico alcanzan los 140°C. Finalmente el factor de Kunitz (banda IV) resulta ser la fracción menos afectada con valores de 0,99 (90°C); 0,97 (120°C) y 0,80 para 140°C. Este factor antitriptico resulta ser el menos modificable por tratamiento térmico en condiciones anhidras; se sabe que es muy estable, tolera rangos de pH comprendidos entre 3,0-10,0 y presenta además una relativamente alta estabilidad térmica en condiciones de baja humedad (Koshiyama, 1981), condiciones predominantes en un suero de soja

liofilizado. Estos cambios se manifiestan como una pérdida de tonalidad en las bandas (visto en los geles) y por una reducción en el área de los densitogramas correspondientes. De esta forma

la estabilidad frente a la agregación térmica dio en el orden: β -amilasa (A) = lipoxigenasa (Lx) < lectina (L) < factor antitriptico de Kunitz (FAK).

Un incremento en el tratamiento térmico aplicado al SSL aumenta la extensión de la reacción de Maillard, y genera consecuentemente productos de condensación de PM cada vez mayor. Hasta 120°C esta fracción más pesada aún logra pasar el gel apilador mientras que luego de un tratamiento térmico hasta 140°C los agregados adquieren un PM que determina que se queden en el lugar de siembra (Figura 28), mientras que en el densitograma se manifiesta como un pico que se separa y aparece más a la izquierda. Debido a la presencia simultánea de proteínas y de HC es probable que estos sean agregados proteicos formados por la reacción de Maillard durante los tratamientos térmicos, debido a lo cual podrían tratarse de glicoproteínas.

Cuando el tratamiento térmico alcanza 140°C se obtiene un patrón simplificado formado por: agregados (I); subunidades de lectina (III) y IV (FAK).

De los ensayos en condiciones desnaturalizantes y reductoras (2-ME) resultó el gel mostrado en la Figura 30. En su densitograma (Figura 31) son identificadas las siguientes bandas: Banda I, muy pequeña (los agregados son disociables con 2-ME); banda II puede atribuirse a la β amilasa (PM 57 kDa); la III corresponde a las subunidades de lectina de 30 kDa, mientras que las bandas IV y VI corresponden a los factores antitripticos.

La relación de áreas entre I y III de SSL no calentado fue de 1: 2,46 para SDS-PAGE, mientras que en condiciones reductoras dicha relación cambia a 1: 6,62 (sembrando 44 μ g proteína/calle) o 1:15,51 (sembrando 22 μ g proteína/calle; gel mostrado). Esta diferencia cuantifica la reducción relativa de la transición I (agregados) por acción del agente reductor, ya que la transición III (subunidades de lectina) no es afectada por el agente reductor por carecer de puentes disulfuro.

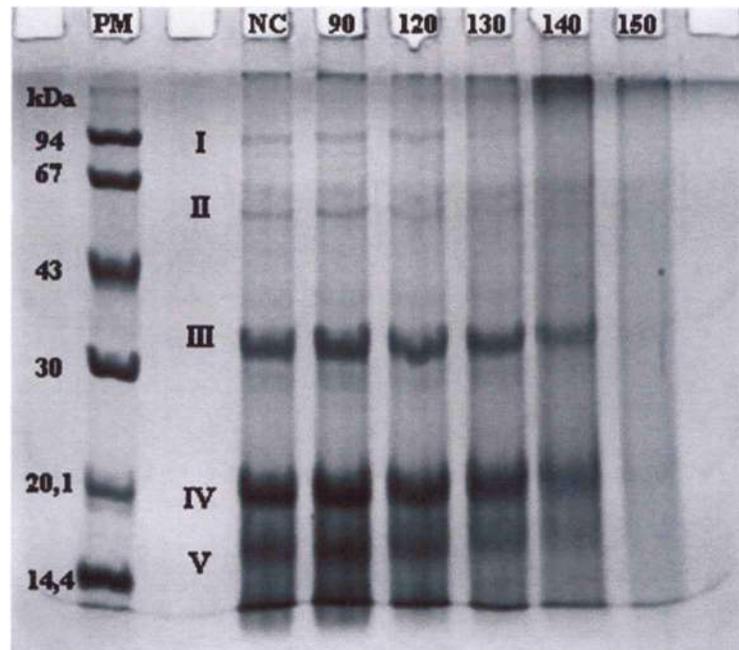


Figura 30: PAGE en condiciones disociantes (SDS) y reductoras (2-ME) de suero de soja liofilizado con diferentes tratamientos. Nomenclatura similar a la Figura 28.

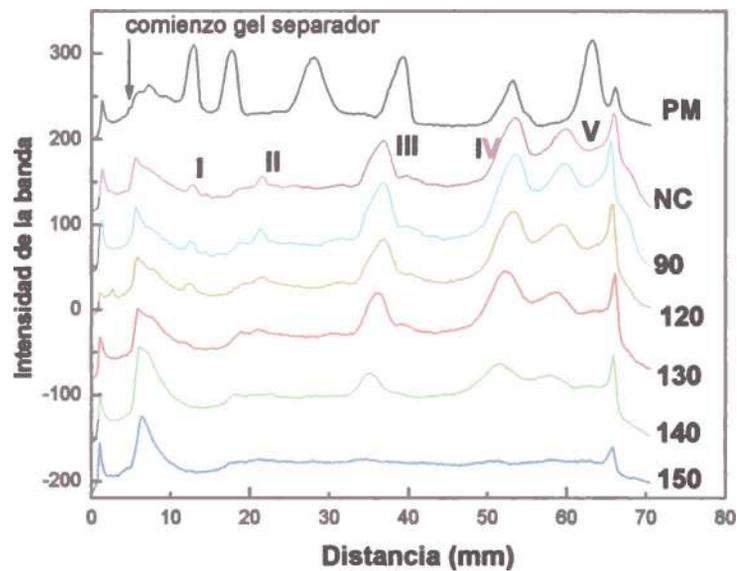


Figura 31: Densitogramas correspondientes a los perfiles electroforéticos de la Figura 30 PM: patrones de PM; NC: No calentado La nomenclatura de las bandas es la ya utilizada.

Los PM correspondientes a la muestra SSL sin calentar fueron de 81,8 kDa para la fracción I; 59,8 kDa para la II; 33,4 kDa para la III; 18,6 para la IV, mientras que para la fracción V

conteniendo factores antitripticos más pequeños (FABB) y polipéptidos el PM fue menor a 15,4 kDa. El PM de los agregados que atraviesan el gel apilador pero casi no migran por el gel separador están comprendidos entre 97,5 a 107,0 kDa.

La presencia del agente reductor no modifica la agregación de las diferentes especies, sin embargo el análisis de una temperatura intermedia (130°C) permite precisar la manera en que se producen los cambios. La amilasa (A) continua siendo la fracción proteicas más termolábil con una marcada disminución para 120°C y desapareciendo para 140°C. Para la fracción III (lectina) la relación de área (referencia SSL no calentado) sin agente reductor fue 0,96 (120°C) y 0,49 (140°C), mientras que con el 2-ME fue 0,95 (130°C) y 0,45 (140°C); finalmente el FAK (IV) resulta ser la fracción más termo resistente con relaciones de 1,00 (90°C) 0,95 (120°C), 0,93 (130°C) y 0,56(140°C) y casi desapareciendo (0,1) luego de un tratamiento hasta 150°C en condiciones reductoras.

El tratamiento térmico del SSL hasta 140°C determina la formación de una gran cantidad de agregados, los cuales en ausencia de 2-ME adquieren un PM que les impide atravesar el gel apilador y determina que se queden en el lugar de siembra; el agente reductor, rompe los S-S permitiendo que los agregados alcancen el comienzo del gel separador, pero casi no migran por este. Por esta razón hay un incremento en la intensidad en la parte superior del gel que alcanza su máximo para 140°C. Este resultado indicaría que en la agregación participan interacciones del tipo de puentes disulfuro. Cuando el tratamiento térmico alcanza 150°C no se evidencian fracciones proteicas, lo cual indica que todas ellas están en un estado de agregación avanzado.

Al tratar los geles con coloración para glicoproteínas (Figura 32 a, b), se pudo observar varios resultados: 1) la lectina resulta ser única especie que se comporta como glicoproteína por ser revelada por esta coloración, 2) los agregados presentes tanto en el liofilizado no calentado como en los calentados están formados por proteínas glicosiladas, 3) la lectina desaparece casi por completo luego de un calentamiento del suero liofilizado a 140°C, 4) a partir de esta misma temperatura se observa un incremento del contenido de agregados con proteínas glicosiladas que no entran al gel apilador, y por lo tanto son de muy alto tamaño molecular.

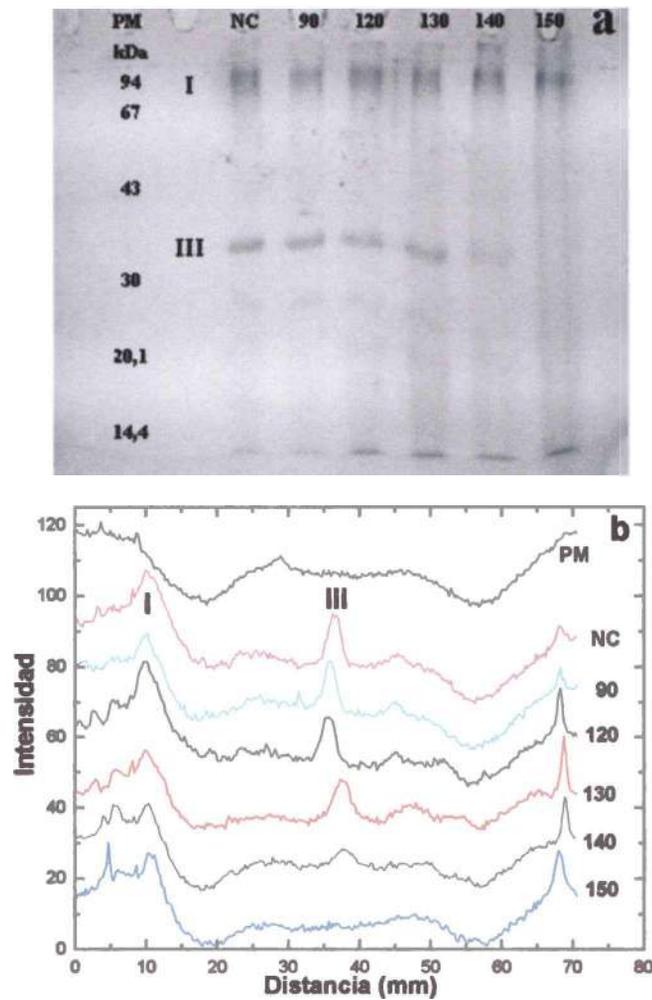


Figura 32: a) SDS-PAGE de SSL sin tratamiento térmico (NC) y calentado hasta las temperaturas que se indican; las glicoproteínas fueron evidenciadas empleando la coloración de PAS. b) densitograma del gel a), la banda I corresponden a agregados que no entran en el gel en tanto que la III lo hace a la lectina.

5.4 Estado de desnaturalización de las proteínas de suero

Ya fue analizado por electroforesis (sección 5.3) el efecto del tratamiento térmico sobre la agregación de las subunidades proteicas; se determinó que el calentamiento del SSL produce a partir de 140°C un importante cambio en los perfiles electroforéticos debido a la formación de agregados en los que participan la lectina y factores antitripticos. En esta sección se analizará la

relación entre dichos resultados y el grado de desnaturalización alcanzado por las diferentes fracciones.

El estudio del efecto del tratamiento térmico sobre el SSL será abordado desde dos puntos de vistas; 1^{er} se estudiarán los termogramas de dispersiones acuosas (30% p/p) de SSL previamente calentado (SSLC) en condiciones anhidras comparándose con termogramas de SSL no calentado; el objetivo de estos ensayos fue determinar la correspondencia entre las fracciones responsables de las subtransiciones I y II (Figura 24, Tabla 19) y las fracciones proteicas mayoritarias presentes en el SSL (FAK y L); los resultados de estos ensayos pueden verse en la Tabla 22.

En la 2^{da} parte del estudio abordaremos el estudio de las proteínas aisladas por precipitación en frío obtenidas a partir de SSL con y sin tratamiento térmico.

Tabla 22: Los datos presentados corresponden a termogramas de dispersiones acuosas (30% p/p) de suero de soja liofilizado calentado (SSLC). El calentamiento del SSL se realizó en condiciones anhidras en cápsulas comerciales de DSC selladas herméticamente tratado térmicamente en DSC (5°C/min, hasta las temperaturas máximas indicadas); finalizada el calentamiento las cápsulas fueron enfriadas (hielo, 30min) antes de romper la cápsula para recuperar la muestra. El % de desnaturalización fue calculado como $[100 * (\Delta H_0 - \Delta H) / \Delta H_0]$.

Tratamiento térmico (°C)	SSL (mg)	Pico	Rango de la Transición (°C)	Tp (midpoint) (°C)	Entalpía (J/g proteína)	Desnaturalización (%)
T _{amb.}	3,87	FAK	58,5-83,2	81,93 ± 0,73	5,10 ± 0,11	0
		L	83,2-105,2	93,05 ± 1,26	6,31 ± 0,18	0
130	2,41	FAK	59,1-83,9	80,08 ± 0,84	3,47 ± 0,15	32,0
		L	84,2-99,2	92,91 ± 1,21	3,41 ± 0,21	46,0
140	3,16	FAK	70,6-85,4	79,11 ± 0,87	1,89 ± 0,13	62,9
		L	91,1-100,0	91,51 ± 1,15	1,14 ± 0,06	81,9
180	2,01	No se registran transiciones			0	100

Los datos mostrados en la Tabla 22 indican que L es más afectada que KTI para un dado tratamiento térmico. En particular, el calentamiento del SSL en condiciones anhidras hasta 140°C (temperatura ubicada por encima de la transición I) produce un SSLC en el cual la lectina está mucho más desnaturalizada que KTI. Esto constituye la primera prueba de que las transiciones I y II en termogramas DSC de suero de soja liofilizado corresponden a la desnaturalización de la lectina y del factor inhibidor de Kunitz y confirma que existe una inversión de las susceptibilidades térmicas de estas dos fracciones dependiendo de si se realizan en ausencia o presencia de agua. En otras palabras, la ausencia de agua aumentaría la estabilidad térmica del factor de Kunitz por encima de la lectina.

En este análisis no se considera los efectos del almacenamiento debido a que todos los ensayos se realizan en un lapso menor a los 7 días, hecho que sumado a la lentitud de los cambios ocurridos por el almacenamiento justifican que se desprecie

5.5 Actividad antitriptica

Debido a la naturaleza de la materia prima empleada (harina desolventizada no sometida a tratamientos térmicos), la ausencia de tratamientos térmicos durante las etapas preparativas del suero y los resultados de las SDS-PAGE de SSL y SSLC analizadas previamente es probable que el SSL tenga los factores antitripticos activos.

Las SDS-PAGE (sección 5.3) revelaron la presencia de fracciones proteicas que, en base a su PM se corresponden, con ambos factores antitripticos presentes en la soja; a saber una fracción de 18-19 kDa atribuible al FAK (factor antitriptico más abundante) y otra fracción ubicada en la zona de 8,0 kDa que correspondería con el factor antitriptico de Bowman-Birk el cual fue detectado en cantidades trazas. En dicha sección se cuantificó la disminución en la intensidad de la banda IV (FAK) en muestras de SSLC. Los valores de las áreas relativas fueron calculados en relación a la muestra no tratada (SSL), empleando la expresión $100 \cdot [A/A_0]$; A_0 y A son las áreas correspondientes al FAK en SSL y SSLC respectivamente. Dichos cocientes en condiciones reductoras adoptaron los siguientes valores 1,00 (90°C); 0,95 (120°C); 0,93 (130°C) y 0,56 (140°C) con una drástica disminución de la intensidad para SSLC (150°C)

Esta reducción en la intensidad de las bandas electroforéticas se corresponden con un proceso de desnaturalización, fenómeno relacionado con una disminución en la actividad biológica, la cual se determinó empleando un método enzimático-colorimétrico, sobre muestras de SSL y SSLC; en este último caso los tratamientos térmicos se realizaron en condiciones idénticas (para tener resultados comparables) a los vistos para SDS-PAGE y se utilizó el método de Gonzalez y Carrillo (1987) realizando un ensayo control (100% actividad proteolítica) en ausencia de inhibidores y un ensayo en blanco (0% actividad) con adición de TCA a t=0. El % inhibición de la tripsina se calculó según las siguientes expresiones:

$$DO \text{ control} - DO \text{ blanco} = 100\% \text{ actividad} \quad (1)$$

$$DO \text{ muestra} - DO \text{ blanco} = X\% \text{ actividad} \quad (2)$$

$$100 - X = \% \text{ inhibición} \quad (3)$$

Tabla 23: Actividad antitriptica (Método de Gonzalez y Carrillo, 1987) determinado en SSL y SSLC hasta las temperaturas que se indican. La actividad antitriptica relativa (%) se estimó como el % inhibición tomando como referencia al del SSL no calentado, según la expresión: *Actividad antitriptica relativa (%) = 100 x I/I₀*; donde: I e I₀ son los % de inhibición de las muestras de SSLC y SSL, respectivamente: El porcentaje de agregación para el FAK fue estimado por SDS-PAGE (sección 5.3), mientras que su grado de desnaturalización fue determinado por DSC (sección 6.2.3) empleando las expresiones $100 \cdot [A/A_0]$; donde A₀ y A son las áreas correspondientes al FAK en SSL y SSLC, respectivamente y $[100 \cdot (\Delta H_0 - \Delta H) / \Delta H_0]$.

Tratamiento térmico (°C)	Actividad (%)	Inhibición (%)	Actividad antitriptica relativa (%)	Desnaturalización (%)	
				SDS-PAGE	DSC
25	48,4 ± 4,3	51,6	100	100	100
90	50,5 ± 3,2	49,5	96	100	92
120	52,3 ± 1,6	47,7	92	95	83
130	53,6 ± 3,7	46,4	90	93	56
140	69,8 ± 4,6	30,2	58	56	39
150	93,2 ± 5,0	6,8	13	10	0
180	96,3 ± 2,7	3,7	7	0	0

Un análisis de los datos muestra que la actividad se reduce apenas un 10% entre 25 y 130°C; cuando el calentamiento del SSSL alcanza los 140°C la actividad se reduce al 58% exhibiendo una reducción en la actividad antitriptica en un 32% con relación a la muestra calentada hasta 130°C; y luego de 150°C la actividad se reduce al 13%. De esta manera el incremento en 20°C entre 130 y 150°C produce una inactivación del 77% en la actividad antitriptica, valor que se corresponden con la drástica disminución en la intensidad vista en los geles en la sección 5.3. Finalmente luego de un tratamiento térmico hasta 180°C la actividad remanente es de solo el 7% de la que tenía el SSSL no calentado.

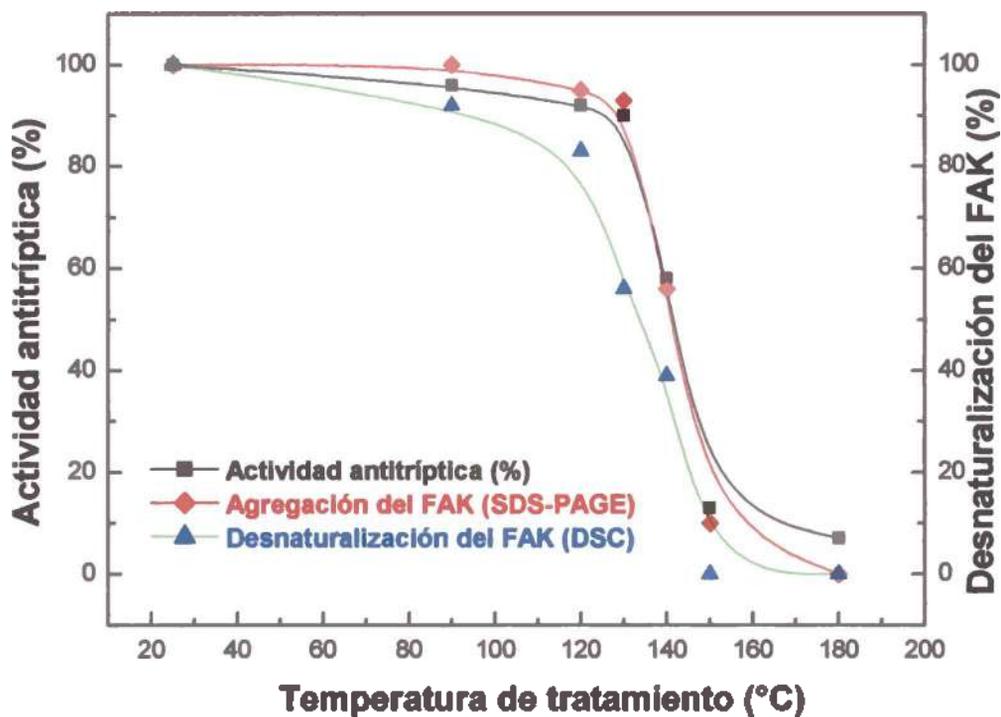


Figura 33: Ajuste sigmoideo aplicado al % la actividad antitriptica (%), a la intensidad relativa de la banda IV (FAK) detectada por SDS-PAGE y al % de desnaturalización determinado por DSC en proteínas aisladas para SSL y SSLC.

Un análisis comparativo entre la actividad antitriptica residual determinada en esta sección y los datos obtenidos para FAK a partir de SDS-PAGE y DSC revela la existencia de una fuerte correlación entre la inactivación biológica de este factor antinutricional y la agregación-desnaturalización estimada a partir de los densitogramas y termogramas correspondientes.

Puede observarse que la desnaturalización de FAK es previa a su agregación, dado que cuando se alcanza la desnaturalización total (150°C) resta aun un 10% del mismo sin agregar. Por otra parte se puede ver que cuando se alcanza la agregación-desnaturalización total de FAK (180°C) queda aun un resto de actividad antitriptica (7%). Esta actividad residual es debido al factor FABB que es más resistente térmicamente.

5.6 Efecto del tratamiento térmico sobre el espectro de absorción del suero liofilizado

Por último, a fin de visualizar los cambios sufridos por el SSL durante los tratamientos térmicos y defender lo postulado respecto a los procesos de glicosilación mencionados, emplearemos los espectros de absorción. Es bien sabido que las alteraciones sufridas por un alimento debidas a las reacciones de pardeo no enzimático son muchas y abarcan cambios funcionales, nutricionales y organolépticos; pudiendo formarse en las etapas finales pigmentos coloreados (amarillos, rojo y/o marrones) de naturaleza coloidal denominados “melanoidinas”. Estos pigmentos pardos (polímeros instaurados) se caracterizan por absorber radiación en la zona del visible del espectro sin presentar máximos ni mínimos característicos sino un aumento gradual de la absorbancia. En la Figura 34 se pueden ver los espectros de dispersiones acuosas de SSL y SSLC (90 y 180°C).

El SSL aún tratado térmicamente resultó relativamente fácil de solubilizar (hidratación *over-night* a 4°C) no requiriendo filtración (excepto SSLC hasta 180°C). De esta manera el espectro medido, corresponde al de una solución “entera” evitando de esta forma los errores derivados de trabajar con un extracto, los cuales pueden no extraer todos los pigmentos formados, o extraer un pigmento diferente al de interés (el representativo del avance de la reacción).

Los espectros UV-visible de SSL y SSLC (T_{amb} -130°C) señalan que no hay cambios significativos en la ubicación del máximo ubicado entre 260 y 262 nm (DO $0,509 \pm 0,043$). Para SSLC tratado térmicamente hasta 140°C, no se modifica la ubicación del máximo, pero se duplica su absorbancia (DO 1,012; 262 nm). El calentamiento hasta 150°C sí produce un

corrimiento del máximo (DO 0,987; 286 nm); mientras que para 180°C lo más notorio es el incremento en la absorbancia (DO 2,466; 281 nm).

Tratamientos térmicos más intensos (200-210°C) producen la carbonización del SSL dando perfiles carentes de picos. El corrimiento del máximo hacia 285 nm puede deberse a la mayor exposición de tirosina por desnaturalización proteica pero también puede interpretarse como la formación de 5-hidroximetilfurfural (HMF), debido a las reacciones de pardeamiento no enzimático. Las soluciones acuosas del HMF se caracterizan por tener un máximo principal a 285 nm ($\epsilon=16500$) y otro de menor importancia a 228 nm ($\epsilon=3620$) situándose el mínimo de absorbancia en 245 nm (Wolfrom y col., 1948).

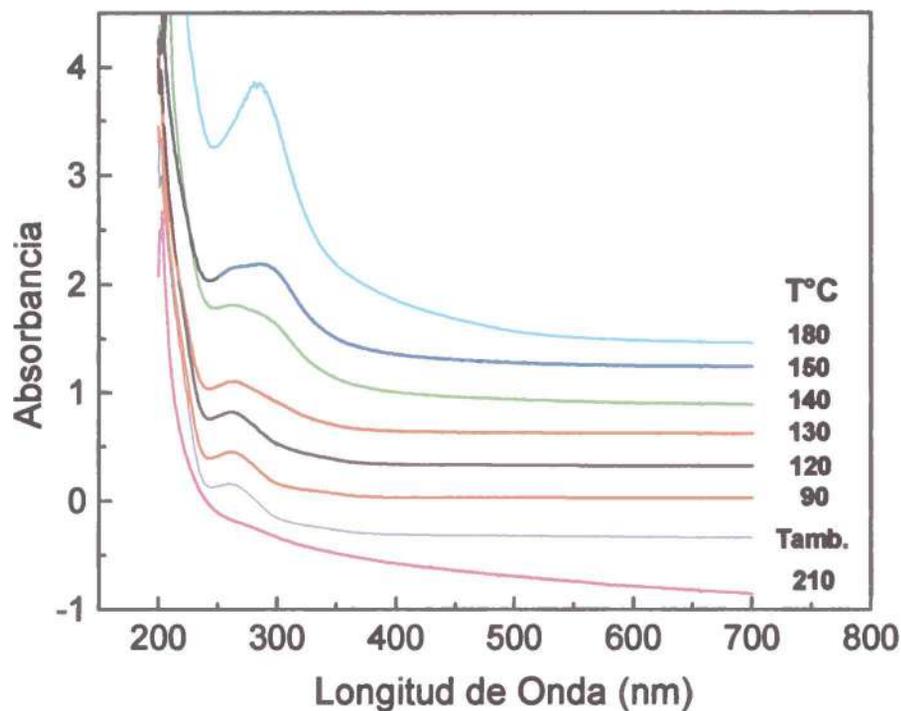


Figura 34: Curvas de absorbancia en función de longitud de onda de soluciones acuosas (0,5 mg/ml) de SSL y SSLC. El SSLC fue obtenido mediante tratamiento térmico de SSL en DSC. Para su mejor presentación las curvas están desplazadas en el eje de las ordenadas, de manera que los valores verdaderos de absorbancia pueden verse en la Tabla 24.

Tabla 24: La tabla especifica dos de las variables que pueden obtenerse a partir de las curvas de absorbancia en función de la longitud de onda (λ). Estas curvas fueron obtenidas a partir de soluciones de 0,5 mg/ml de suero de soja sin tratamiento térmico, o tratado térmicamente en DSC empleando una rampa de calentamiento de 5°C/min. hasta las temperaturas máximas que se indican en la columna de la izquierda.

Tratamiento térmico (°C)	Ubicación del máximo (nm)	Absorbancia
T _{amb.}	260	0,558
90	261	0,453
120	261	0,520
130	262	0,505
140	262	1,012
150	286	0,987
180	281	2,466
210	---	---

Estos hallazgos se corresponden con las *Características macroscópicas* mencionadas en 5.1 en las cuales el SSL que originariamente presentaba un color arena, aspecto suelto y polvoriento incrementaba progresivamente su color y su aglomeración al ser sometido a tratamientos térmicos cada vez más enérgicos obteniéndose un color pardo-rojizo cuando el ensayo llegaba a 180°C (temperatura que debemos considerar de máxima glicosilación). Tratamientos térmicos superiores ($T > 200^\circ\text{C}$) producen una carbonización del SSL produciendo una “pastilla negra”, que se correlaciona con la ausencia de picos de absorción. Los datos de absorbancia señalan que no hay cambios significativos en la ubicación del máximo correspondientes a muestras no tratadas térmicamente o tratadas hasta 90, 120, 130 y 140°C (máximo entre 260-262 nm).

El análisis de estos resultados sugieren que una línea de estudio tendiente a determinar las propiedades funcionales del suero de soja deshidratado con y sin tratamiento térmico, así como estudios nutricionales para explorar la factibilidad de uso como un aditivo alimentario, es recomendable.

6. PROTEÍNAS AISLADAS DE SUERO DE SOJA LIOFILIZADO

Para determinar la efectividad en la precipitación y recuperación de las proteínas presentes en SS, se emplearon alícuotas de 1 litro, sobre cada una de las cuales se ensayó la precipitación de las proteínas empleando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y acetona en frío. Asimismo se obtuvieron por precipitación con acetona en frío las proteínas presentes en muestras de SSL y SSLC.

Con ACETONA sobre suero de soja líquido:

Previa a la precipitación con acetona de 1 l de suero líquido se realizó un ensayo a menor escala (sobre 10 ml de suero de soja) empleando las mismas proporciones y condiciones posteriormente usadas (relación SS: acetona de 1:1) de manera de estimar la cantidad a recuperar. La masa obtenida de proteínas liofilizadas para este ensayo fue de 0,02143 g. La cantidad de proteína liofilizada finalmente obtenida partiendo de 1 l fue de 2,23851 g. Esta cantidad es más de la esperada por simple extrapolación, sin embargo puede explicarse debido a las menores pérdidas porcentuales derivadas de trabajar con cantidades mayores de muestra.

El sobrenadante resultante de la precipitación (aproximadamente 2 l de mezcla suero-acetona) fue almacenado (11 días a 4°C) para determinar y cuantificar la existencia de precipitación adicional de proteínas por el almacenaje. La centrifugación y posterior liofilización rindieron 0,03638 g adicionales a los obtenidos, lo que representa $(0,03638/2,23851)*100 = 1,6\%$ más de proteína recuperada originalmente. Este resultado corrobora la simplicidad y rapidez de esta técnica que precipita las proteínas en tiempos cortos (10-15 min), lo que minimiza procesos indeseables como la desnaturalización y agregación debido al empleo de solventes.

Con ACETONA, sobre suero de soja liofilizado:

Para el caso de SSL no tratado térmicamente, la cantidad de proteína recuperada fue de 0,02551 g (partiendo de 0,20904 g de SSL) por lo tanto el % p/p de proteína recuperada a partir del suero liofilizado es: $0,02551*100/0,20904 = 12,2\%$, este resultado se ubica entre el valor de proteína real (10,73 % p/p) y el de proteína total (17,60 % p/p).

Con ACETONA, sobre suero liofilizado tratado térmicamente

Como se detallo en la sección 2.7.3 el SSL fue tratado térmicamente en DSC empleando una rampa de calentamiento de 5°C/min hasta distintas temperaturas finales; a partir de este SSL calentado (SSLC) se obtuvieron las proteínas presentes precipitando con acetona en frío. Los % p/p de proteína recuperada liofilizada respecto al peso seco total fueron: (13,8% p/p) partiendo de un SSLC hasta 90°C; (15,3% p/p) para 120°C; (17,4% p/p) para 130°C; (17,5% p/p) para 140°C; (18,5% p/p) para 150°C y (21,1% p/p) para 180°C. Si consideramos el % de recuperación partiendo desde SSL no calentado (T= 25°C; 12,2% p/p) los datos se ajustan a un modelo lineal (Ec 1).

$$\% p/p = a + b * T \quad (1)$$

Donde: % p/p es el porcentaje de proteína recuperada respecto al peso seco total; a: 9,71; b: 0,06. La regresión por mínimos cuadrados tiene un $r = 0,95$

Nota: Adicionalmente se realizó un tratamiento térmico hasta 210°C en donde el % p/p de recuperación fue de 19,4 valor que no se incluye en la regresión porque este porcentaje se encuentra más relacionado con los cuidados y condiciones de centrifugación debido a que la incorporación de la acetona no tuvo ningún efecto precipitante a diferencia de los tratamientos térmicos más suaves debido a la carbonización de la muestra luego del calentamiento.

La Ec. 1 indica que el %p/p de proteína recuperada se incrementó con el tratamiento térmico aplicado al SSL previo a la precipitación con acetona. Para el caso de las precipitaciones empleando acetona existe una relación lineal descendente entre el logaritmo del PM y el % v/v de acetona utilizado, cuando la precipitación se realiza a 0°C y a pH ligeramente ácido (Scopes, 1982). Como las condiciones de precipitación empleadas en este trabajo fueron siempre las mismas, un incremento en la masa recuperada se puede interpretar como el incremento del peso molecular promedio de las especies precipitadas o el aumento de especies con el PM crítico para su precipitación. El incremento en el porcentaje de recuperación respondió a la formación de agregados glicosilados, detectados por SDS-PAGE y coloración de PAS (sección 5.3)

El estudio de las proteínas precipitadas con acetona desde SSL y SSLC presenta la banda III de 30 kDa correspondiente a las subunidades de lectina cuando la proteína se obtiene a partir de SSL; esta banda se reduce dramáticamente para la proteína obtenida desde SSLC (90°C) con un

simultáneo incremento en la intensidad de las bandas en la zona de PM cercana al FAK. Se postula como una posible explicación que, previo al tratamiento térmico hay agregados presentes en los que participan tanto la lectina como el FAK; la lectina por ser una glicoproteína tiene una mayor facilidad para glicosilarse, esto significa que se liga o une a dichos agregados por medio de sus azúcares a una temperatura menor que otros componentes proteicos (factores antitripticos), por esta razón la lectina es la fracción proteica más afectada luego del tratamiento térmico más suave ensayado (90°C).

Se verá luego (6.2.3) que la lectina es efectivamente precipitada a partir de SSLC conservando estructura suficiente, como para ser determinada en ensayos de DSC en dispersiones acuosas (30% p/p en agua). Podemos postular que los agregados retienen lectina para tratamientos térmicos suaves y libera factores antitripticos para tratamientos térmicos más enérgicos (120 y 130°C). Tratamiento más drásticos ($T > 140^\circ\text{C}$) ocasionan la desaparición de las bandas correspondientes a los factores antitripticos lo que se interpreta como una desnaturalización de los mismos.

Con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sobre suero de soja líquido:

La cantidad de proteínas recuperada luego de la precipitación con la sal, posterior diálisis y liofilización de 1000 ml de suero de soja fue de 1,86664 g. Si tomamos como base de comparación el valor de proteínas total (5,28 mg de proteínas/ml de SS), las cantidades idealmente recuperadas desde 1000 ml debió ser 5,28 g de proteína aproximadamente; de esta manera los rendimientos comparativos fueron:

Precipitación con acetona el rendimiento fue de $(2,23851 \cdot 100) / 5,28 = 42,40\%$.

Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ el rendimiento fue de $(1,86664 \cdot 100) / 5,28 = 35,35\%$.

Los resultados muestran que aunque la recuperación con solvente es un poco más efectiva que el obtenido precipitando las proteínas con sal, los porcentajes de recuperación son en todos los casos menores al 44% (del valor de proteína total) aún considerando la recuperación extra obtenida por almacenaje a temperatura de heladera para el caso de la precipitación con acetona. Esta disparidad entre los resultados ya fue encontrada durante el análisis composicional del SSL en la sección 3.2, en donde el contenido de proteína total ($17,60 \pm 0,04 \%$ p/p) fue

substancialmente mayor al valor de proteína real ($10,73 \pm 0,09$ % p/p) determinada empleando el método de Lowry en precipitados libres de azúcares obtenidos con TCA al 12%. Esta diferencia encontrada es causada por la presencia en el SS de material nitrogenado de bajo PM el cual no es efectivamente precipitado aún en estas drásticas condiciones.

El mejor rendimiento hallado en la precipitación con solvente puede explicarse en función de la mayor simplicidad y menor número de pasos involucrados en esta metodología, lo que evita pérdidas por manipulación. Debido a la rapidez, simplicidad y mayor rendimiento, se optó por obtener y estudiar las proteínas obtenidas mediante precipitación con acetona. Cabe aclarar que las proteínas aisladas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ presentaron un aspecto más fino y suelto, en contraste con las proteínas obtenidas mediante precipitación con solvente de aspecto más compacto y granulometría más gruesa. El aspecto de las proteínas con acetona y el incremento en el porcentaje de recuperación respondió a la formación de agregados glicosilados (sección 5.3)

6.1 Electroforesis de las proteínas precipitadas con acetona desde suero liofilizado

Los ensayos SDS-PAGE de las proteínas aisladas desde SSL y SSLC (Figura 35 a y b) revelan que están presentes la mayor parte de las proteínas identificadas en SSL. Es decir la banda I (agregados que no entran al gel separador), III (Lectina) y las bandas IV y V correspondientes a los factores antitripticos de Kunitz y Bowman-Birk respectivamente. Estas proteínas aisladas aún sin tratamiento térmico, presentan un alto grado de agregación; la relación agregados: L se incrementa de 0,41: 1 para las SDS-PAGE de SSL a 2,14: 1 para las proteínas aisladas. Esto puede atribuirse al método de aislamiento utilizado que incluye la precipitación con acetona, lo cual induce la agregación proteica. Un análisis densitométrico reveló que las proteínas aisladas desde SSL no calentado se distribuyen de la siguiente forma: 45% (agregados), 26% (FAK), 21% (subunidades de lectina), y 8% proteínas y péptidos ($\text{PM} < 14,6$ kDa). Cuando se analizan las muestras calentadas el estado de agregación es aún mayor.

El tratamiento térmico más suave ensayado (90 °C) produce una notable disminución de la banda III correspondiente a las subunidades de L y un incremento simultáneo en la intensidad de las bandas en la zona de PM cercana al FAK.

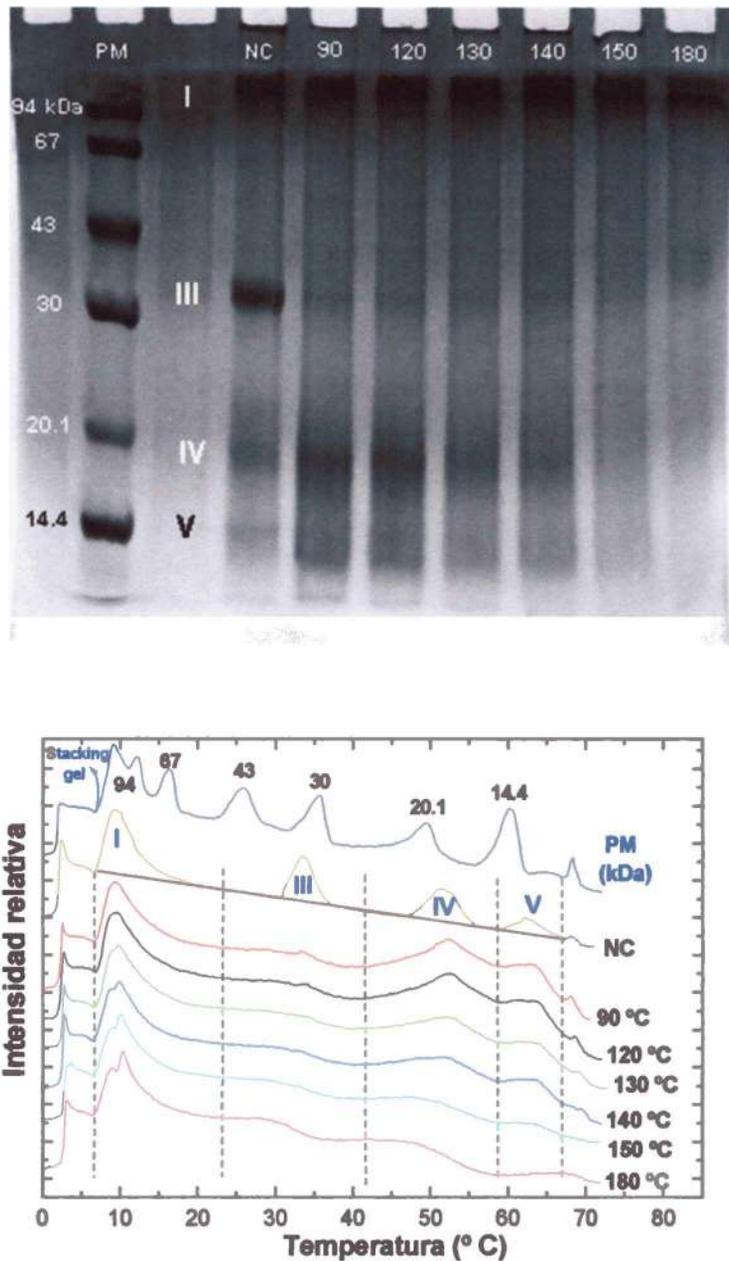


Figura 35: a) SDS-PAGE de proteínas precipitadas con acetona en desde SSL y SSLC; se indican las máximas temperaturas alcanzadas por SSL durante el tratamiento térmico. b) Densitogramas correspondientes; debajo del densitograma correspondiente a la muestra NC se incluye (en línea continua) una de las líneas de base utilizadas para determinar los límites de las respectivas bandas; la ubicación de dichos límites se resalta por medio de líneas punteadas verticales y se mantienen prácticamente inalterados hasta 150°C.

A partir de los densitogramas se elaboró la Tabla 25 y con ella se calculó la relación para las diferentes fracciones (referencia no calentado). Para la SSLC a 90°C: 0,99 para agregados, 1,04 y 1,42 para FAK y proteínas de PM<14,6 kDa y de 0,34 para L indicando una merma de 66%; esta reducción puede atribuirse a reacciones de agregación mediadas por glicosilación o interacción con otros componentes del suero. Para 120°C las bandas correspondientes a los factores antitripticos disminuyen por agregación y se alcanza la máxima intensidad en la zona de bajo PM. La relaciones de áreas resultó: 0,95 (agregados); 0,30 (L), 0,96 (FAK) y 1,69 para la fracción de PM<14,6 kDa. El tratamiento hasta 130 °C afecta en mayor medida a las proteínas ubicadas en la zona de bajo PM; las relaciones para dicho tratamiento térmico fueron: 0,99 (agregados); 0,28 (L); 0,82 (FAK) y 1,25 para la fracción proteica de PM< 14,6 kDa.

Tabla 25: Datos correspondientes al análisis de los densitogramas de la Figura 35 b; los valores entre paréntesis surgen de la relación: $100 \cdot (A_i/A_o)$. A_i : Área correspondiente a una dada fracción; A_o : Área correspondiente a la muestra no calentada. Ej. Para la muestra calentada hasta 90°C el valor entre paréntesis surge de: $100 \cdot 1828/1838=99,46\%$.

Tratamiento Térmico		Agregados	Lectina	Kunitz	PM<14,6 kDa	Área total
No tratada	Intervalo (mm)	6,6-22,8	22,8-39,7	39,7-57,9	57,9-67,3	
	Áreas parciales	1838	862	1062	309	4071 (100%)
90°C	Intervalo (mm)	6,6-22,8	22,8-39,7	39,7-57,9	57,9-67,3	
	Áreas parciales	1828 (99%)	292 (34%)	1108(104%)	440 (142%)	3669 (90%)
120°C	Intervalo (mm)	6,6-22,8	22,8-39,7	39,7-57,9	57,9-67,3	
	Áreas parciales	1751 (95%)	258 (30%)	1022 (96%)	522 (169%)	3554 (87%)
130°C	Intervalo (mm)	6,6-22,8	22,8-39,7	39,7-57,9	57,9-67,3	
	Áreas parciales	1825 (99%)	239 (28%)	871 (82%)	388 (125%)	3323 (82%)
140°C	Intervalo (mm)	6,6-22,7	22,7-39,6	39,6-58,0	58,0-67,3	
	Áreas parciales	1656 (90%)	236 (27%)	908 (85%)	407 (132%)	3207 (79%)
150°C	Intervalo (mm)	6,6-22,7	22,7-39,6	39,6-58,0	58,0-67,3	
	Áreas parciales	1699 (92%)	197 (23%)	682 (64%)	152 (49%)	2730 (67%)
180°C	Intervalo (mm)	9,0-25,2	25,2-49,4	49,6-79,5		
	Áreas parciales	2120 (115%)	527	1110		3757 (92%)

Trabajando con el producto liofilizado entero no hay cambios apreciables hasta los 120°C; mientras que con las proteínas aisladas aún a la temperatura mas baja ensayada (90°C) se observa una notable disminución en la banda III (lectina). Esta diferencia se debe a que la L levemente modificada por calentamiento suave forma agregados fácilmente por el efecto de la acetona y que esta tendencia a la agregación aumenta con la temperatura de tratamiento. El incremento de las bandas correspondientes a los factores antitripticos se debe a la interacción de los mismos con componentes menores (péptidos) que en presencia de SDS se disocian aumentando la intensidad en la zona de bajo PM

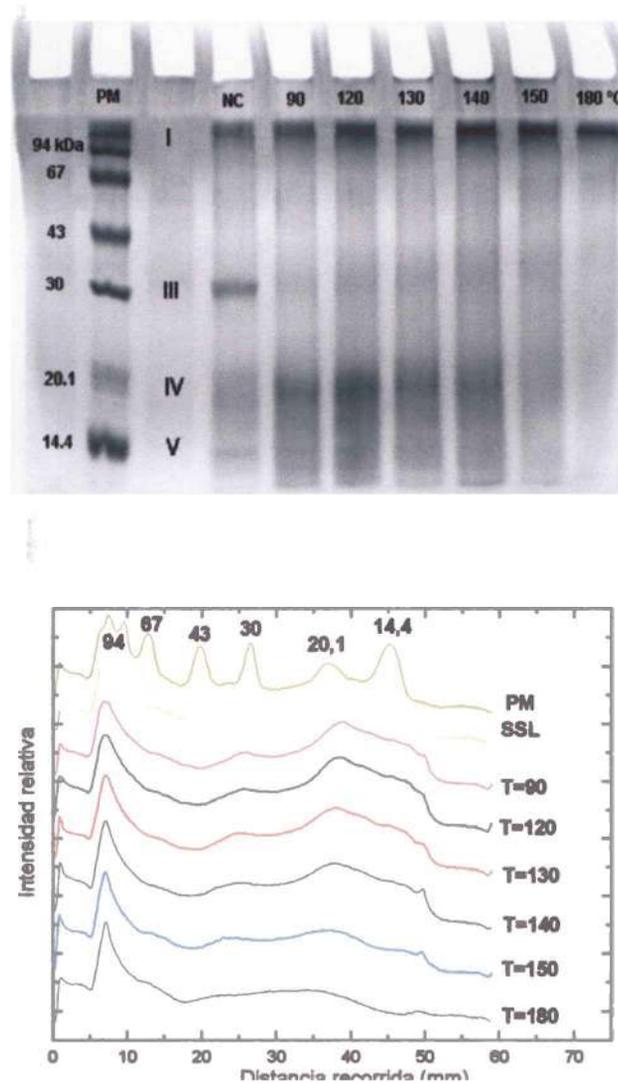


Figura 36: a) ME-SDS-PAGE de proteínas precipitadas con acetona en desde SSL y SSLC; hasta las temperaturas máximas indicadas. b) Densitogramas correspondientes;

Se postula que los agregados retienen L en tratamientos térmicos suaves y libera factores antitripticos para tratamientos térmicos más energicos (120 y 130°C). Los tratamientos térmicos superiores a 140°C producen reacciones de descomposición de los agregados con producción de especies proteicas que entran al gel separador y la desnaturalización de los factores antitripticos responsable de la inactivación enzimática. Ambos cambios en los geles son más pronunciados cuanto mayor es la temperatura alcanzada por el liofilizado

Para una mejor interpretación del efecto del tratamiento térmico sobre las proteínas se recurre al análisis de los densitogramas correspondientes (Figura 35 b). El trazado de una línea de base adecuada que comprenda la zona de interés ($97 < PM < 10$ kDa) delimita una serie de bandas correspondientes a las diferentes fracciones proteicas. Para las proteínas obtenidas desde SSL los agregados se corresponde con la fracción que tiene una distancia migrada (D_m) entre 6,6 y 22,8 mm; L se ubica entre ($22,8 < D_m < 39,7$ mm); FAK ($39,7 < D_m < 57,9$ mm) mientras que la fracción con $PM < 14,6$ kDa se corresponde con ($57,9 < D_m < 67,6$ mm). El trazado de sucesivas líneas de base reveló que los límites se mantienen prácticamente inalterados hasta 150 °C fue utilizado para el análisis de las muestras provenientes de SSLC. La Tabla 25 condensan los resultados de este análisis.

Los perfiles obtenidos en las SDS-PAGE sin y con mercaptoetanol fueron prácticamente similares lo que sugiere que en la formación de los agregados participan uniones covalentes diferentes a las disulfuro lo que apoya la mediación de reacciones de glicosilación pudiendo identificarse las siguientes bandas: I ($PM > 88,3$ kDa) correspondientes a los agregados; la III (34-36 kDa) atribuible a las subunidades de lectina, la IV (18-20 kDa) correspondiente al FAK y una banda V ($PM < 13$ kDa) muy tenue que contiene entre otros al factor antitriptico de Bowman-Birk. Este último factor antitriptico no se evidencia con agente reductor porque su estructura esta estabilizada por siete puentes disulfuro que se reducen con el uso del 2-ME.

Empleando como referencia la muestra no tratada térmicamente se halla una relación de áreas entre las transiciones III (lectina) y IV(Kunitz) de 1:1,2 tanto en ausencia como en presencia del agente reductor; sin embargo luego del tratamiento térmico más suave aplicado (90°C) esta relación se incrementa a 1:4 aproximadamente dando cuenta de la drástica reducción de la transición III debido a la susceptibilidad térmica de las subunidades de lectina frente a tratamientos térmicos relativamente suaves. Esta relación se mantiene próxima a 1:4 luego de tratamientos térmicos comprendidos entre 120 y 140°C y recién luego de 150°C cae a 1:3,4. Un

análisis del comportamiento térmico de la transición IV (Kunitz) indica una reducción apreciable en la relación de áreas luego de un tratamiento térmico hasta 140°C, temperatura a partir de la cual se detecta una reducción de la actividad antitriptica.

6.2 Proteínas precipitadas con acetona de suero de soja liofilizado tratado térmicamente

6.2.1 Recuperación de muestras SSLC

El tratamiento térmico del suero de soja liofilizado se realizó en la celda DSC siguiendo los procedimientos detallados en 2.7.3 empleando una velocidad de calentamiento de 5°C/min. Los datos de estos ensayos pueden verse en la Tabla 26.

Tabla 26: Resultados obtenidos a partir de los tratamientos térmicos utilizados para obtener el SSLC. Δ masa = $100 \cdot (m_o - m_f) / m_o$; m_o y m_f corresponden a las masas de SSL dentro de la cápsula antes y después de la corrida en DSC. % de recuperación = $100 \cdot m_R / m_o$; m_R = masa de SSLC recuperada desde la cápsula de DSC

Temperatura seleccionada en DSC (°C)	Δ masa (% p/p)	% de recuperación
90	-0,023	99,3
120	-0,024	97,6
130	+0,140	90,5
140	+0,197	87,4
150	+0,052	80,5
180	+0,072	68,4
210	+0,081	82,7

A los largo de este trabajo se adoptó como norma pesar todas las cápsulas antes y después de cada corrida, correlacionando buenos resultados cuando el parámetro Δ masa se encontraba por debajo de 0,5 tanto para ensayos con muestra liofilizada como en dispersiones al 30% p/p en agua. Este parámetro fue utilizado para estimar la estanqueidad en el sellado de la cápsula; en

estos ensayos los valores obtenidos fueron menores a 0,2%, lo que es equivalente a una variación de 0,2 mg por cada 100 mg. El % de recuperación se relaciona con las características (textura, pegajosidad, etc.) del SSLC obtenido, la mínima recuperación se encuentra a 180°C y corresponde a una muestra tipo caramelo con el máximo de glicosilación alcanzado. El incremento posterior en el porcentaje de recuperación se explica por el hecho que cuando la muestra se carboniza se obtiene una “pastilla carbonosa” que se desprende con facilidad de la cápsula y facilita su recuperación.

6.2.2 Observaciones macroscópicas

La intensidad del tratamiento térmico determina tanto el porcentaje de recuperación como los cambios en observados en el SSLC. Como se mencionó en 5.1 el SSL se presentó como un polvo de color arena formado por partículas sueltas; los SSLC obtenidos luego de tratamientos entre 90-120°C presentaron ligera aglomeración e intensificación del color original con porcentajes de recuperación cercanos al 100%. Entre 130-140°C se formó un caramelo de un color pardo-rojizo mientras que la recuperación se ubicó entre el 85-90%; entre 150-180°C el caramelo alcanza la máxima compactación y coloración mientras que el porcentaje de recuperación alcanza su mínimo; finalmente, a 200°C ocurre carbonización del SSL que facilita su recuperación a partir de las cápsulas luego del proceso de enfriado (hielo, 30 min).

6.2.3 Comportamiento térmico de las proteínas precipitadas con acetona

Estudios por DSC de dispersiones acuosas de las proteínas aisladas de SSL y SSLC dieron los termogramas que se muestran en la Figura 37, los datos se muestran en la Tabla 27. Las proteínas obtenidas desde SSL no calentado producen termogramas compuestos por dos transiciones con temperaturas de pico (T_p) de $74,2 \pm 0,6$ y $93,3 \pm 0,2^\circ\text{C}$, las cuales corresponden al FAK y L respectivamente. La eliminación de las sales y azúcares presentes en el suero produce la disminución en las T_p de las transiciones analizadas. Para FAK la T_p disminuyó de $81,9 \pm 0,7$ en SSL a $74,2 \pm 0,6^\circ\text{C}$ para las proteínas aisladas. Para L dichos valores fueron $93,0 \pm 1,3^\circ\text{C}$ en SSL y $93,3 \pm 0,2^\circ\text{C}$ en proteínas aisladas. Estos valores son muy próximos a los valores obtenidos

en otros trabajos (Sorgentini y Wagner, 1999) correspondientes a los termogramas de estas proteínas desaladas precipitadas con sulfato de amonio.

Las T_p para proteínas precipitadas con acetona fueron 0,2 y 2,9°C mayores para FAK y L respectivamente que los valores informados obteniendo las proteínas mediante precipitación con sales. Estas diferencias se deben a que la precipitación con acetona en frío induce a la formación de agregados en mayor grado que el sulfato de amonio. Este mayor estado de agregación se corresponde con los resultados del PAGE y el aspecto granuloso de las proteínas obtenidas mediante precipitación con solvente. La formación de agregados produce un efecto estabilizante de las proteínas frente al tratamiento térmico. Este estado de agregación en la lectina hace que su desnaturalización aún en ausencia de sales y azúcares se produzca a una temperatura más alta que la esperada.

Cuando analizamos las T_p de las proteínas obtenidas a partir de SSLC (Tabla 27) encontramos un comportamiento diferencial en la medida en que el tratamiento térmico previo a la extracción de las proteínas se hace más intenso. Mientras que la T_p se incrementa para FAK disminuye para L. Si las T_p dependieran exclusivamente del estado de agregación ambas T_p deberían verse incrementadas. El comportamiento observado se debe a la presencia de cambios conformacionales adicionales a la agregación como la glicosilación que producen las modificaciones de estabilidad observadas. También hay que considerar que las interacciones con otras sustancias presentes en el suero (polifenoles, sales y péptidos) modifiquen la estabilidad térmica de las subunidades de lectina. El análisis de los datos de la Tabla 27 señalan a 120°C como un valor que determina un cambio en el comportamiento térmico del SSL. Tratamientos térmicos menores a este valor como 90°C producen un mayor efecto sobre el FAK con un grado de desnaturalización \approx 8%. Al llegar a 120°C la situación cambiaba drásticamente. El FAK presenta un grado de desnaturalización del 17%, mientras que para la L dicho valor asciende al 21%. Esta diferencia se amplía para 130°C alcanzando valores de 44 y 57% para el factor de Kunitz y la lectina respectivamente. Finalmente, luego de tratamientos térmicos hasta 140°C se llega a una desnaturalización de 61% para el factor de Kunitz y del 100% para la lectina, este último resultado confirma la inversión térmica hallada durante los tratamientos térmicos de SSL realizados en condiciones anhidras, en donde la estabilidad térmica del KTI se eleva por encima de la L.

Al analizar los termogramas correspondientes a las proteínas provenientes de SSLC y las electroforesis de las mismas proteínas, se aclara lo ocurrido con la lectina. Las SDS-PAGE de las proteínas obtenidas desde SSLC (90°C) revelan una notable disminución en la intensidad de la banda correspondiente a las subunidades de lectina mientras que la transición térmica atribuible a lectina presenta una entalpía similar a la del SSL no calentado. Este resultado corrobora que en las proteínas de suero precipitadas con acetona la lectina está presente, pero en forma de agregados sin variar su grado de desnaturalización.

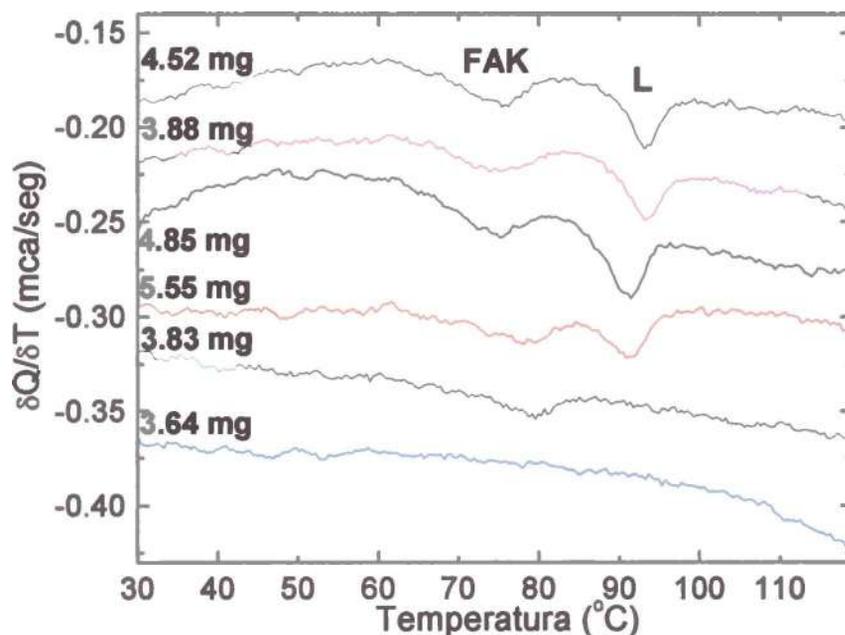


Figura 37: Termogramas de proteínas de SSL y SSLC analizadas en agua al 30%. Los tratamientos térmicos aplicados al SSL previo a la obtención de las proteínas fueron los siguientes: (—) T_{amb} ; (—) 90°C; (—) 120°C; (—), 130°C; (—) 140°C; (—) 150°C. Junto a cada termograma se indica la masa de proteína seca dentro de cada cápsula.

Existe correlación entre los ensayos DSC con dispersiones acuosas de SSL y SSLC al 30% p/p y los analizados con dispersiones acuosas de proteínas obtenidas desde SSL y SSLC. Los porcentajes de desnaturalización para el FAK fueron 32,0 y 44,2 (tratamiento térmico hasta 130°C) y 62,9 y 60,6 (tratamiento hasta 140°C), respectivamente. Por otro parte la transición correspondiente a la lectina los porcentajes de desnaturalización fueron 46,0 y 56,7 (130°C) y 81,9 y 100% (140°C) respectivamente.

Tabla 27: Valores de T_p , entalpía y grado de desnaturalización para Lectina y factor de Kunitz calculados a partir de los termogramas DSC de la Figura 37.

Muestra	Factor antitriptico de Kunitz		
	T_p (°C)	Entalpía (J/g Prot)	(%) de desnaturalización [100 ($\Delta H_p - \Delta H_0$)/ ΔH_0]
SSL	74,2 ± 0,6	2,08 ± 0,21	0
SSLC 90°C	75,4 ± 0,2	1,92 ± 0,12	7,7
SSLC 120°C	75,2 ± 0,1	1,72 ± 0,06	17,3
SSLC 130°C	78,6 ± 0,4	1,16 ± 0,40	44,2
SSLC 140°C	79,8 ± 0,2	0,82 ± 0,32	60,6
SSLC 150°C	---	---	100
Muestra	Lectina		
SSL	93,3 ± 0,2	2,08 ± 0,12	0
SSLC 90°C	95,7 ± 1,1	2,34 ± 0,24	0
SSLC 120°C	91,3 ± 0,1	1,64 ± 0,41	21,2
SSLC 130°C	91,8 ± 0,7	0,90 ± 0,14	56,7
SSLC 140°C	---	---	100
SSLC 150°C	---	---	100

6.3 Grado de glicosilación de las proteínas aisladas desde suero de soja liofilizado tratado térmicamente

Como se detalló en la sección 2.7.5 se determinó el grado de glicosilación (GG) de las proteínas precipitadas con acetona desde SSL y SSLC (90-180°C) Para ello se prepararon soluciones acuosas (10 mg/ml) de las proteínas liofilizadas en agua destilada y se determinó el contenido de proteínas y carbohidratos empleando los métodos de Lowry y Dubois respectivamente. De manera similar a lo ocurrido al preparar soluciones acuosas de SSLC para otros ensayos (TLC, espectro UV-Visible) se observó una disminución en la solubilidad, en este caso de las proteínas obtenidas, en la medida en que se intensificaba el tratamiento térmico aplicado al SSL previo a la obtención de las proteínas. Por esta razón se determinó el contenido de proteínas y carbohidratos en las soluciones enteras y centrifugadas. Los datos de dichos ensayos se encuentra en la tabla 28

Tabla 28: Determinaciones de HC (Dubois) y proteínas (Lowry) realizadas sobre soluciones acuosas (10 mg/ml) enteras y centrifugadas de proteína liofilizada precipitada con acetona en frío desde SSL y SSLC (90-180°C). GG: grado de glicosilación se calculó como a/(10.b)

Tratamiento térmico (°C)	Solución		Solución centrifugada (10.000 rpm, 15 min)		GG (mg HC/100 mg proteína)
	µg de HC/ml	mg de prot/ml	µg de HC/ml (a)	mg de prot/ml (b)	
25	704,2 ± 35	9,8 ± 0,35	573,9 ± 23	7,89 ± 0,10	7,27
90	1015,4 ± 28	7,16 ± 0,41	847,9 ± 27	5,62 ± 0,13	15,09
120	977,35 ± 42	8,72 ± 0,76	791,0 ± 31	5,55 ± 0,31	14,25
130	940,2 ± 37	6,74 ± 0,60	779,0 ± 24	4,06 ± 0,28	19,19
140	771,7 ± 32	6,56 ± 0,86	629,2 ± 55	2,70 ± 0,13	23,30
150	1115,9 ± 53	5,60 ± 0,79	932,2 ± 38	2,71 ± 0,14	34,40
180	1413,7 ± 41	5,16 ± 0,13	1130,5 ± 44	1,82 ± 0,11	62,11

Un análisis de los datos de la tabla permite determinar, que luego de la centrifugación se reduce la cantidad de azúcares detectada, quedando soluble el 81,97 ± 1,36% de la cantidad detectada en la solución sin centrifugar. Por otra parte la cantidad de proteína soluble (soluciones centrifugadas) disminuye de forma lineal:

$$[Proteína] = a + b * T \quad (2)$$

Donde: [Proteína] expresada en mg/ml; a: 9,22; b: -0,041. La regresión por mínimos cuadrados tiene un r = 0,95. Este resultado concuerda con las observaciones realizadas, luego de dejar 24 hs la solución de proteína en la heladera o luego de una centrifugación la cantidad de insoluble crece con el tratamiento térmico. Con relación al GG de las proteínas este se duplica luego del tratamiento térmico más suave ensayado (90°C), esto correspondería a la glicosilación de las subunidades de lectina, las cuales como se vio en 6.1 y 6.2.3 forman agregados de manera que ya no se revelan en su posición habitual (desplazándose hacia regiones de mayor PM), pero sin

desnaturalizarse (los termogramas de estas proteínas tienen entalpías similares a las provenientes de SSL); desde 120°C en adelante el GG crece, al igual que la masa recuperada de manera lineal:

$$GG = a + b * T \quad (3)$$

Donde GG: grado de glicosilación expresado en mg HC/100 mg de proteína; a: -87,44; b: 0,820.

La regresión por mínimos cuadrados tiene un $r = 0,99$.

7. EFECTO COMBINADO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO Y DEL ALMACENAMIENTO SOBRE EL SUERO LIOFILIZADO DE SOJA

7.1 Sobre la cristalización de azúcares y desnaturalización proteica

Los efectos del tratamiento térmico con posterior almacenamiento en condiciones de HR=0 serán analizados tanto en condiciones de confinamiento (cápsula cerrada) como de no confinamiento (cápsula abierta); en ambos casos los tratamientos térmicos fueron realizados en condiciones de confinamiento colocando la muestra dentro de cápsulas comerciales de DSC y tratando las mismas hasta 180°C (temperatura en que se alcanza el máximo del pico de glicosilación) a 5°C/min con inmediato enfriamiento en hielo y almacenamiento en desecante. Ambos termogramas ubicados en la parte superior de la Figura 38 se corresponden con tiempos de almacenamiento de 125 días; por lo visto en 4.2.2 para tiempos de almacenamiento superiores a los 54 días se evidencia la transición Fa correspondiente a la fusión de cristales de azúcares sin glicosilación (generados por recristalización durante el almacenamiento a -80°C) ubicada a 67°C y las transiciones I y II con Tp de 124 y 148°C correspondientes a la desnaturalización de lectina y factor de Kunitz respectivamente.

El tratamiento térmico aplicado en este 1^{er} ensayo de DSC ocasiona en primera instancia el ablandamiento del sistema seguido de la fusión de los cristales de azúcares y luego la glicosilación con simultánea desnaturalización de las proteínas presentes. Por lo tanto es de esperarse que si se les da tiempo estos productos de pardeamiento no enzimático induzcan una cristalización diferente de los azúcares, dependiendo tanto de las condiciones (confinamiento o no) como del tiempo de almacenamiento en desecante a T_{amb}. Las características térmicas de la nueva forma cristalina adoptada serán evidenciadas en el 2^{do} ensayo DSC. El análisis de los termogramas permite afirmar que para tiempos de almacenamiento muy cortos (2 hs.) los termograma obtenidos adoptan una forma similar a los del 1^{er} ensayo pero sin la presencia de las transiciones (Fa), (I) y (II), por fusión de azúcares y desnaturalización de las proteínas presentes respectivamente.

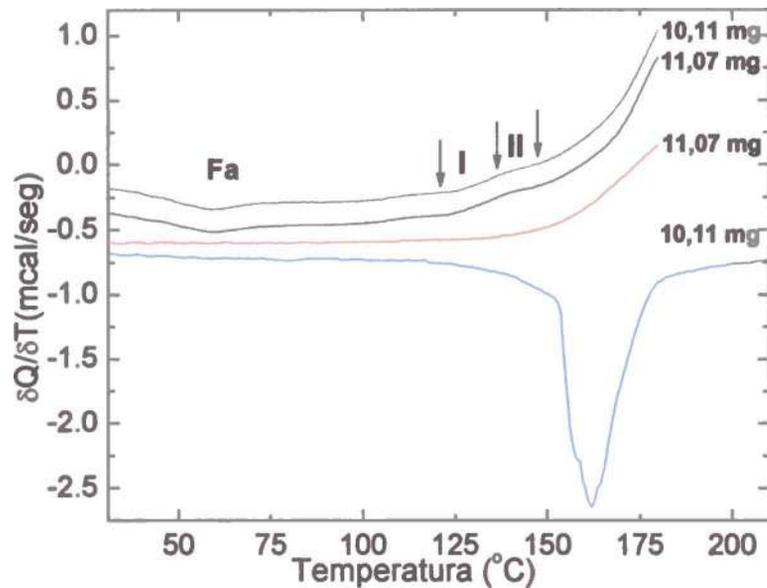


Figura 38: Los dos termogramas ubicados en la parte superior (—) y (—) corresponden al tratamiento térmico en condiciones de confinamiento aplicado al SSL hasta 180°C (rampa 5°C/min.). Los termogramas inferiores corresponden a las mismas cápsulas analizadas en las mismas condiciones pero almacenadas cerradas a Tamb. en desecante durante los siguientes tiempos: (—): 2 hs; (—): 15 días. Se indican las masas de SSL empleadas.

La explicación para este comportamiento es simple; el tiempo de almacenamiento simplemente no es suficiente como para permitir ninguna clase de reordenamiento estructural. Por el contrario, luego de un almacenamiento mas prolongado (15 días) se forman cristales de azúcares con una estructura bastante estable, lo que se traduce en una transición con alta T_p (T_p de 161,9°C); transición que presenta además una elevada entalpía de fusión (ΔH de 127,2 J/g de liofilizado). Esto se corresponde con un fenómeno de nucleación y cristalización facilitada por la presencia de agua que es generada durante el tratamiento térmico y permanece retenida dentro de la cápsula por el sellado de la misma y que puede producir cristales hidratados los cuales tienen menor T_f que los correspondientes cristales anhidros.

Algunas temperaturas de fusión de azúcares puros tanto en su forma anhidra como hidratada determinadas por DSC (Weast, 1986) son los siguientes: La D-glucosa anhidra (monosacárido) tiene una T_f de 146°C, temperatura que se reduce a 86°C para la α -D-glucosa. $\cdot xH_2O$; entre los disacáridos podemos mencionar el caso de la maltosa que en estado

anhidro funde en un rango comprendido entre 160 a 165°C mientras que en su forma hidratada maltosa.xH₂O se reduce a 102-103°C o la α,α -trehalosa cuyo rango de fusión se ubica entre 214 a 216°C, rango que se reduce para la α,α -trehalosa.x2H₂O a 103°C.

Estos valores apoyan el hecho que la presencia de pequeñas cantidades de agua durante la cristalización pueden permitir la formación de especies cristalinas hidratadas, las cuales tienen T_f sensiblemente menores a la correspondientes formas anhidras; además hay que tener presente que uno de los sacáridos típicamente presentes en soja es la rafinosa, la cual tiende a hidratarse con 5 moléculas de agua, especie que tiene una T_f de 80°C determinada por DSC (Roos, 1993). De esta forma tenemos en un comienzo dentro de la cápsula de DSC un ambiente con HR=0; en la medida que la temperatura se eleva (durante el 1^{er} tratamiento térmico) se produce en una primera instancia la fusión de los cristales de azúcares (alrededor de 60°C); fusión que termina aproximadamente cuando se alcanzan los 75°C. En este rango de temperatura puede haber también liberación de agua constitucional, lo que incrementaría la a_w . Cuando $T > 100^\circ\text{C}$ aumenta la producción de productos de Maillard por lo que se forma furfural, hay liberación de NH₃, H₂O y CO₂, los cuales en condiciones de confinamiento (cápsula cerrada) quedan atrapados modificando la HR (HR>0).

Con el enfriamiento y almacenamiento se produce la adsorción de vapor de agua en atmósfera con HR>0 de manera que los cristales formados en estas condiciones están en una matriz con $a_w > 0$ por tanto, se producirán cristales hidratados los cuales funden a temperaturas menores que los correspondientes cristales anhidros. Este comportamiento se relaciona también con la composición del SSL, en el cual los glúcidos son los componentes mayoritarios y guardan una relación sacarosa: oligosacáridos típicos de la soja (ensayos por TLC) de 6:1; si consideramos al SSL como una mezcla ideal formada únicamente por estos dos tipos de azúcares (sacarosa y rafinosa, en las relaciones vistas), con las suposiciones adicionales que no interaccionen entre sí y las entalpías de fusión sean aditivas, el cálculo teórico de la entalpía de fusión daría: $0,85 \cdot 118 \text{ J/g} + 0,15 \cdot 138 \text{ J/g} = 121 \text{ J/g}$ valor semejante al experimental (127,2 J/g).

El estudio en condiciones de confinamiento se realizó abriendo las cápsulas para recuperar el SSLC luego del tratamiento térmico y la etapa de enfriamiento y almacenando el SSLC en atmósfera deshidratante de manera de facilitar la eliminación de la humedad generada; los termogramas correspondientes a estos ensayos se muestran en la Figura 39.

En estas condiciones de no-confinamiento cuando la muestra se saca fuera de la cápsula y se coloca en equilibrio con el desecante, se observa que luego de un tiempo de almacenamiento de 12 días aparecen dos transiciones III ($T_p= 147,4^{\circ}\text{C}$; $\Delta H= 3,2 \text{ J/g SSL}$) y IV de mayor tamaño ($T_p= 190,1^{\circ}\text{C}$; $\Delta H=21,8 \text{ J/g SSL}$). Si el almacenamiento se prolonga, vemos que luego de 22 días ambas se unifican en una única transición (V) con mayor temperatura y entalpía de fusión (T_p de $200,5^{\circ}\text{C}$; ΔH de $78,1 \text{ J/g}$ de liofilizado seco).

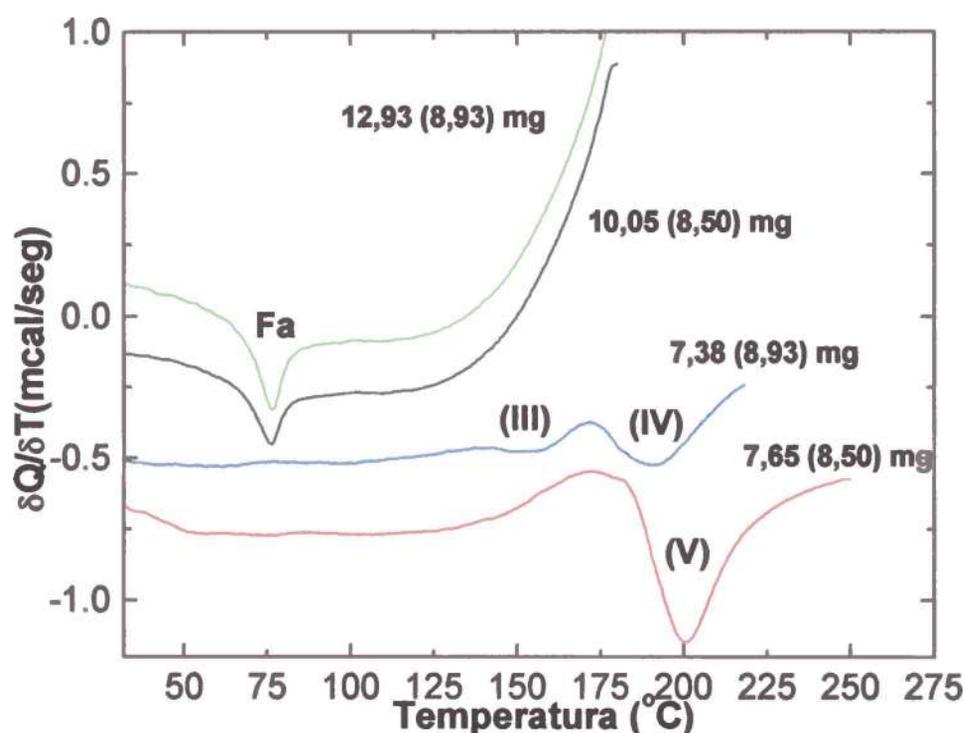


Figura 39: Los dos termogramas ubicados en la parte superior (—) y (—) corresponden al tratamiento térmico en condiciones de confinamiento aplicado al SSL hasta 180°C (rampa $5^{\circ}\text{C}/\text{min.}$). Los termogramas inferiores corresponden al SSL almacenado a T_{amb} fuera de la cápsula en desecante durante los siguientes tiempos: (—) 12 días; (—) 22 días. Junto a cada termograma se indican las masas de SSL empleada en cada ensayo; los valores entre paréntesis indican la masa de SSLC recuperada y de partida para los termogramas superior e inferior respectivamente.

Resulta evidente que la posibilidad de eliminar agua juega un papel importante tanto en la formación como en la temperatura de fusión de los cristales de azúcares. Considerando tiempos de almacenamiento similares (12-15 días), con la cápsula cerrada la cantidad de cristales es seis veces superior ($\Delta H=161,9 \text{ J/g}$ liofilizado) que con cápsula abierta ($\Delta H=25 \text{ J/g}$ liofilizado). Para

esto asumimos que $\text{área} \approx \text{entalpía} \approx \text{masa de cristales formados}$. Con relación a la estabilidad de los cristales formados en condiciones de confinamiento los cristales tienen una T_p casi 30°C menor que cuando la cápsula está abierta; considerando para este 2^{do} caso la transición más importante.

El análisis en conjunto de los valores de entalpía y temperatura de las transiciones, indica que en condiciones de confinamiento se forma una cantidad 6 veces mayor de cristales pero menos estables debido a la retención del agua. Se sabe que las temperaturas de fusión de los cristales son altamente dependientes del contenido de agua, por el efecto plastificante de este (Roos, 1995). Los cristales de azúcares con un mayor contenido agua de hidratación se funden a temperaturas más bajas que los mismos en estado deshidratado.

En condiciones idénticas de almacenamiento (no-confinamiento), podemos analizar el fenómeno de recristalización. En la Figura 39 puede verse que las dos transiciones que aparecían luego de 12 días de almacenamiento del SSLC con el desecante se unifican en una única transición luego de 22 días de almacenamiento; esta nueva transición a la que denominamos (V) Se postula que esta variación se debe tanto a fenómenos de recristalización así como a la eliminación del agua y su consecuente efecto plastificante como consecuencia de su almacenamiento en desecante.

7.2 Sobre la estructura microscópica del suero liofilizado

Habiendo determinado las temperaturas en las cuales se producen los principales cambios al nivel de las proteínas y de los oligosacáridos del SSL, se quiso determinar que cambios morfológicos se producen luego de alcanzar las muestras esas temperaturas: 90°C (temperatura necesaria para fundir los cristales de azúcares formados durante el almacenamiento a -80°C), 140°C (temperatura que corresponde con el fin de la desnaturalización de la lectina se ubica justo a la mitad del gran pico exotérmico de glicosilación), 180°C (punto de máxima glicosilación) y finalmente 210°C (reacciones de descomposición y carbonización).

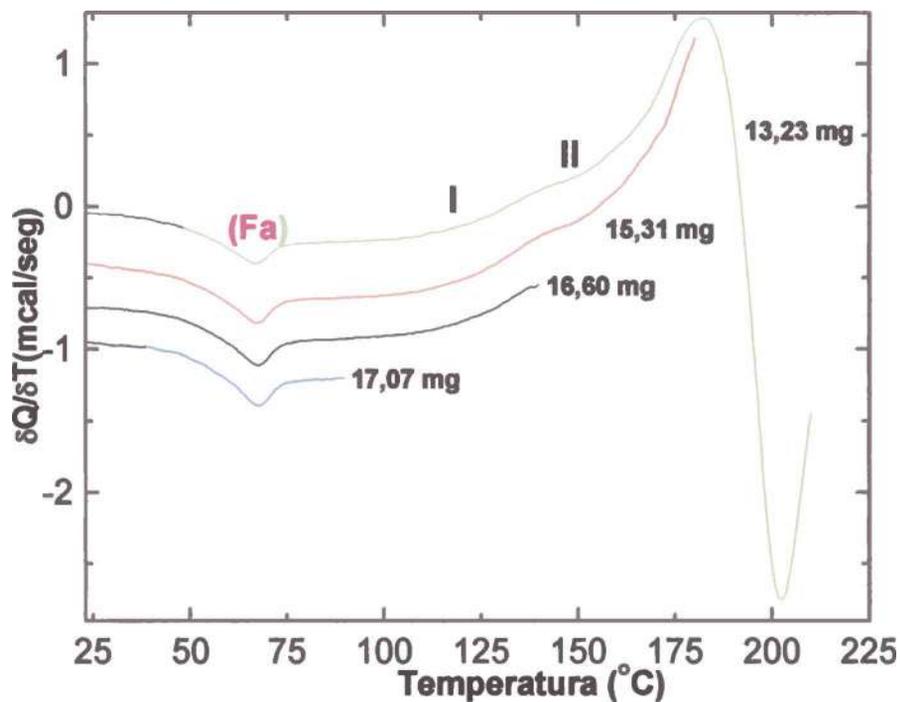


Figura 40: Termogramas de SSL; los tratamientos térmicos fueron realizados hasta temperaturas claves (previamente determinadas según las regiones detalladas en 4) a fin de analizar su efecto sobre la morfología de las muestras (estudio por ESEM). Las masas se indican junto a cada termograma y las máximas temperaturas alcanzadas en los tratamientos térmicos fueron: (—) 90 $^{\circ}\text{C}$; (—) 140 $^{\circ}\text{C}$; (—) 180 $^{\circ}\text{C}$; (—) 210 $^{\circ}\text{C}$.

El SSLC recuperado a partir de las cápsulas luego del tratamiento térmico (DSC, 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) y posterior enfriado (hielo, 30 min.) se conservaba en desecante hasta el momento de la microscopía. Al momento de hacer estos ensayos el tiempo de almacenamiento del suero liofilizado era de 81 días; por lo visto en 4.2.2 para un almacenamiento mayor de 50 días se manifiesta la transición correspondiente a la fusión de azúcares lo cual indica en la Figura 40 como “Fa”. También se señalan las inflexiones correspondientes a la desnaturalización de las fracciones I (lectina) y II (FAK).

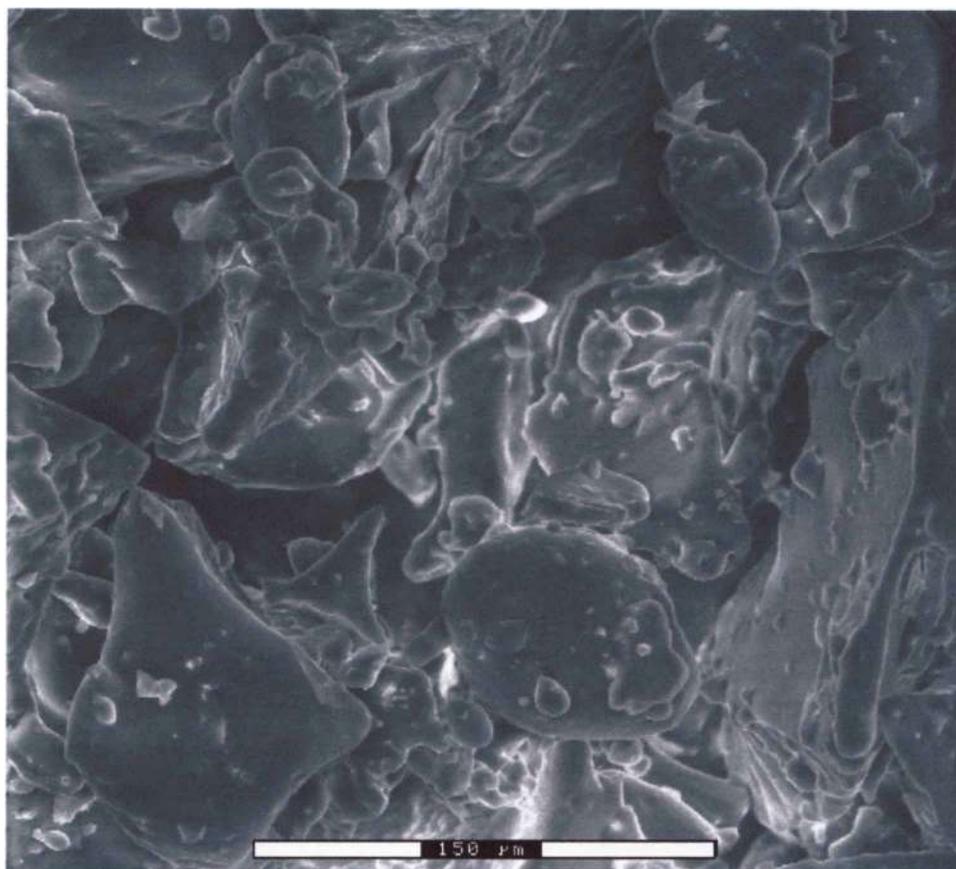


Figura 41: Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) de muestra de suero de soja liofilizado no tratado térmicamente analizado con un aumento de 290X. El aspecto de la muestra es el de una matriz amorfa con una distribución de tamaño de gránulos causada por el proceso de molienda propiamente dicho; en la parte inferior de la micrografía se inserta una barra de referencia de tamaño de 150 μm .

La Figura 42 muestra una matriz amorfa de aspecto similar a la muestra no tratada térmicamente (Figura 41) pero con la formación de puentes (indicados en la micrografía como "B") que conectan y unen porciones del liofilizado que antes del tratamiento térmico se encontraban separadas

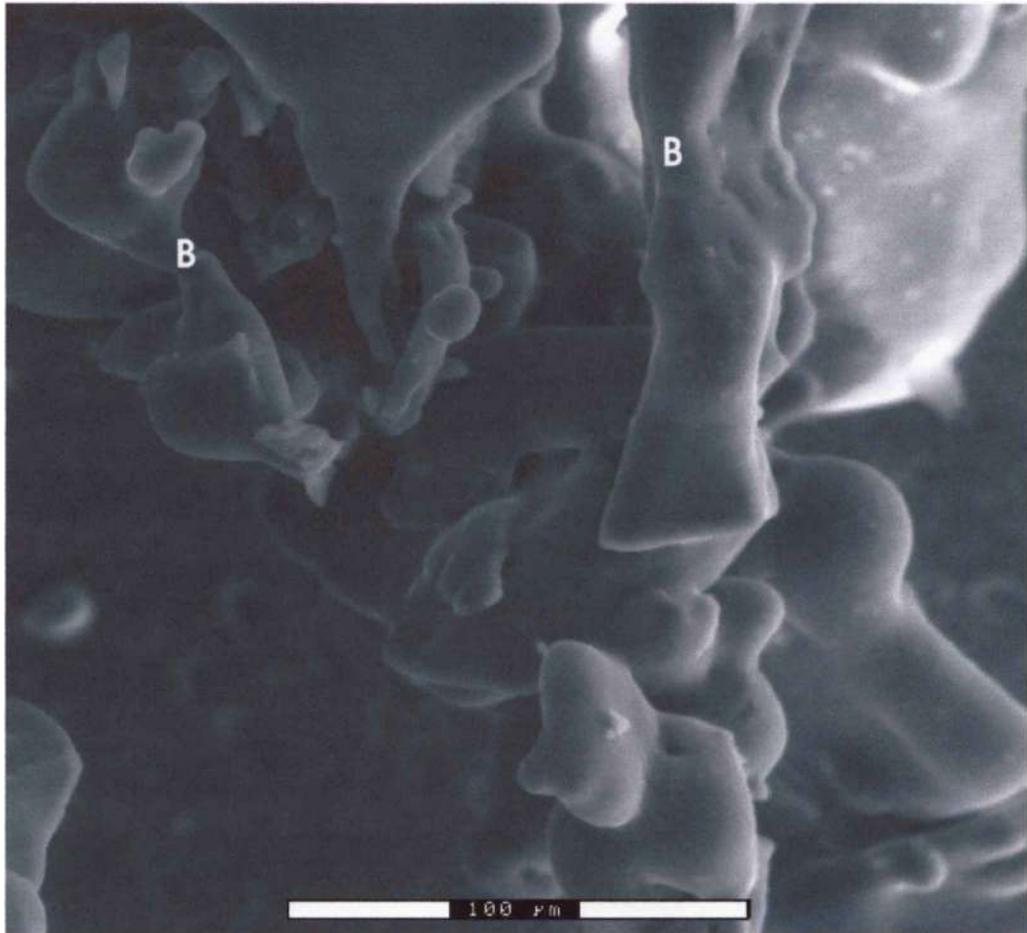


Figura 42: ESEM de muestra de suero de soja liofilizado tratado térmicamente hasta 90°C; la misma fue analizada con un aumento de 400X y se incluye en la parte inferior una barra de referencia de tamaño de 100 μm .

Debemos considerar que cuando el tratamiento térmico alcanza los 90°C se funden los cristales de azúcares presentes y esta unión entre porciones del liofilizado previamente separadas se corresponde con las *observaciones macroscópicas* en que luego de un tratamiento térmico suave como éste el aspecto cambia de un polvo fino a una granulometría similar a la de azúcar rubio.

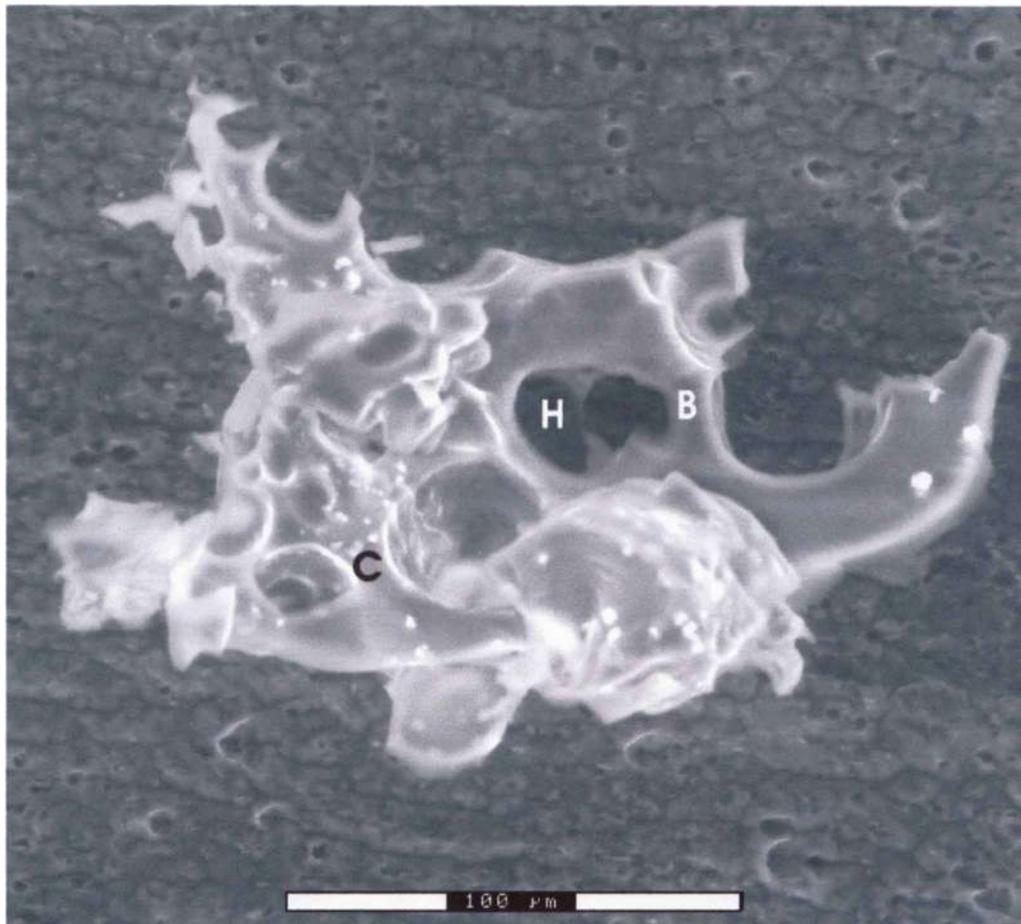


Figura 43: Microscopía electrónica de barrido ambiental de muestra de suero de soja liofilizado tratado térmicamente hasta 140°C; la misma fue analizada con un aumento de 400X. La matriz presenta un aspecto más estructurado, con la aparición de huecos y cristales, indicados como “H” y “C” respectivamente en la micrografía.

La Figura 43 muestra un aspecto que se aleja al de una matriz totalmente amorfa o amorfa con la presencia de puentes “B” anteriormente vistas para dar paso a una matriz más estructurada. En esta micrografía puede verse que lo que se insinuaba como puentes que conectaban porciones discretas del liofilizado ahora se define como los límites de huecos (indicadas como “H” en la micrografía) formados en la matriz. Estas cavidades dejadas en la matriz son las “huellas” dejadas por los productos gaseoso generados durante la reacción de Maillard

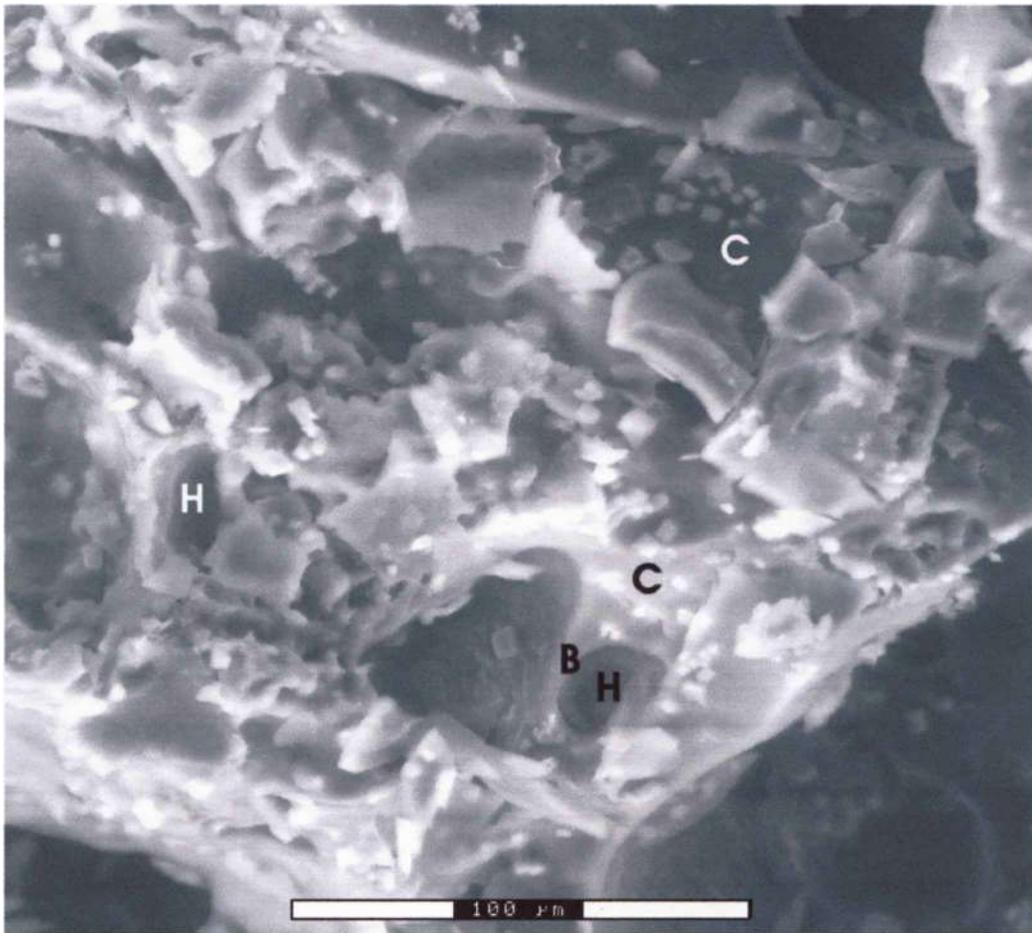


Figura 44: Microscopía electrónica de barrido ambiental de muestra de suero de soja liofilizado, tratado térmicamente hasta 180°C; la misma fue analizada con un aumento de 400X, presenta un aspecto más compacto (que el anteriormente observado para tratamientos térmicos menos intensos), y cuenta con la presencia de las mismas estructuras; puentes y huecos, indicados como “B” y “H” respectivamente, pero con una cantidad muy superior de cristales indicados como “C” en la micrografía. Al pie de la misma se incluye una escala de referencia de 100 µm.

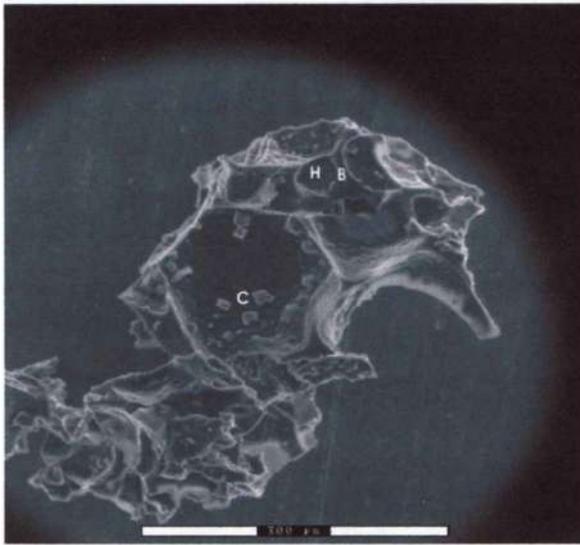


Figura 45-a

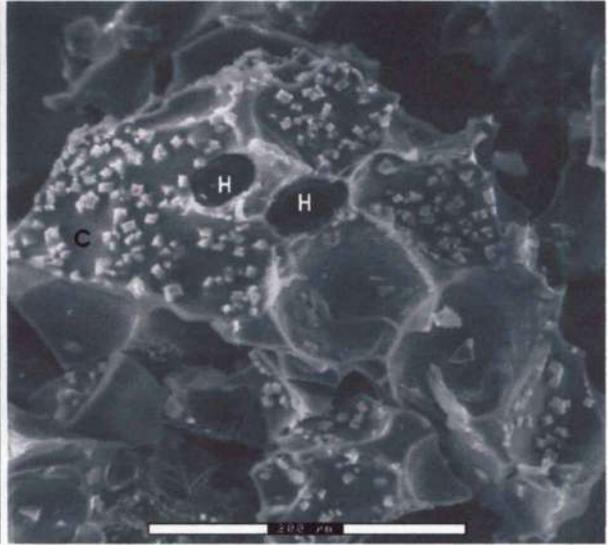


Figura 45-b

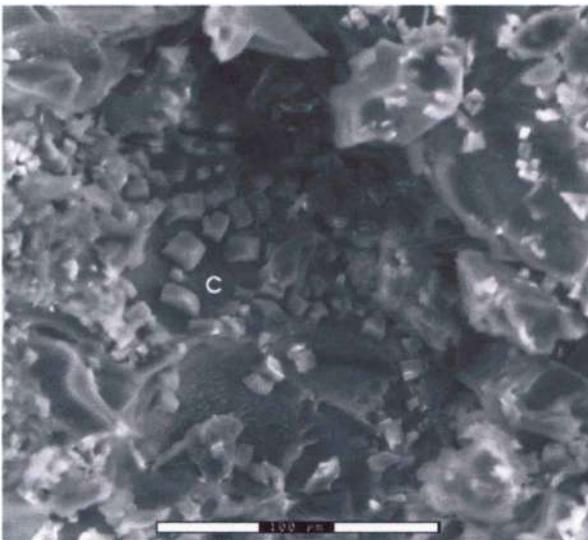


Figura 45-c

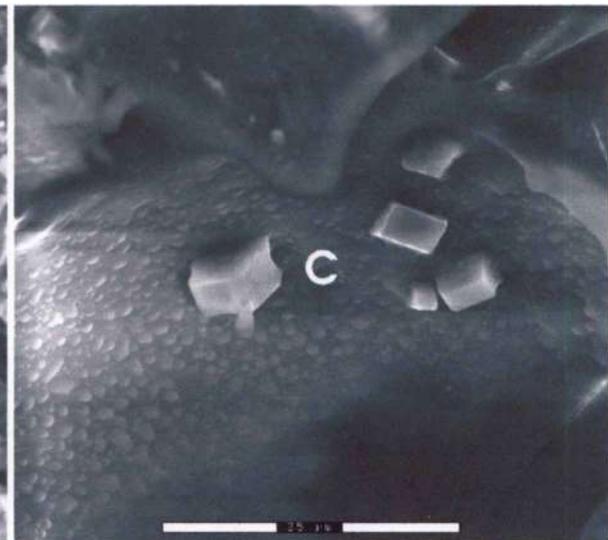


Figura 45-d

Figura 45: Microscopía electrónica de barrido ambiental de muestra de suero de soja liofilizado, tratado térmicamente hasta 210°C; la misma fue analizada con los siguientes aumentos: a) 160X; b) 240X; c) 430X y d) 1300X. Debajo de cada una se incluye una referencia de tamaño, las mismas son de 300, 200, 100 y 35 μm para las Figuras a, b, c y d respectivamente.

Estos productos pueden ser gases preexistentes eliminados (CO₂, O₂) o puede haber adoptado ese estado como consecuencia del desprendimiento de vapores generados por tratamiento térmico (H₂O, NH₃). De esta manera, durante el tratamiento térmico ocurre en forma simultánea la

reacción de pardeo no enzimático la cual genera productos gaseosos que no pueden escapar (por el sellado de la cápsula); lo que ocasiona un aumento de la presión dentro de la cápsula. Esto gases bajo presión se acumulan y formar burbujas las cuales deforman el material (hecho también facilitado por la alta temperatura que incrementa la plasticidad de la matriz) y originan las cavidades que persisten luego del enfriamiento originando los huecos vistos. También puede observarse la aparición de pequeñas cantidades de cristales las cuales se indican como "C" en las Figuras 43 y 44

En la Figura 44 puede observarse un notable incremento en el número de cristales (indicados como "C"). Evidentemente el tratamiento hasta alta temperatura induce a que, una vez enfriada la cápsula, los azúcares cristalicen con más facilidad. Si bien hasta el momento se suponía que 180°C es la temperatura en la que se producen fenómenos de glicosilación, no hay razones para suponer que estos procesos tenga influencia sobre la tendencia a la cristalización de los azúcares, sino por el contrario, si estos toman parte de una glicosilación quedarían menos libres para cristalizar. A fin de explicar la mayor tendencia a la formación de cristales de azúcares en el SSL cuanto mayor es la temperatura a la que se somete, se deben recurrir a otras hipótesis. En principio, sabemos que más del $\approx 55\%$ p/p del SSL es de azúcares (proteínas < 18%) y que estos son mayoritariamente oligosacáridos. En segundo lugar ya observamos que tienen muy poca tendencia a cristalizar, lo cual quedó demostrado pues en el SSLC (90°C) donde se fundieron los cristales presentes, no cristalizan luego del enfriamiento. Se puede suponer entonces que a una temperatura alta como es 180°C se puede producir en presencia del agua liberada la hidrólisis a especies (monosacáridos y/o disacáridos) con mayor tendencia a cristalizar. Esto también se observa para SSLC hasta 210°C (Figura 45). Se puede observar cuando el aumento es suficiente (430-1300X) que los cristales son de forma cúbica o rómbica con un tamaño de 4-6 μm de lado.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

- El secado del suero de soja por liofilización facilita las operaciones de almacenamiento, manipulación y posterior tratamiento térmico destinados a la inactivación de los factores nutricionalmente indeseables, sin alterar la composición relativa de los componentes originariamente presentes.
- El rendimiento global en la obtención de suero liofilizado fue elevado, mientras que el rendimiento alcanzado para el suero liofilizado calentado dependió de la intensidad del tratamiento térmico.
- Un proceso a escala industrial destinado a obtener suero deshidratado térmicamente tratado podría combinar ambos procesos mediante una etapa de concentración seguido de una secado por Spray.
- El suero de soja resulto ser un subproducto altamente diluido (extracto seco < 4%) que al ser liofilizado se concentra 34 veces para producir un polvo con una relación 3: 1 para carbohidratos y material nitrogenado; también contiene sales, minerales y otros componentes minoritarios.
- En el suero liofilizado la mayor parte de los glúcidos presentes corresponden a sacarosa y los oligosacáridos rafinosa y estaquiosa típicos de la soja.
- Las especies proteicas mayoritarias son la hemaglutinina (lectina) y el factor antitriptico de Kunitz; aunque también se identificaron lipoxigenasa, amilasa y factor antitriptico de Bowman-Birk.
- Las proteínas en el suero liofilizado conservan una estructura más nativa en comparación con las proteínas aisladas debido al efecto crioprotector de los azúcares presentes.
- El suero liofilizado contiene agregados en los que participa tanto la lectina como el factor de Kunitz, dichos agregados están estabilizados tanto por uniones disulfuro como por uniones no covalentes (glicoproteínas).
- El suero liofilizado tiene una Tg ubicada entre $-3,3$ y $-2,7^{\circ}\text{C}$ dependiente de la presencia de trazas de humedad; las reacciones de glicosilación, desnaturalización y descomposición ocurren a temperaturas superiores a 100°C .

- En las dispersiones acuosas de suero liofilizado o de las proteínas aisladas a partir de este el factor antitriptico de Kunitz se desnaturaliza a menor temperatura que la lectina. La presencia de sales y azúcares produce una estabilización de ambas fracciones proteicas.
- En estado anhidro hay una inversión en las estabilidades relativas, de manera que la lectina es la fracción que se desnaturaliza primero y se acompaña de un substancial incremento en las estabilidades de ambas fracciones.
- El almacenamiento del suero liofilizado a temperaturas muy por debajo de la Tg es apropiado para su conservación durante varias semanas.
- El almacenamiento prolongado (meses) en dichas condiciones produce por lado la cristalización y recristalización de los azúcares presentes que se revela como una endoterma de fusión a 65°C (≈ 50 días). Por otra parte el almacenamiento ocasiona la desnaturalización de las proteínas presentes.
- En un almacenamiento prolongado en las condiciones mencionadas, las proteínas se desnaturalizan siguiendo el orden dado por su estabilidad térmica en presencia de agua; es decir el factor antitriptico de Kunitz antes que lectina.
- El tratamiento térmico del suero liofilizado a diferentes temperatura finales (90 -210°C) condujo a muestras tipo caramelo con un progresivo aumento de su color pardo-rojizo.
- El corrimiento del máximo hacia 285 nm en estos caramelos puede deberse a la mayor exposición de tirosina (desnaturalización proteica) y a la formación de 5-hidroxiacetilfurfural (HMF), debido a las reacciones de pardeo no enzimático.
- En suero liofilizado tratado térmicamente hay un incremento en la formación de agregados, una disminución en la cantidad de azúcares libres y se generan productos de degradación de Maillard.
- La cantidad de glúcidos libres disminuye con el tratamiento térmico debido a las reacciones de glicosilación y caramelización (revelada por la formación de furfural); los tratamientos térmicos enérgicos producen descomposición de los sacáridos presentes.
- La estabilidad frente a la agregación térmica de las fracciones proteicas indentificadas en el suero liofilizado sigue el orden: β -amilasa = lipoxigenadas < lectina < factor antitriptico de Kunitz.
- Se halló una fuerte correlación entre la inactivación biológica del factor de Kunitz y los procesos de agregación y desnaturalización ocurridos durante el tratamiento térmico. La

desnaturalización se produce a menor temperatura que los fenómenos de agregación-desnaturalización.

- La precipitación con acetona resultó un método adecuado para obtención de proteínas aisladas de suero de soja, debido a su simplicidad y rapidez, con un mejor rendimiento que el obtenido con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- La precipitación con solventes induce un mayor estado de agregación de las proteínas.
- Las modificaciones en la estabilidad relativa de los proteínas obtenidas desde suero liofilizado tratado térmicamente se atribuye al estado de agregación, a los procesos de glicosilación y a las interacciones con otras sustancias presentes en el suero.
- El tratamiento térmico del suero liofilizado produce la glicosilación de sus proteínas con incremento del PM medio. La lectina (glicoproteína) forma agregados a menor temperatura que los factores antitripticos sin variar su grado de desnaturalización.
- Las electroforesis reveladas con coloración específica para glicoproteínas confirman que el tratamiento térmico induce reacciones de glicosilación e identifican a la lectina como la principal proteína glicosilada.
- El incremento en la tendencia a la formación de cristales luego de tratamientos térmicos energéticos se atribuye a la hidrólisis de los sacáridos presentes los cuales tienen una mayor tendencia a cristalizar.
- En los ensayos que combinan tratamiento térmico y almacenamiento resulta evidente que la posibilidad de eliminar agua juega un papel importante en la cantidad y estabilidad de los cristales de azúcares formados.

BIBLIOGRAFÍA

9. Bibliografía

- Abelson, J.N. y Melvin, S.I. (1990). En: *Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology, Seccion VIII, Purification Procedures: Electrophoretic Methods*, Edited by Murray P Deutscher, Academic Press, pp 433.
- Ablett, A., Izzard, M.J. y Lillford, P.J. (1992). *Differential scanning calorimetric study of frozen sucrose and glycerol solutions*. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 88, 789-794.
- Baltes, W. (1982) *Chemical changes in food by the Maillard reaction* *Food Chem.* 9, 59-73.
- Bellows, R.J. y King, C.J. (1973). *Product collapse during freeze drying of liquid foods*. *AIChE Symp. Ser.* 69 (132), 33-41.
- Berlin, E., Anderson, B. y Pallansch, M. (1973). *Water sorption by dried dairy products stabilized with carboxymethyl cellulose*. *J. Dairy Science*, 56, 685-689.
- Birk, Y. y Gertler, A. (1961). *J. Nutr.*, 75: 379.
- Block, R.J., Mandl, R.H., Howard, H.W., Bauer, C.D. y Anderson, D.W. (1961). *Arch. Biochem. Biophys.*, 93: 15.
- Blond, G. (1989). *Water-galactose system: Supplemented state diagram and unfrozen water*. *Cryo-Lett.* 10, 299-308.
- Braverman, J.B.S. (1963) *Introduction to the biochemistry of foods*. Elsevier Publishing Co.
- Burton, H. y Mc Weeny, D. (1963). *Non-enzimatic browning reactions: Consideration of sugar stability*. *Nature*, 197: 266.
- Cerrutti, P., Resnik, S.L., Seldes, A. y Ferro Fontan, C. (1985) *Kinetics of deteriorative reactions in model food systems of high water activity: glucose loss, 5-hidroxymethylfurfural accumulation and fluoescence development due to nonenzymatic browning*. *J. Food Sci.* 50, 627-656.
- Che Man, Y.B., Wei, L.S. y Nelson, A.L. (1989). *Acid inactivation of soybean lipoxygenase with retention of protein solubility*. *J. Food Sci.* 54, 963-967.
- Cheftel, J-C., Cuq, J.L y Lorient, D. (1989). En: *Proteínas Alimentarias; versión en español*. Editorial Acribia S.A. 6, 257-275.
- Churella, H.B., Yao, B.C. y Thompson, W.B.C. (1976). *J. Agric. Food Chem.*, 24: 393.
- Clark, A.V. y Tannenbaum, S.R. (1970) *Isolation and characterization of pigments from protein-carbonyl browning systems*. *J. Agr. Food Chem.* 18, 891-894.

- Clegg, K.M. (1964) *Non enzymic browning of lemon juice*. J. Sci. Food. Agric. 15, 878-885.
- Cole, S.J. (1967) *The Maillard reaction in food products. Carbon dioxide production*. J. Food Sci. 32, 245-250.
- Damodaran, S. y Kinsella, J.E. (1982). *Effects of ions o protein conformation and functionality*. In *Food Protein Deterioration Mechanisms and Functionality*., Ed. J.P. Cherry, 327-358, ACS Symposium Series 206, American Chemical Society, Washington, DC.
- Daza, C.G. (2002); Informe presentado por el Área de Economía, Estadística e Informática. I.N.T.A. EEA Marcos Juárez.
- Dipietro, C.M., y Liener, I.E. (1989a). *Heat inactivation of de Kunitz and Bowman-Birk soybean protease inhibitors*. J. Agric. Food Chem.37, 39-43.
- Dipietro, C.M. y Liener, I.E. (1989b). *Soybean protease inhibitors in foods*. J. Food Sci. 54, 606-617.
- Doyon, L. y Smyrl, T.G. (1983) *Interaction of thiamine with reducing sugars*. Food Chem. 12, 127-133.
- Drane, H.M., Patterson, D.S.P., Roberts, B.A. y Saba, N. (1980). Food Cosmet. Toxicol., 18: 425.
- Dubois M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956). *Colorimetric Method for Determination of Sugars*; Agric. Research Service, Vol. 28, Nº 3.
- Dworschak, E. (1980) *Nonenzyme browning and its effect on protein nutrition*. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition 13, 1-40.
- Ehrenfest, P. (1933). Proc. Acad. Sci., Amsterdam 36: 153. Cited in Wunderlich (1981).
- Eldridge, A.C. (1978). In: *Soybeans: Chemistry and Technology* (Smith, A.K. and Circle, S.J., Eds.). Vol. 1, p. 144. Avi Publishing Co., Westport, Connecticut.
- Ellis, G.P. (1959) *The Maillard reaction*. Adv carbohyd. Chem. 14, 63-134.
- Erickson D. R. (Ed). (1995) *Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization*. (pp 15); AOAC Press Champaign, Illinois and Unites Soybean Board St Louis, Missouri.
- Erickson, L.E. (1982) *Recent developments in intermediate moisture foods*. J. Food Prot. 45, 484-491.
- Eskin, N.A.M., Grossman, S. y Pinsky, A. (1977). *Biochemistry of lipoxygenase in relation of food quality*. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 9, 1-12.

- Feather, M.S., y Nelson, D. (1984) *Maillard polymers derived from D-glucose, D-fructose, 5-(Hydroxymethyl) -2- furaldehyde, and glycine and methionine*. J. Agr. Fd. Chem. 32, 1428-1432.
- Finegold, L., Franks, F. y Hatley, R.H.M. (1989). *Glass/rubber transitions and heat capacities of binary sugar blends*. J.Chem. Soc., Faraday Trans. 1 85: 2945-2951.
- Flink, J.M. (1983) *Nonezymatic browning of freeze-dried sucrose*. J. Food Sci. 48, 539-542.
- Fox, T. y Flory, P. (1950). *Second-order transition temperatures and related properties of polystyrene. I. Influence of molecular weight*. J. Appl. Phys., 21: 558-591.
- Franks, F. (1990). *Freeze drying: From empiricism to predictability*. Cryo-Lett. 11, 93-110.
- Friedman, L. y Kline, O.L. (1950). *The amino acid-sugar reaction*. J. Biol. Chem. 184, 599-606.
- Gerschenson, L., Bartholomai, G. y Chirife, J. (1981). *Structural collapse and volatile retention during heating and rehumidification of freeze-dried tomato juice*. J. Food Sci., 46, 152-1556.
- Gonzalez, R. y Carrillo, D. (1987) *Nutrición humana. Manual de prácticas*. La Habana, Cuba. Ed. Pueblo y Educación, pp. 34-36.
- Gordon, M y Taylor, J. (1952). *Ideal polymers and the second order transitions of synthetic rubbers. I. Non-crystalline copolymers*. J. Appl. Chem.; 2, 493-500.
- Haas, V.A., Stadman, E.R. ,Stadman, F.H. y Mackinney, G. (1948). *Deterioration of dried fruits. I. The effect of sugars and furfurals*. J. Am. Chem. Soc. 70, 3576-3579.
- Hermansson, A. M. (1978). *Physico-chemical aspects of soy proteins structure formation*. J Texture Studies 9, 33-58.
- Hodge, J.E. (1953). *Chemistry of browning reaction in model systems*. J. Agr. Food Chem. 1, 928-943.
- Hodge, J.E. y Osman, E.M. (1976). *Carbohydrates. In: Principles of Food Science. Part I. Food Chemistry*, 41-138 (O.R. Fennema, ed.). Marcel Dekker Inc., New York.
- Hoermann, H. Y Siddiqui, I.A. (1968). *Color Reactions of Carbohydrates. IV. Products of the Color Reaction of D-Fructose and D-Glucose with Anthrone-Sulfuric Acid*. Justus Liebigs Ann. Chem 714: 174-190. Citado por Lee. (1978).
- Hurrel, R.F. y Carpenter, K.J. (1977). *Mechanisms of heat damage of proteins. 8. The role of sucrose in the susceptibility of protein foods to heat damage*. Br. J. Nutr. 32, 589-604.

- Iglesias, H. Y Chirife, J. (1978). *Delayed crystallization of amorphous sucrose in humidified freeze-dried model systems*. J. Food Technol.; 13, 137-144.
- Iwabuchi, S. y Yamauchi, F. (1987). *Electrophoretic analysis of whey proteins present in soybean globulin fractions*. J. Agric. Food Chem. 35 (2), 205-209.
- Jaffe, G. (1981). J. Am. Oil Chemists' Soc., 58: 493.
- Kakade, M.L., Simons, N.R., Liener, I.E. y Lambert, J.W. (1972). J. Agric. Food Chem., 20:87.
- Karel, M., Bucra, M.P. y Roos, Y. (1993). *Effects of glass transitions on processing and storage*. Chpt. 2 in *The Glassy State in Foods*, Ed. J.M.V. Blanshard and P.J. Lillford, Nottingham University Press, Loughborough, 13-34.
- Karmas, R. (1994). *The effect of glass transition on non-enzymatic browning in dehydrated food systems*. Doctor Philosophy Thesis, Rutgers University of New Jersey, New Brunswick, New Jersey, U.S.A.
- Kato, H. y Tsuchida, H. (1981). *Estimation of melanoidin structure by pyrolysis and oxidation*. Prog. Fd. Nutr. Sci. 5, 147-156.
- Kitamura, K., Takagi, T. y Shibasaki, K. (1976). *Subunit structure of soybean 11S globulin*. Agric. Biol. Chem. 40, 1837-1844.
- Knuckles, B.E., DeFremery, D. y Kohler, G.O. (1976). J. Agric. Food Chem., 24: 1177.
- Koide, T. e Ikenaka, T. (1973). *Studies on soybean trypsin inhibitors III. Aminoacid sequence of the carboxyl-terminal region and the complete aminoacid sequence of soybean trypsin inhibitor*. Eur. J. Biochem. 32, 417-431.
- Konijn, A. M. Gershon. B. y Guggenheim, K. (1973). J. Nutr., 103: 378.
- Koshiyama, Y., Kikuchi, M. y Fucushima, D. (1981). *2S Globulins of soybean seeds. 2. Physicochemical and biological properties of protease inhibitors in 2S globulins*. J. Agric. Food Chem. 29, 340-343.
- Kunitz, M. (1946). J. Gen. Physiol., 29: 149.
- Labuza, T.P., Warren, R.M. y Warmbier, H.C. (1977). *In Protein Cross-linking*, 379-418 (M. Friedman, Ed.) Plenum Publ. Corp., New York.
- Labuza, T.P. y Saltmarch, M. (1981). *The nonenzymatic browning reactions as affected by water in foods. En: Properties of water related to food quality and stability*, 605-650 (L.B. Rockland and G.F. Stewart, Eds.) Academic Press, San Francisco.

- Laemmli, U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227, 680-685.
- Lah, C. L. y Cheryan, M., J. (1980). Agric. Food Chem. 28, 911.
- Lara, R.C. y Gilliland, S.E. (1985). *Growth inhibition of microorganisms in refrigerated milk by added Maillard reaction products*. J. Food Prot. 48, 138-141.
- Lea, C.H. (1958). *Chemical changes in the preparation and storage of dehydrated foods*. In: *Fundamental aspects of the dehydration of foodstuffs*, 178-196. Society of Chemical Industry, London.
- Lee, C.M., Sherr, B. y Koh, Y.N. (1984). *Evaluation of kinetics parameters for a glucose-lysine Maillard reaction*. J. Agric. Food Chem. 32, 379-382.
- Levine, H. y Slade, L. (1986). *A polymer physico-chemical approach to the study of commercial starch hydrolysis products*. Carbohydr. Polym. 6, 231-244.
- Levine, H. y Slade, L. (1988). *Principles of "cryostabilization" technology from structure/property relationships of carbohydrate/water systems – A review*. Cryo-Lett. 9, 21-63.
- Levine, H. y Slade, L. (1992). *Glass transitions in foods*, In: *"Physical Chemistry of Foods"*, Schwartzberg, H. y Hartel, R. (Eds.), Marcel Dekker, New York, 83-221.
- Liener, I.E. (1974). J. Agric. Food Chem., 22 : 17.
- Liener, I.E. (1978). In *Soybeans: Chemistry and Technology* (Smith, A. K. and Circle, S. J., Eds.). Vol 1. p. 203. Avi Publishing Co., Westport, Connecticut.
- Liener, I.E. (1981). *Factors affecting the nutritional quality of soya products*. J. Am. Oil Chem. Soc., 58, 406-415.
- Lingnert, H. y Eriksson, C.E. (1981). *Antioxidative effect of Maillard reaction products*. Prog. Fd. Nutr. Aci. 5, 453-466.
- Loncin, M., Jacqmain, D., Tutundjian-Provost, A.M., Lenges, J.P. y Bimbenet, J.J. (1965). *Influence de l'eau sur les reactions de Maillard*. C.R. Acad. Sc. (Paris) 260, 3208-3211.
- Lotan, R., Siegelman, H.W., Lis, H. y Charon, N. (1974). *Subunit Structure of soybean agglutinin*. J. Biol. Chem. 249, 1219-1224.
- Lowry, O.H.; Rosembroug, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). *Protein measurement with the Folin Phenol reagent*. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

- Maier, V.P. y Schiller, F.H. (1959). *Studies on domestic dates. I. Methods for evaluating darkening*. Food Technol. 14, 139-142.
- Mauron, J. (1981). *The Maillard reaction in food; A critical review from the nutritional standpoint*. Prog. Fd. Nutr. Sci. 5, 5-35.
- Menting, L.C., Hoogstad, B. y Thijssen, H.A.C. (1970). *Diffusion coefficient of water and organic volatiles in carbohydrate-water systems*. J. Food Technol. 5, 111-126.
- Meschter, E.E. (1953). *Fruit color loss. Effects of carbohydrates and other factors on strawberry products*. J. Agr. Food Chem. 1, 574-579.
- Meydav, S., Saguy, J. y Kopelman, I.J. (1977). *Browning determination in citrus products*. J. Agr. Food Chem. 25, 602-604.
- Meyer, E.W. y Williams, L.D. (1976). In: *World Soybean Research* (Hill, L.D., Ed.). p. 904. Interstate Printers and Publishers. Inc., Danville, Illinois.
- Morita, Y., Yagi, F., Aibara, S. y Yamashita, H. (1976). *Chemical composition and properties of soybean β -amylase*. J. Biochem. 79, 591-603.
- Mustakas, G.C., Moulton, K.J., Baker, E.C. y Kwolek, W. F. (1981). J. Am. Oil Chemists' Soc., 58: 300.
- Odani, S., Koide, T. e Ikenaka, T. (1972). *Studies on soybean trypsin inhibitor. III. Isolation and sequence determination on the tryptic peptides of Bowman-Birk soybean proteinase inhibitor*. J. Biochem. 71, 831-838.
- Ohren, J. A. (1981). J. Am. Oil Chemists' Soc., 57: 333.
- Park, C.K. y Kim, D.H. (1983). *Relationship between fluorescence and antioxidant activity of ethanol extracts of a Maillard browning mixture*. JAOCS 60, 22-26.
- Pavlath, A.E. and Gregorski, K.S. (1985). *Atmospheric pyrolysis of carbohydrates with thermogravimetric and mass spectrometric analyses*. J. Anal. Appl. Pyrolysis 8: 41-48.
- Pearson, A.M. (1983). - *Soy proteins*. In *Developments in Food Protein-2* (B.J.F. Hudson, ed), 67-108. Applied Science. Pub., London.
- Pikal, M.J. y Shah, S. (1990). *The collapse temperature in freeze drying: Dependence on measurement methodology and rate of water removal from the glassy phase*. Int. J. Pharm. 62, 165-186.
- Pokorny, J. (1980). *Effect of browning reactions on the formation of flavour substances*. Die Nahrung 24, 115-127.

- Powrie, W.D., Wu, C.H., Rosin, M.P. y Stich, H.F. (1981). *Clastogenic and mutagenic activities of Maillard reaction model systems*. J. Food Sci. 46, 1433-1438.
- Privalov, P. L. y Khechinashvili, N. N. (1974). *A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study*. J. Mol. Biol. 86, 665-684.
- Rackis, J.J. (1978). In: *Soybeans: Chemistry and Technology* (Smith, A.K. and Circle, S.J., Eds.). Vol 1, p. 158. Avi Publishing Co., Wesport, Connecticut.
- Rackis, J. J. (1981). J. Am. Oil Chemists' Soc., 58: 503.
- Rackis, J. J., Honig, D.H., Sessa, D.J. y Steggarda, F.R. (1970). J. Agric. Food Chem., 18: 977.
- Resnik, S. y Chirife, J. (1979). *Effect of moisture content and temperature on some aspects of nonenzymatic browning in dehydrated apple*. J. Food Sci. 44, 601-605.
- Resnik, S.L., Peltt, E.A. y Loncin, M. (1981). *Untersuchungen zurnicht-enzymatischen Bräunungsreaktion in flüssigen Modellsystemen*, ZFL 32, 213-216.
- Rockland, L.B., Gardiner, B.L. y Pieczarka, D. (1970). J. Food Sci., 34: 411.
- Rockland, L.B. y Nishi. (1980). *Influence of water activity on food product quality and stability*. Food Technol. 34 (4), 42.
- Roos, Y.H. (1992-a). *Phase transitions and transformations in food systems*. Chpt. 3 En Handbook of Food Engineering, Ed. D.R. Heldman and D.B. Lund Marcel Dekker, New York, 145-197.
- Roos, Y.H. (1992-b). *Reaction Kinetics and thermodynamics in food systems; Part II, Phase transitions and transformations*. En: "Handbook of Food Engineering" Lund, D. y Heldman, D. (Eds.), Marcel Dekker, New York.
- Roos, Y. (1993). *Melting and glass transitions of low-molecular weight carbohydrates*. Carbohydrate Res., 238: 39-48.
- Roos Y.H. (1995). *Ice Formation and Freeze-Concentration*, En: "Phase Transitions in Foods", Taylor, S. (Ed.), Accademic Press, New York, chap. 4 pp. 73-108.
- Roos, Y. and Karel, M. (1991-a). *Amorphous state and delayed ice formation in sucrose solutions*. Int. J. Food Sci. Technol. 26: 553-566.
- Roos, Y. y Karel, M. (1991-b). *Phase transitions of mixtures of amorphous polysaccharides and sugars*. Biotechnol. Prog., 7: 49-53.
- Roos, Y. Karel, M. (1992). *Crystallization of amorphous lactose*. J. Food Sci., 57: 775-777.

- Schwimmer, S. y Olcott, H. (1953). *Reaction between glycine and the hexose phosphates*. J. Am. Chem. Soc., 75: 4835.
- Scopes, R.A., (1982). *Protein Purification, Principles and practice*, by Springer-Verlag, NY Heidelberg Berlin, Chapter 3: 39-66.
- Serrato, A.G. (1981). J. Am. Oil Chemists. Soc., 58: 157.
- Shallenberger, R. y Birch, G., (1975). *Non-enzimatic browning reactions*, En: "Sugar Chemistry". The AVI Publishing Company Westport, Connecticut (Chap. 7).
- Simatos, D., Faure, M., Bonjour, E y Couach, M. (1975). *The physical state of water at low temperatures in plasma with different water contents as studied by differential thermal analysis and differential scanning calorimetry*. Cryobiology 12: 202-208.
- Slade, L. y Levine, H. (1991). *Beyond water activity: Recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 30: 115-360.
- Slade, L. and Levine, H. (1995). *Glass transitions and water-food structure interactions*. Adv. Food Nutr. Res. 38. In press (Ref cap 3, 5, 6 y 7)
- Son, H.-Y., Nishikawa, A., Ikeda, T., Imazawa, T., Kimura, S., Hirose, M. (2001), *Lack of effect of soy isoflavone on thyroid hyperplasia in rats receiving an iodine-deficient diet*. Japanese Journal of Cancer Research, 92 (2), pp 103-108.
- Sorgentini, D.A; Wagner, J.R. (1999). *Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins*. Journal of Food Biochemistry. 23 (1999), 489-507.
- Spark, A.A. (1969). *Role of aminoacids in non-enzymatic browning*. J. Sci. Fd. Agric. 20, 308-316.
- Staswikj, P.E., Hermodson, M.A. y Nielsen, N. C. (1984). *Identification of de cysteines which link acidic and basic components of de glycinin*. J. Biol. Chem. 259, 13431-13435
- Struthers, B.J., Dahlgren, R. R., Hopkins, D. T. y Raymond, M. L. (1979). In: *Soy Protein and Human Nutrition* (Wilcke, H. L., Hopkins, D. T. and Waggle, D. H., Eds.). Academic Press, New York. p. 235.
- Struthers, B. J. (1981). J. Am. Oil Chemists' Soc., 58: 501.
- Sullivan, J.F. (1981). *Control of non-enzymatic browning in the dehydration of fruits and vegetables*. Prog. Fd. Nutr. Sci. 5, 377-393.

- Suyama, K. y Adachi, S. (1979). *Browning reaction between phospholipids and acetaldehyde*. Agric. Biol. Chem. 43, 1981-1982.
- Thanh, V. H. and Shibasaki, K. (1978-a). *Major proteins of soybean seed. Subunit structure of β -conglycinin*. J. Agric. Food Chem. 26, 692-695.
- Thanh, V. H. and Shibasaki, K. (1978-b). *Major proteins of soybean seed. Reconstitution of β -conglycinin. from its subunits*. J. Agric. Food Chem. 26, 695-698.
- Tomosatsu, H "Health effects of Oligosaccharides" Food Technology October 1994, 61-65.
- Tsourouflis, S., Flink, J. y Karel, M., (1976). *Loss of structure in freeze-dried carbohydrates solutions: Effect of temperature, moisture content and composition*. J. Sci. Food Agric., 27: 509-519.
- Turner, R. H. y Liener, I. E. (1975). J. Agric. Food Chem., 23:184.
- Waggle, D. H. y Kolar, C. W. (1979). In: Soy Protein and Human Nutrition (Wilcke, H. L., Hopkins, D. T. and Waggle, D. H., Eds.). Academic Press, New York. (pp. 19).
- Weast, R.C. (1986). CRC Handbook of Chemistry and Physics. 67th ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- White, G. y Cakebread, S., (1966). *The glassy state in certain sugar-containing food products*. J. Food Technol., 1:73.
- Wilgus, H. S., Jr., Gassner, F. X., Patton, A. R. y Gustavson, R. G. (1941). J. Nutr., 22: 43.
- Wolf, W. J. y Corvan, J.C. (1975). *Soybeans as a Food Source*, revised edition. CRC Press Cleveland, Ohio.
- Wolfrom, M.L., Schuetz, R.D. y Cavalieri, L.F. (1948). *Chemical interactions of amino compounds and sugars. III. The conversion of D-glucose to 5- (Hydroxymethyl) -2-furaldehyde*. J. Am. Chem. Soc. 70, 514-517.
- Yamauchi, F., Sato, M., Sato, W., Kamata, Y. and Shibasaki, K. (1981). *Isolation and identification of a new type of β -conglycinin in soybean globulins*. Agric. Biol. Chem. 45, 2863-2868.